

Université de Montréal

Conception et synthèse d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'endothéline

par

Guillaume Charron

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 M. Sc. en chimie

Mars, 2005

©Guillaume Charron, 2005



QD

3

U54

2005

v. 020

## 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.

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Conception et synthèse d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'endothéline

présenté par :

Guillaume Charron

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Prof. Jeffrey Keillor  
président-rapporteur

Prof. Stephen Hanessian  
directeur de recherche

Prof. William Lubell  
membre du jury

## Résumé

L'endothéline est le plus puissant vasoconstricteur endogène connu à ce jour. Elle est produite par l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE). Cette enzyme est présentement le sujet de plusieurs recherches puisqu'elle semble une cible thérapeutique de choix dans le traitement de maladies cardiovasculaires reliées à l'hypertension. Aucune donnée cristallographique de l'enzyme n'est disponible pour le moment. Plusieurs inhibiteurs de l'ECE sont apparus dans la littérature récemment mais ils manquent soit d'activité, soit de sélectivité envers l'enzyme. Dans le but d'approfondir nos connaissances concernant le site actif de l'enzyme ECE, une étude des relations structure-activité de divers inhibiteurs potentiels a été réalisée. Pour ce faire, un inhibiteur présentant une certaine activité et une certaine sélectivité a été choisi comme modèle de base de l'étude. Ce modèle a été rigidifié, en le cyclisant, afin d'en limiter les conformations possibles. De cette manière, l'inhibiteur se retrouve fixé dans l'espace. Cette forme fixée peut présenter une inhibition et une sélectivité améliorées ou non selon que la forme fixe se rapproche ou s'éloigne de la conformation active dans le site actif de l'enzyme. Plusieurs analogues du modèle choisi, avec différentes stéréochimies et différents groupes fonctionnels, ont donc été synthétisés puis testés *in vitro* pour en déterminer l'activité inhibitrice envers l'ECE. Le site actif de l'ECE s'en retrouve donc sondé moléculairement, ce qui permet d'en augmenter nos connaissances.

Mots-Clés : Addition 1,4 d'un organomagnésien catalysée par le cuivre, analogue cyclique, chélateur du zinc, ion N-acyliminium, peptidomimétique, phosphonate, relation structure-activité, restriction conformationnelle, sonde moléculaire.

## Summary

Endothelin is the most potent endogenous vasoconstrictor known to date. It is produced by the endothelin converting enzyme (ECE). This enzyme is presently the subject of much research because it seems like a good therapeutic target for the treatment of cardiovascular diseases related to hypertension. No crystallographic data of the enzyme are available at the moment. Many ECE inhibitors have appeared in the literature recently but they lack either activity or selectivity towards the enzyme. With the objective of improving our knowledge of the active site of ECE, a study of the structure-activity relationships (SAR) of diverse potential inhibitors has been performed. An inhibitor presenting a certain level of activity and selectivity was chosen as model for the study. This model was rigidified, by cyclization, to limit its conformational liberty. By this mean, the inhibitor finds itself fixed in space. The rigid analog may or may not show a better inhibition or selectivity. Many analogs of the chosen model, with different stereochemistries and different functional groups, were synthesized and tested *in vitro* to determine their inhibiting activity towards the ECE. The active site of the ECE was thus molecularly probed to improve our knowledge of the bind requirements of this enzyme.

Keywords : conformational restriction, cyclic analog, endothelin converting enzyme, inhibitor, molecular probe, N-acyliminium ion, peptidomimetic, structure-activity relationship, synthesis, zinc chelator.

## Table des matières

<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>IV</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>V</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>XII</b>
<b>CHAPITRE 1 LES ENZYMES DE CONVERSION DE L'ENDOTHÉLINE.....</b>	<b>1</b>
<b>LES ENDOTHÉLINES ET LEURS ENZYMES DE CONVERSION (ECE) .....</b>	<b>1</b>
<i>Historique.....</i>	<i>1</i>
<i>Transduction du signal.....</i>	<i>2</i>
<i>Implications médicales .....</i>	<i>10</i>
<i>L'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE).....</i>	<i>10</i>
<b>LES INHIBITEURS DE L'ECE .....</b>	<b>13</b>
<i>Inhibiteurs sélectifs à l'ECE.....</i>	<i>14</i>
<i>Inhibiteurs doubles de l'ECE/NEP .....</i>	<i>15</i>
<i>Inhibiteurs triples de l'ECE/NEP/ECA.....</i>	<i>20</i>
<b>CHAPITRE 2 CONCEPTION ET SYNTHÈSE D'INHIBITEURS DE L'ECE .....</b>	<b>22</b>
<b>OBJECTIFS .....</b>	<b>22</b>
<b>CONCEPTION INITIALE.....</b>	<b>22</b>
<b>RÉTROSYNTHÈSE.....</b>	<b>23</b>
<b>SYNTHÈSE DES ANALOGUES TRISUBSTITUÉS .....</b>	<b>25</b>
<b>SYNTHÈSE DES ANALOGUES QUADRISUBSTITUÉS .....</b>	<b>39</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>50</b>
<b>CHAPITRE 3 RÉSULTATS ET ANALYSE DES TESTS ENZYMATIQUES .....</b>	<b>52</b>
<b>ANALYSE DES TESTS ENZYMATIQUES.....</b>	<b>52</b>
<b>TRAVAUX FUTURS.....</b>	<b>56</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>58</b>
<b>CHAPITRE 4 SECTION EXPÉRIMENTALE.....</b>	<b>59</b>
<b>INSTRUMENTATION .....</b>	<b>59</b>

CHROMATOGRAPHIE .....	60
AGENTS RÉVÉLATEURS .....	60
SOLVANTS DE RÉACTION.....	60
NOTES.....	61
PROCÉDURES GÉNÉRALES ET DONNÉES EXPÉRIMENTALES .....	61
<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>100</b>

## Liste des tableaux

TABLE 1 : DIASTÉROSÉLECTIVITÉ DE L'ALKYLATION SELON LA NATURE DES SUBSTITUANTS DE DÉRIVÉS DE L'ACIDE PYROGLUTAMIQUE.....	27
---	----

## Liste des figures

FIGURE 1 : LA SÉQUENCE PRIMAIRE DES ENDOTHÉLINES (ET-1, 2 ET 3) MONTRANT LES POSITIONS DES PONTS DISULPHURES AINSI QUE LES RÉSIDUS QUI DIFFÈRENT DE L'ENDOTHÉLINE-1 (GRIS).....	2
FIGURE 2 : MÉCANISMES DE L'EFFET DE L'ACTIVATION DES RÉCEPTEURS ET <sub>A</sub> ET ET <sub>B</sub> . NOTER LA DIFFÉRENCE ENTRE L'EFFET DE L'ACTIVATION DES RÉCEPTEURS ET <sub>B</sub> DE L'ENDOTHÉLIUM ET DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES.....	3
FIGURE 3 : REPRÉSENTATION D'UN RÉCEPTEUR TRANSMEMBRANAIRE COUPLÉ À UNE PROTÉINE G.....	4
FIGURE 4 : MODÈLE DE FONCTIONNEMENT DES RÉCEPTEURS COUPLÉS AUX PROTÉINES G.....	5
FIGURE 5 : MODÈLE DE TRANSDUCTION DU SIGNAL DE L'ENDOTHÉLINE : PRODUCTION DE SECONDS MESSAGERS INTRACELLULAIRES.....	6
FIGURE 6 : MÉCHANISME DE L'HYDROLYSE DU IP <sub>3</sub> PAR PHOSPHOLIPASE C (PLC).....	7
FIGURE 7 : RÔLE DE LA PHOSPHOLIPASE C (PLC) : EFFET VASOCONSTRICTEUR DE L'ENDOTHÉLINE.....	8
FIGURE 8 : UNE PHOSPHOLIPASE EST NOMMÉE SELON LE LIEN CLIVÉ SUR UN GLYCÉROPHOSPHOLIPIDE.....	8
FIGURE 9 : SCHÉMA GÉNÉRALISÉ DE LA TRANSDUCTION DU SIGNAL DES ENDOTHÉLINES.....	9
FIGURE 10 : BIOSYNTHÈSE DE L'ENDOTHÉLINE-1.....	11
FIGURE 11 : NOMENCLATURE DES FONCTIONNALITÉS CONTENANT UN ATOME DE PHOSPHORE.....	14
FIGURE 12 : INHIBITEURS SÉLECTIFS À L'ECE.....	14
FIGURE 13 : EMBLEMES DES SUBSTITUANTS DU PHOSPHORAMIDON ET DU COMPOSÉ DE GLAXOSMITHKLINE DANS L'ECE SELON LA NOMENCLATURE DE SCHECHTER ET BERGER.....	16
FIGURE 14 : UN ACIDE AMINOPHOSPHONIQUE IMITE L'HYDROLYSE D'UN LIEN PEPTIDIQUE.....	17
FIGURE 15 : COMPARAISON DE LA SÉLECTIVITÉ ENTRE L'ECE ET LA NEP <sup>48</sup> .....	18
FIGURE 16 : EXEMPLES D'INHIBITEURS TRIPLES DE L'ENZYME DE CONVERSION DE L'ENDOTHÉLINE (ECE), DE L'ENDOPEPTIDASE NEUTRE 24.11 (ENP) ET DE L'ENZYME DE CONVERSION DE L'ANGIOTENSINE (ECA).....	20
FIGURE 17 : CYCLISATION D'UN INHIBITEUR DE L'ECE COMME MOYEN DE RIGIDIFIER LA STRUCTURE.....	23
FIGURE 18 : ANALYSE RÉTROSYNTHÉTIQUE DES INHIBITEURS CIBLES.....	25
FIGURE 19 : PROTECTION PUIS ALKYLATION DE L'ACIDE PYROGLUTAMIQUE.....	26
FIGURE 20 : DÉTERMINATION DE LA STÉRÉOCHIMIE PAR OBSERVATION DE L'EFFET NOE INDIQUÉ PAR LA DOUBLE FLÈCHE.....	27
FIGURE 21 : SYNTHÈSE STÉRÉOSÉLECTIVE DE DÉRIVÉS 2,4-CIS DE L'ACIDE PYROGLUTAMIQUE <sup>67</sup> .....	28
FIGURE 22 : FORMATION DE L'ION N-ACYLIMINIUM PUIS INSERTION DU PHOSPHONATE SUR LE DÉRIVÉ 2,4-TRANS DE L'ACIDE PYROGLUTAMIQUE.....	28
FIGURE 23 : MÉCHANISME DE L'INSERTION DU PHOSPHONATE SUR L'ION N-ACYLIMINIUM.....	29
FIGURE 24 : DÉTERMINATION DE LA STÉRÉOCHIMIE PAR OBSERVATION DE L'EFFET NOE INDIQUÉ PAR LA DOUBLE FLÈCHE.....	29

FIGURE 25 : INSERTION DU PHOSPHONATE SUR LE DÉRIVÉ 2,4- <i>CIS</i> DE L'ACIDE PYROGLUTAMIQUE. ....	30
FIGURE 26 : OZONOLYSE RÉDUCTIVE PUIS TOSYLATION DE L'ALLYLE DU PHOSPHONATE 2,4- <i>TRANS</i> , 4,5- <i>CIS</i> . .....	31
FIGURE 27 : FONCTIONNALISATION DE L'ALCÈNE DES AUTRES DIASTÉRÉOISOMÈRES DES PHOSPHONATES. ....	32
FIGURE 28 : DÉPLACEMENT DU TOSYLATE PAR LE NAPHTHALIMIDURE DE SODIUM. ....	33
FIGURE 29 : CONDITIONS DIFFÉRENTES DE SAPONIFICATION DE L'ESTER MÉTHYLIQUE SELON SA STÉRÉOCHIMIE RELATIVE AU PHOSPHONATE. ....	34
FIGURE 30 : SAPONIFICATION DU COMPOSÉ 2,4- <i>CIS</i> . ....	35
FIGURE 31 : COUPLAGE PEPTIDIQUE DES COMPOSÉS 2,4- <i>TRANS</i> . ....	36
FIGURE 32 : COUPLAGE PEPTIDIQUE DU COMPOSÉ 2,4- <i>CIS</i> . ....	36
FIGURE 33 : DÉTERMINATION DE LA STÉRÉOCHIMIE PAR OBSERVATION DE L'EFFET NOE INDIQUÉ PAR LA DOUBLE FLÈCHE. ....	37
FIGURE 34 : DÉPROTECTIONS FINALES DE L'INHIBITEUR POTENTIEL DE L'ECE 2,4- <i>TRANS</i> , 4,5- <i>CIS</i> . ....	37
FIGURE 35 : MÉCANISME DE L'HYDROLYSE DU PHOSPHONATE EN ACIDE PHOSPHONIQUE. ....	38
FIGURE 36 : DÉPROTECTIONS FINALES DES AUTRES DIASTÉRÉOISOMÈRES INHIBITEURS POTENTIELS DE L'ECE. ....	39
FIGURE 37 : ESTÉRIFICATION, RÉDUCTION ET PROTECTION DE L'ACIDE PYROGLUTAMIQUE <sup>69</sup> . ....	40
FIGURE 38 : OXYDATION DE L'ACIDE PYROGLUTAMIQUE PROTÉGÉ EN LACTAME $\alpha,\beta$ -INSATURÉE PAR ÉLIMINATION D'UN SÉLÉNOXYNANE <sup>70</sup> . ....	40
FIGURE 39 : ADDITION CATALYSÉE PAR LE CUIVRE D'UN ORGANOMAGNÉSIE EN POSITION 3. ....	41
FIGURE 40 : DÉTERMINATION DE LA STÉRÉOCHIMIE PAR OBSERVATION DE L'EFFET NOE INDIQUÉ PAR LA DOUBLE FLÈCHE. ....	41
FIGURE 41 : ALKYLATION DU DÉRIVÉ DE L'ACIDE PYROGLUTAMIQUE. ....	42
FIGURE 42 : DÉTERMINATION DE LA STÉRÉOCHIMIE PAR OBSERVATION DE L'EFFET NOE INDIQUÉ PAR LA DOUBLE FLÈCHE. ....	42
FIGURE 43 : DÉPROTECTION, OXYDATION ET ESTÉRIFICATION DU DÉRIVÉ DE L'ACIDE PYROGLUTAMIQUE. ....	43
FIGURE 44 : INSERTION DU PHOSPHONATE PAR ADDITION SUR L'ION N-ACYLIMINIUM. ....	44
FIGURE 45 : DÉTERMINATION DE LA STÉRÉOCHIMIE PAR OBSERVATION DE L'EFFET NOE INDIQUÉ PAR LA DOUBLE FLÈCHE. ....	44
FIGURE 46 : FONCTIONNALISATION DE L'ALCÈNE EN NAPHTHALIMIDE DES COMPOSÉS TÉTRASUBSTITUÉS. ....	45
FIGURE 47 : SAPONIFICATION DE L'ESTER DES COMPOSÉS TÉTRASUBSTITUÉS. ....	46
FIGURE 48 : L'ACIDE NE RÉAGI PAS AUX CONDITIONS DE COUPLAGE PEPTIDIQUE. ....	47
FIGURE 49 : DIVERSIFICATION DE L'ACIDE AMINÉ DANS LES COUPLAGES PEPTIDIQUES. ....	48
FIGURE 50 : DÉPROTECTIONS FINALES DES INHIBITEURS POTENTIELS DE L'ECE TÉTRASUBSTITUÉS. ....	49
FIGURE 51 : DÉPROTECTIONS FINALES DE L'INHIBITEUR POTENTIEL DE L'ECE AVEC UN ESTER DE MÉTHYLE. .....	50
FIGURE 52 : INHIBITEURS POTENTIELS DE L'ECE SYNTHÉTISÉS. ....	51

FIGURE 53 : RÉSULTATS DES INHIBITEURS TRI-SUBSTITUÉS AVEC NAPHTHALIMIDE ET PHÉNYLALANINE. ....	53
FIGURE 54 : VÉRIFICATION DE LA NÉCESSITÉ DES GROUPES DANS LA SÉRIE TRI-SUBSTITUÉE. ....	54
FIGURE 55 : VARIATIONS SUR LA SÉRIE TRI-SUBSTITUÉE. ....	55
FIGURE 56 : RÉSULTATS DES INHIBITEURS TÉTRA-SUBSTITUÉS.....	56
FIGURE 57 : PROPOSITIONS DE TRAVAUX FUTURS .....	57

## Liste des sigles et abréviations

ACase :	Adénylylcyclase
ADN :	Acides déoxyribonucléiques
Boc :	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
BR :	Basse résolution
CCM :	Chromatographie sur couche mince
cAMP :	Adénosine monophosphate cyclique
cGMP :	Guanosine monophosphate cyclique
DAG :	Diacylglycérol
DCM :	Dichlorométhane
DMAP :	4-Diméthylaminopyridine
DMF :	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
ECA :	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ECE :	Enzyme de conversion de l'endothéline / EC3.4.24.71
EDCI :	Iodure de 1-(3-triméthylammoniopropyl)-3-éthylcarbodiimide
ET :	Endothéline
EtOAc :	Acétate d'éthyle
GCase :	Guanylylcyclase
GDP :	Guanosine diphosphate
GTP :	Guanosine triphosphate
HOBt :	1-hydroxybenzotriazole
HPLC :	Chromatographie liquide haute performance
HR :	Haute résolution
IP <sub>3</sub> :	Inositol 1,4,5-triphosphate
IR :	Infra-rouge
LiHMDS :	bis(triméthylsilyl)amidure de lithium
MLCK :	Myosin light chain kinase
NEP :	Néprilysine / endopeptidase neutre 24.11 / enképhalinase / EC3.4.24.11
NOESY :	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

NOS :	Oxyde nitrique synthase
PA :	Acide phosphatidique
PG :	Prostaglandines
PIP <sub>2</sub> :	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PKC :	Protéine kinase C
PLA <sub>2</sub> :	Phospholipase A2
PLC :	Phospholipase C
PLD :	Phospholipase D
PNA :	Peptide natriurétique atrial
RMN :	Résonance magnétique nucléaire
SM :	Spectrométrie de masse
TBAF :	Fluorure de tétrabutylammmonium
TBDPS :	<i>tert</i> -butyldiphénylesilyl
THF :	Tétrahydrofurane
TMS :	Triméthylesilyl
TsCl :	Chlorure de l'acide 4-méthylbenzènesulfonique
TXA <sub>2</sub> :	Thromboxanes
UV :	Ultra-violet

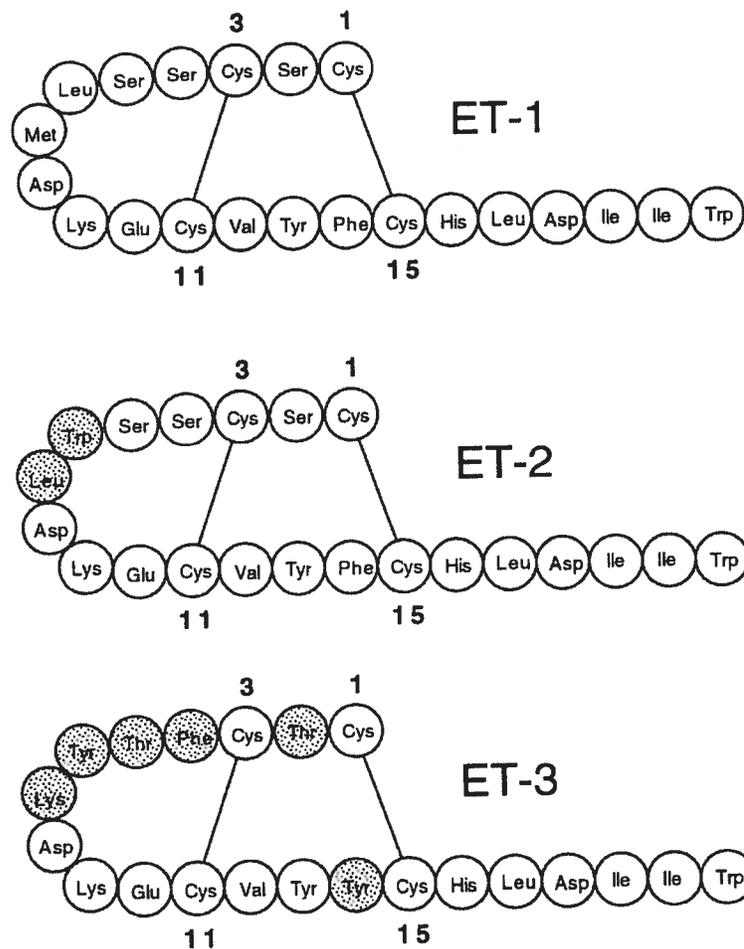
# Chapitre 1 Les enzymes de conversion de l'endothéline

## ***Les endothélines et leurs enzymes de conversion (ECE)***

### **Historique**

La première fois où l'endothélium fut reconnu capable d'améliorer la contraction des cellules vasculaires lisses remonte au début des années 1980. Les contractions de languettes d'artères pulmonaires de porcs induites par hypoxie sont plus importantes en présence d'endothélium<sup>1</sup>. Plus tard en 1988, Yanagisawa *et al.* élucident la séquence d'un peptide issu du milieu de culture de cellules endothéliales<sup>2</sup>. Cette nouvelle suscite beaucoup d'intérêt et d'excitation dans la communauté scientifique pour plusieurs raisons. Premièrement, le peptide, nommé endothéline-1, fut rapporté comme le plus puissant vasoconstricteur identifié. Deuxièmement, il fut conclut que le peptide est un produit du clivage protéolytique d'un propeptide nommé *big endothelin*. Des chercheurs virent rapidement la possibilité de contrôler la pression artérielle en inhibant cette enzyme, l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE), d'une façon similaire à ce qui se fait avec les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA). Le clivage effectué par cette enzyme (ECE), entre un Trp et un Val, étant jusqu'à lors décrit comme inconnu et inusuel, beaucoup d'espoirs furent fondés sur la spécificité d'un tel mécanisme.

Le peptide original découvert dans le milieu de culture de cellules endothéliales est maintenant connu comme étant l'un d'une famille de 3 isopeptides encodés dans le génome des mammifères<sup>3</sup>. Ils sont caractérisés par une chaîne singulière de 21 acides aminés contenant 2 ponts disulphures qui divisent la structure en 2 cycles duquelle une queue C-terminale plus flexible s'étend. Les acides aminés différents sont identifiés en gris (figure 1).



**Figure 1 : La séquence primaire des endothélines (ET-1, 2 et 3) montrant les positions des ponts disulfures ainsi que les résidus qui diffèrent de l'endothéline-1 (gris).**

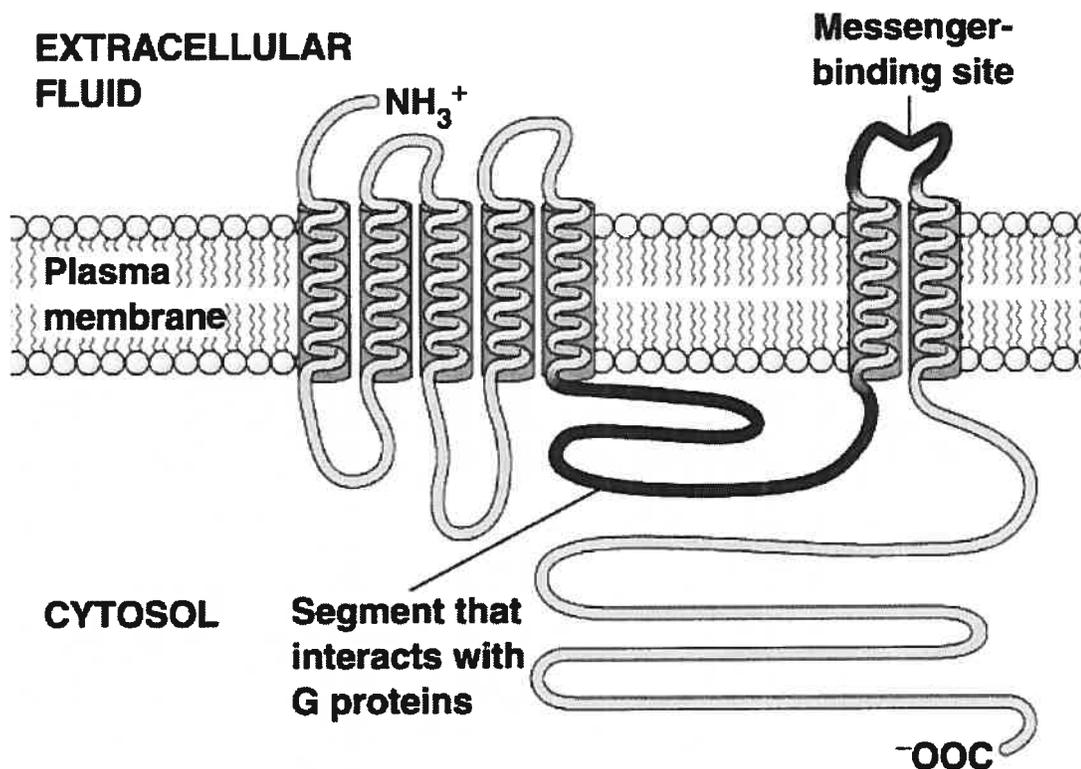
Huggins, J. P. et al. *Pharmacology and therapeutics* 1993, 59, 57.

## Transduction du signal

Beaucoup de chercheurs ont étudiées les mécanismes par lesquels les endothélines, en interagissant avec leurs récepteurs correspondants, causent des changements cellulaires par l'entremise de systèmes de seconds messagers intracellulaires ou au travers de la membrane par la modulation de courants ioniques.



membrane) et une partie intracellulaire liée à la protéine G (figure 3). Cette dernière assure le transfert et l'amplification du signal reçu par le récepteur. Les protéines G sont hétérotrimériques puisque constituées de 3 sous-unités différentes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Ces 2 dernières forment elles-mêmes un complexe hétérodimérique et la sous-unité  $\alpha$ , qui est la mieux connue, se dissocie après stimulation du récepteur pour aller moduler une enzyme qui produira un second messenger chimique.



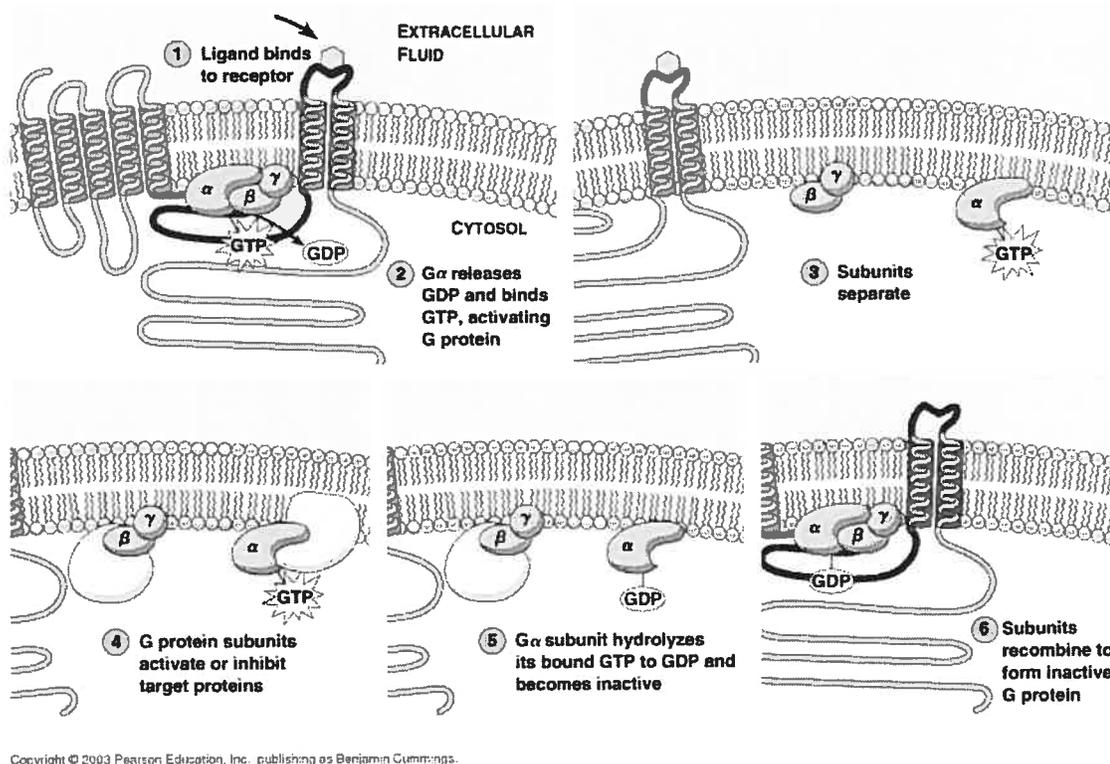
©Addison Wesley Longman, Inc.

Figure 3 : Représentation d'un récepteur transmembranaire couplé à une protéine G.

<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CellBiol10/1003.jpg>

La protéine G est nommée ainsi parce que son activité nécessite la présence de guanosine diphosphate. La sous-unité  $\alpha$  comporte une guanosine diphosphate ( $\alpha$ -GDP) et est liée aux sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  à l'état non actif. Lorsqu'il y a activation du récepteur, l' $\alpha$ -GDP est phosphorylée et devient l' $\alpha$ -GTP puis se sépare des sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$ . L' $\alpha$ -

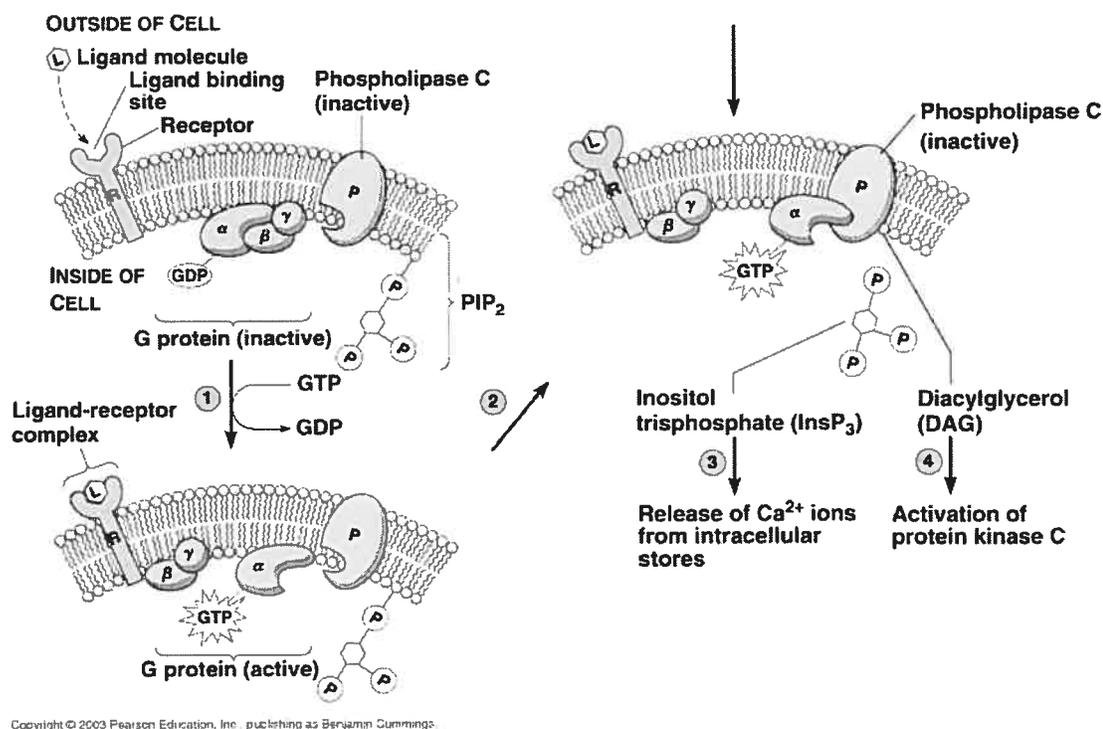
GTP module ensuite l'activité d'une enzyme. Dans le cas des récepteurs de l'endothéline, la protéine G liée est principalement de type G<sub>p</sub> ce qui signifie que l'enzyme modulée est la phospholipase C, encore appelée phospho-inositidase<sup>10</sup>. Par la suite, une autre enzyme présente dans la cellule, la GTPase, déphosphoryle l' $\alpha$ -GTP qui redevient l' $\alpha$ -GDP et se réassocie au complexe  $\beta$  et  $\gamma$  reformant la protéine G sous forme inactive (figure 4).



**Figure 4 : Modèle de fonctionnement des récepteurs couplés aux protéines G.**

<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CellBiol10/1004.jpg>

La protéine G<sub>p</sub> active donc la phospholipase C (PLC) qui, elle, transforme le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP<sub>2</sub>) membranaire en diacylglycérol (DAG) et en inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>), 2 seconds messagers intracellulaires<sup>11</sup> (figures 5 et 6).



**Figure 5 : Modèle de transduction du signal de l'endothéline : Production de seconds messagers intracellulaires.**

[http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CellBiol10/1009\\_1.jpg](http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CellBiol10/1009_1.jpg)

Le diacylglycérol (DAG) reste en contact avec la membrane grâce à ces 2 queues hydrophobes et active la protéine kinase C (PKC), une autre enzyme membranaire. Cette dernière phosphoryle un certain nombre de substrats<sup>12</sup> en présence de Ca<sup>2+</sup>. Les protéines kinases régulent la synthèse et la libération des médiateurs, la sensibilité des récepteurs et l'ouverture des canaux ioniques en phosphorylant des récepteurs membranaires ou des protéines cytoplasmiques intervenant dans les voies de signalisation de la transcription des gènes.

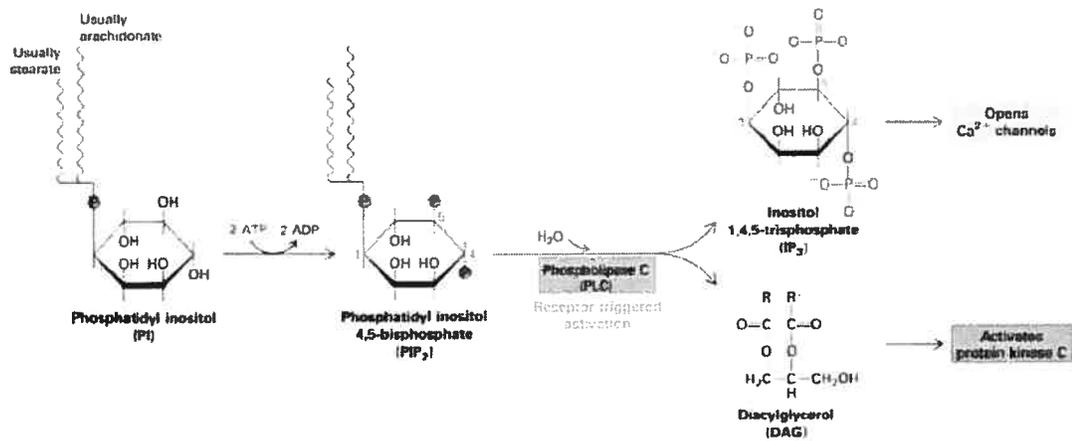


Figure 13-35, page 344  
 Stryer *Biochemistry*, Fourth Edition  
 © 1995 by W. H. Freeman and Company

T-82

Set II

### Figure 6 : Mécanisme de l'hydrolyse du IP<sub>3</sub> par phospholipase C (PLC).

<http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/signaltrans/Plcycle.gif>

L'inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) diffuse dans le cytoplasme et active un récepteur-canal homotétramérique du réticulum endoplasmique qui s'ouvre et laisse passer des ions Ca<sup>2+</sup> dans le cytoplasme<sup>13</sup>. L'augmentation de la concentration en ions Ca<sup>2+</sup> au sein de la cellule déclenche un certain nombre de processus calcium dépendants. La calmoduline, activée par le calcium, active un très grand nombre d'enzymes dépendamment du type de cellules impliquées. Dans le cas d'une cellule endothéliale, la plus importante est la MLCK (*myosin light chain kinase*) qui phosphoryle la myosine. La myosine phosphorylée est reconnue pour se lier à l'actine qui, ainsi liée, engendre une vasoconstriction des cellules vasculaires lisses (figure 7).

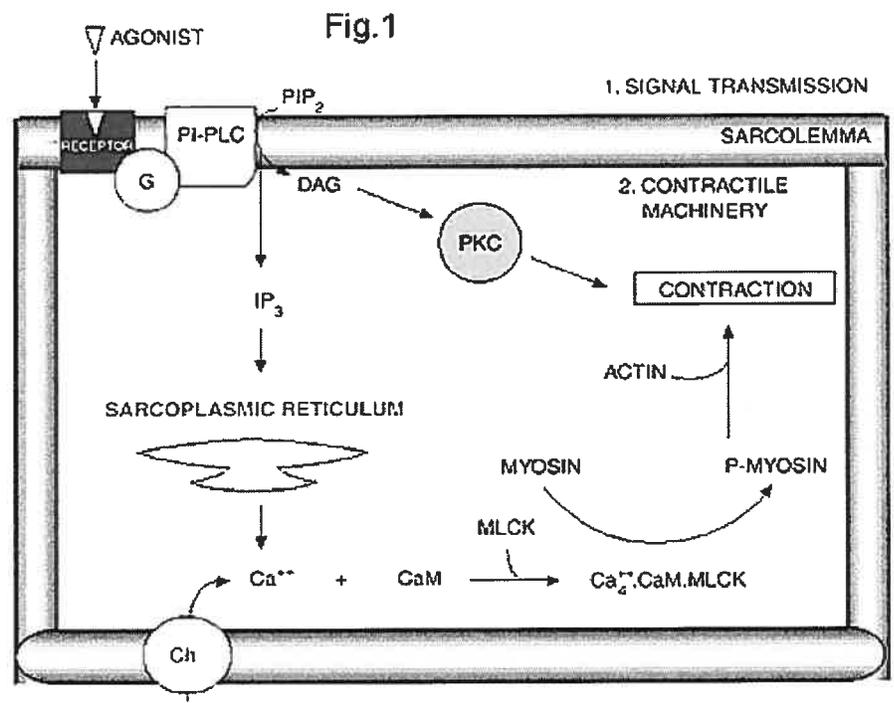


Figure 7 : Rôle de la phospholipase C (PLC) : effet vasoconstricteur de l'endothéline.

[http://www.gastrokorea.org/html/mon\\_fig/m03\\_o1.gif](http://www.gastrokorea.org/html/mon_fig/m03_o1.gif)

La calmoduline activée active aussi la NO synthase (NOS) qui produit de l'oxyde nitrique. L'oxyde nitrique active ensuite la guanylylcyclase (GCase) de la même cellule ou d'une cellule avoisinante, ce qui conduit à une augmentation de la GMP cyclique (cGMP)<sup>14</sup>. La cGMP active finalement la protéine kinase G qui provoque une relaxation des vaisseaux sanguins. Il y a donc un phénomène d'auto-régulation dans la cascade enzymatique engendrée par l'endothéline.

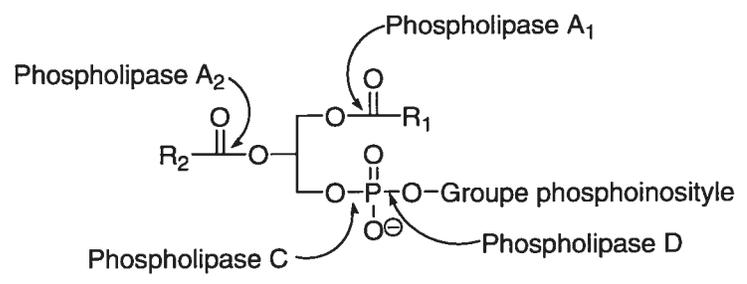


Figure 8 : Une phospholipase est nommée selon le lien clivé sur un glycérophospholipide.

<http://homepages.strath.ac.uk/~dfs99109/BB329/lipidcleavage.gif>

L'activation d'autres protéines G par les endothélines<sup>15</sup> peut aussi : activer la phospholipase D (PLD) (figure 8), donnant de l'acide phosphatidique (PA) et subséquemment du DAG<sup>16</sup>; activer la phospholipase A2 (PLA<sub>2</sub>), donnant de l'arachidonate et subséquemment des thromboxanes (TXA<sub>2</sub>) ou des prostaglandines (PG)<sup>17</sup>; activer ou inhiber l'adénylylcyclase (ACase), régulant du fait l'AMP cyclique (cAMP)<sup>18</sup>; ou réguler l'ouverture des canaux au potassium (K<sup>+</sup>)<sup>19</sup>. L'endothéline est même possiblement impliquée dans les mécanismes du système nerveux central<sup>20</sup> (figure 9).

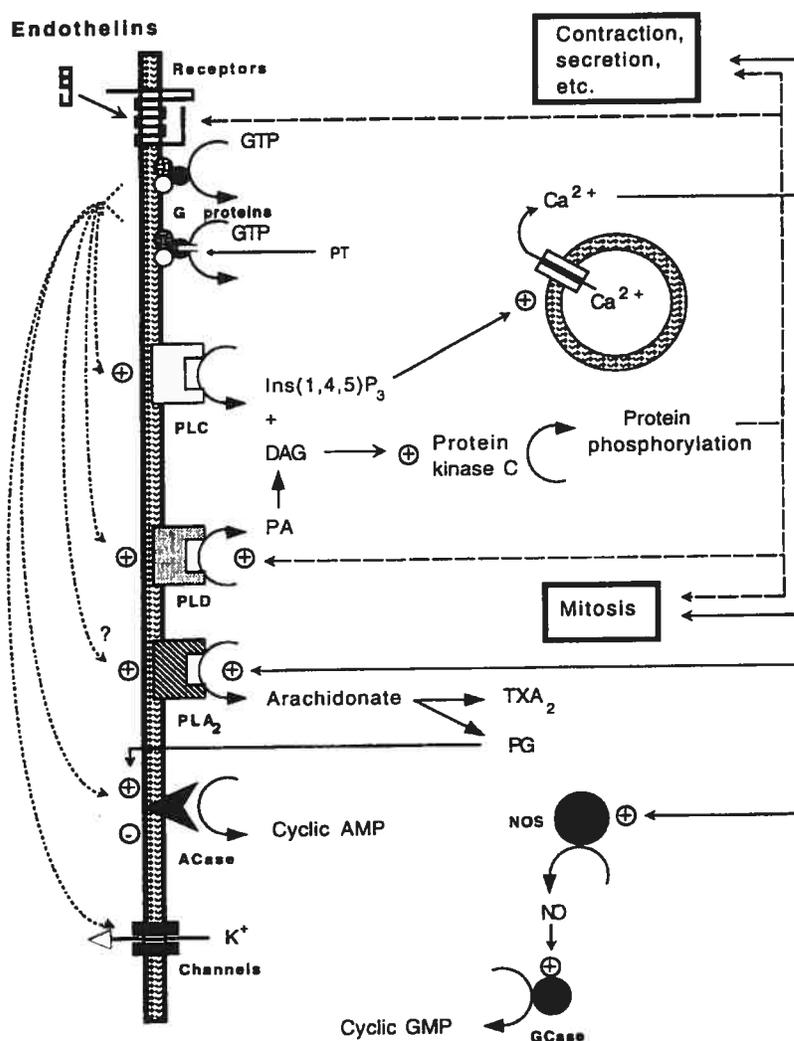


Figure 9 : Schéma généralisé de la transduction du signal des endothélines.

Huggins, J. P. et al. *Pharmacology and therapeutics* 1993, 59, 71.

## Implications médicales

Les endothélines contractent tous les types de cellules musculaires lisses par l'activation de récepteurs spécifiques et peuvent aussi en relaxer certaines, soit directement par l'activation de récepteurs, soit indirectement en relâchant des facteurs de l'endothélium ou de l'épithélium. Les implications médicales sont donc nombreuses : régulation de la pression sanguine<sup>21</sup>, traitements post-ischémiques<sup>22</sup>, traitement de la dépression<sup>23</sup>, d'hémorragies subarachnoïdes<sup>24</sup>, de lésions gastriques<sup>25</sup>, d'inflammations<sup>26</sup>, de maladies pulmonaires<sup>27</sup>, de tumeurs<sup>28</sup> et de toxicité reliée à la cyclosporine<sup>29</sup>. D'après les études menées dans le domaine de ces peptides endogènes, d'importantes applications médicales possibles pour des agonistes et des antagonistes des endothélines peuvent être proposées.

## L'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE)

L'analyse des séquences d'ADN codant pour les endothélines a révélé que l'endothéline est produite à partir d'un précurseur nommé préproendothéline (212 acides aminés) (figure 10). Après excision de son peptide signal par une peptidase signal, le précurseur est sélectivement clivé par une furine convertase pour donner un intermédiaire biologiquement inactif de 38 acides aminés appelé *big-endothelin* (big-ET). Big-ET est ensuite clivé, par hydrolyse spécifique du lien peptidique entre Trp<sup>21</sup>-Val<sup>22</sup>, en endothéline active par l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE)<sup>30</sup>. L'identification de cette enzyme a été une tâche difficile à cause de la faible quantité contenue dans les cellules et les tissus. Puis, le phosphoramidon, un inhibiteur de métallopeptidases, a été reconnu pour inhiber la formation d'ET-1 à partir de big-ET-1. Par la suite, cette protéase membranaire sensible à l'action du phosphoramidon a été purifiée à partir de cellules endothéliales, de cellules pulmonaires et de glandes adrénales et finalement clonée simultanément par 3 groupes de recherche<sup>31</sup>. Cette



l'opposé, ECE-1b est situé intracellulairement, près des réseaux trans-Golgi. ECE-1c et ECE-1d sont situés à la surface de la cellule et pourrait agir comme ectoenzymes. Les 4 isoformes de l'ECE-1 proviennent du même gène, par épissage alternatif, et ne diffèrent que dans la composition en acides aminés de leur région cytoplasmique ou transmembranaire, soit loin du site actif de l'enzyme. Les 4 ectodomaines sont identiques. Le précurseur de l'ET-1, qui est synthétisé dans les cellules endothéliales, pourrait être contenu dans des vésicules de sécrétion et constamment sécrété hors de la cellule. Sa transformation s'effectuerait durant le transport vésiculaire. La prépondérance de ECE-1 dans la biosynthèse de ET-1 a été confirmée par l'observation que des souris auxquelles le gène codant ECE-1 a été enlevé présentent les mêmes anomalies craniofaciales et cardiaques que les souris auxquelles le gène codant ET-1 ou encore codant le récepteur ET<sub>A</sub> a été enlevé<sup>34</sup>. En 1995, un autre isoforme nommé ECE-2 a été identifié<sup>35</sup>. La différence principale est que ECE-2 agit optimalement à un pH plus acide que ECE-1, soit 5.6 comparativement à 6.8. Les deux enzymes produisent de l'ET-1, sont des protéines membranaires intégrales de type II et font partie de la famille M13 des endopeptidases. Elles comportent une courte queue cytoplasmique N-terminale, suivie d'une région transmembranaire et terminent par un grand domaine extracellulaire contenant un atome de zinc essentiel à l'activité enzymatique. Il se pourrait qu'il y ait encore d'autres isoformes non découverts puisque de hauts niveaux de ET-1 ont été relevés dans des souris ne possédant pas les gènes codant pour ECE-1 et ECE-2<sup>36</sup>.

En 1998, un autre isoforme nommée ECE-3 est découvert<sup>37</sup>. Ce dernier serait plus sélectif envers l'ET-3. Cependant, l'enzyme isolé n'est pas d'une pureté exceptionnelle et l'activité enzymatique pourrait provenir d'impuretés tel que l'ECE-1. Aussi, l'enzyme n'est pas encore séquencé ni cloné. Il apparaît que cet enzyme n'est pas entièrement accepté par la communauté scientifique. En 1999, un autre isoforme de l'ECE-2, soit l'ECE-2b, est dévoilé lors d'une conférence à Montréal<sup>38</sup>.

ET-2 et ET-3 sont aussi transformés à partir de leurs précurseurs respectifs (*big-ET-2* et *big-ET-3*) mais ces mécanismes sont encore indéterminés. Plusieurs banques de

composés naturels et synthétiques ont été criblés afin de dénicher des inhibiteurs de l'ECE. En fait, les études de relations structure-activité de composés prometteurs basés sur la structure d'inhibiteurs de la NEP ont abouti à la découverte de plusieurs importants inhibiteurs sélectifs à l'ECE.

### ***Les inhibiteurs de l'ECE***

Les 7 isoformes de l'ECE partagent tous une séquence d'acides aminés très similaire à l'endopeptidase neutre 24.11 (NEP), une autre métalloprotéase du zinc. En fait l'ECE-1 humaine partage 37% de séquences d'acides aminés similaires avec la NEP<sup>39</sup>. Il n'est donc pas surprenant de constater que la plupart des inhibiteurs des ECEs présentent aussi une forte activité inhibitrice pour la NEP. L'endopeptidase neutre 24.11 (NEP) a été montré comme le principal responsable de la dégradation protéolytique du peptide natriurétique atrial (PNA), un puissant agent vasodilatateur et natriurétique<sup>40</sup>. Il a aussi un rôle dans la dégradation de d'autres peptides vasoactifs tel la bradykinine, un autre vasorelaxant<sup>41</sup>. Il est donc facile de concevoir qu'un inhibiteur double de l'ECE (qui empêcherait la production d'ET vasoconstrictrice) et de la NEP (qui empêcherait la destruction de PNA vasodilatateur) pourrait avoir un effet de synergie ou additionner les effets bénéfiques dans le traitement de maladies cardiovasculaires ou rénales. Ce concept pourrait même être étendu à des inhibiteurs triples de l'ECE, de la NEP et de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA). Cela serait possible parce que les 3 enzymes en question sont des métalloprotéases à base de zinc dont les activités peuvent être inhibées simultanément par l'action d'un composé comportant un groupe chélateur du zinc : un acide hydroxamique, un thiol, un acide carboxylique ou encore une fonctionnalité contenant un atome de phosphore (phosphoramidate, phosphonamide, acide phosphinique ou acide aminophosphonique)<sup>42</sup> (figure 11). Jusqu'à ce jour, 3 classes d'inhibiteurs ont été synthétisées : les inhibiteurs doubles de l'ECE/NEP, les inhibiteurs triples de l'ECE/NEP/ECA et les inhibiteurs sélectifs à l'ECE.

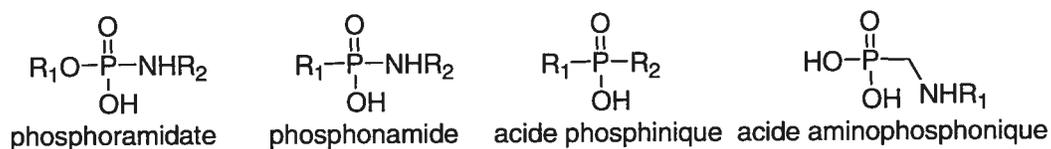


Figure 11 : Nomenclature des fonctionnalités contenant un atome de phosphore.

## Inhibiteurs sélectifs à l'ECE

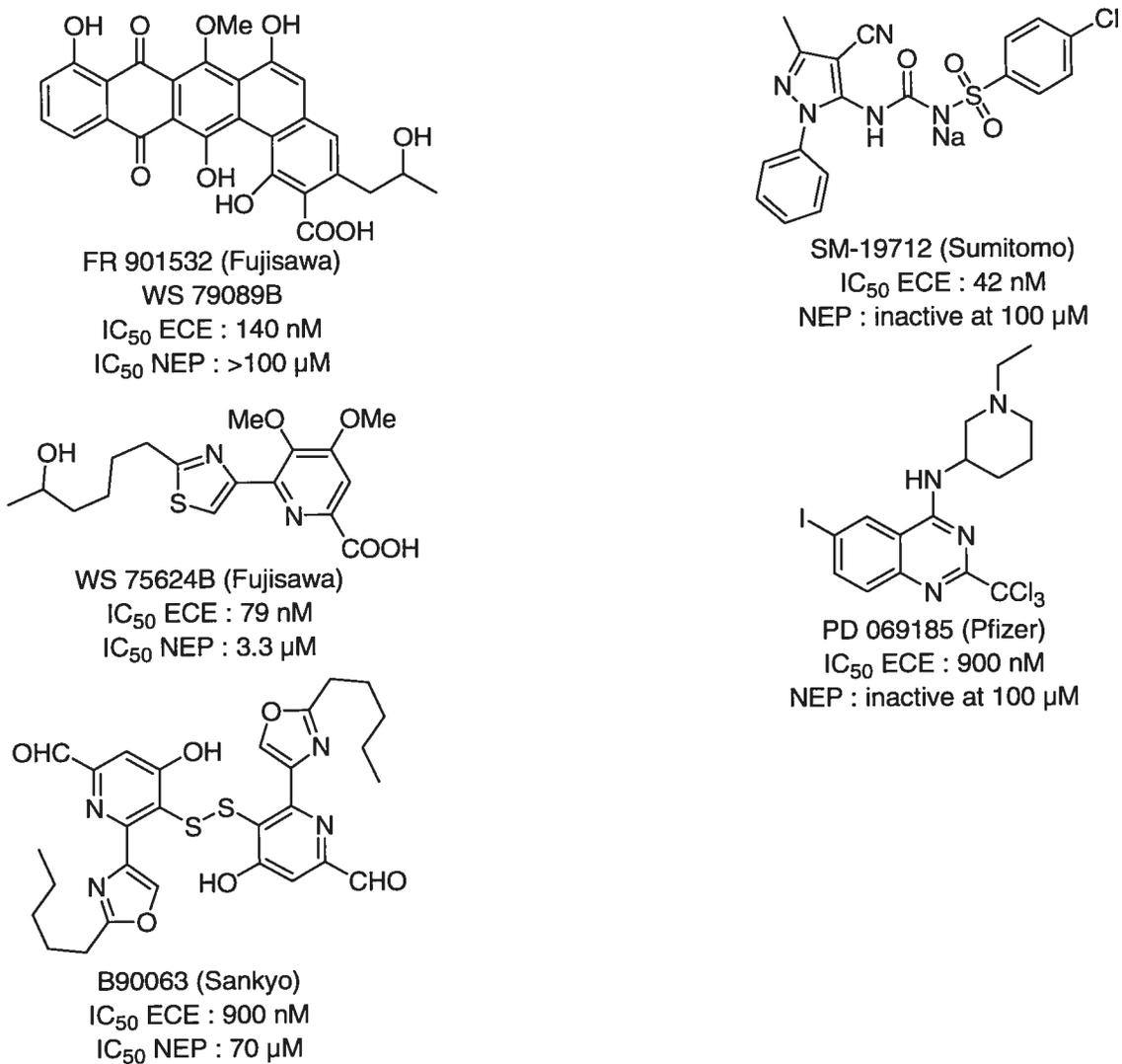


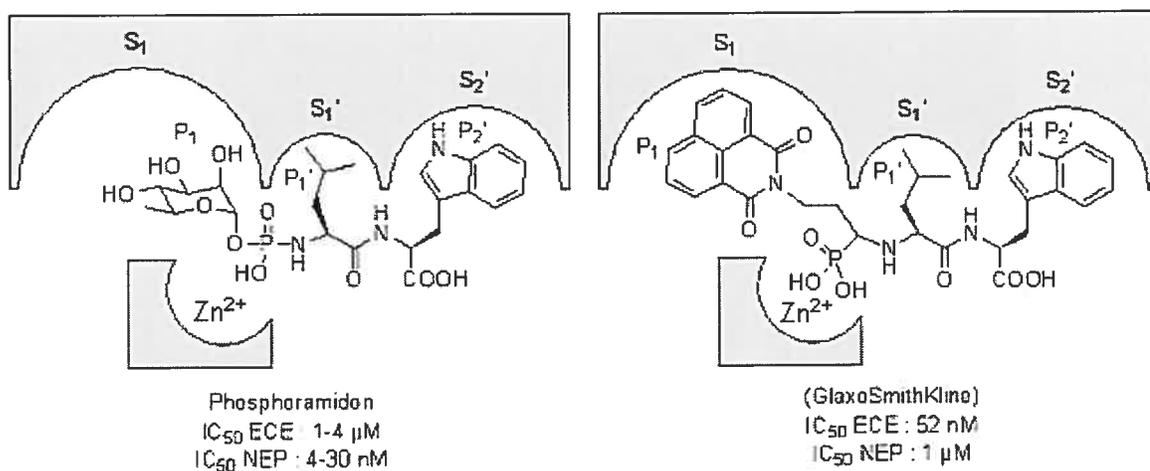
Figure 12 : Inhibiteurs sélectifs à l'ECE.

Un certain nombre d'inhibiteurs sélectifs à l'ECE ont été découverts (figure 12). Certains sont d'origine naturelle comme FR 901532, WS 75624B et B90063 qui proviennent de milieux de fermentation de *Streptosporangium roseum*, *Saccharothrix* sp. et *Blastobacter* sp., respectivement<sup>43</sup>. D'autres sont issus d'un balayage aléatoire de composés de bibliothèques de compagnies comme par exemple SM-19712 et PD 069185<sup>44</sup>. Il n'est pas clair, vu leur structure chimique, que ces inhibiteurs se lient au site actif de l'ECE. En effet, l'absence de groupe chélateur du zinc et/ou leur structure plutôt plate en rendent difficile l'étude de relations structure-activité. Leur optimisation s'en retrouve donc plus ardue et moins intéressante, sans toutefois en nier les possibilités thérapeutiques.

### **Inhibiteurs doubles de l'ECE/NEP**

Un groupe de chercheurs de chez Hoffmann-La Roche a modélisé en 3 dimensions l'ECE-1 en se basant sur la structure de la NEP résolue à partir de données cristallographiques<sup>45</sup>. Ils ont ensuite inséré le phosphoramidon dans le site actif de l'enzyme virtuelle. Comme la structure de l'ECE-1 n'est pas encore résolue et que la NEP humaine et l'ECE humaine ont une longueur similaire et partagent 40% de similarité dans leur séquence, un modèle d'une précision supérieure aux précédents peut être obtenu par cette approche. De meilleures prédictions quant aux poches du site actif peuvent être attendues et donc, de meilleures prédictions quant aux inhibiteurs seront possibles.

Une différence significative dans la séquence est le remplacement de la M603 dans le cas de la NEP pour une valine dans le cas de l'ECE. Cet acide aminé est situé juste au bas du sous-site S1'. Il en résulte donc une poche S1' plus profonde dans le cas de l'ECE. La forme et la grandeur de la poche S1' sont des facteurs critiques qui déterminent l'affinité des substrats et des inhibiteurs pour les métalloprotéases.



**Figure 13 : Emplacements des substituents du phosphoramidon et du composé de GlaxoSmithKline dans l'ECE selon la nomenclature de Schechter et Berger<sup>46</sup>.**

D'autres différences d'importance sont trouvées dans la poche S2' où le tryptophane du phosphoramidon est situé (figure 13). Avec la NEP, l'indole est complètement enrobé dans la poche S2'. Les résidus de R102, D107, R110 et N566 entourent l'indole et y sont connectés par liens hydrogènes soit directement, soit par l'intermédiaire d'une molécule d'eau. L'indole est aussi empilé sur la chaîne latérale de la F106. Cela place le tryptophane dans une position favorisant un lien hydrogène entre le tryptophane et le carbonyle de la chaîne primaire de la V565. Dans le cas de l'ECE, cette poche a une forme significativement différente puisque D107 est remplacé par une sérine et R110 par un tryptophane, ce qui donne une poche beaucoup plus ouverte. Les résidus ne sont plus connectés par liens hydrogènes et n'enveloppent alors plus aussi serré l'indole du phosphoramidon. Son inhibition réduite envers l'ECE pourrait être partiellement expliquée par la diminution de ces interactions entre l'inhibiteur et la protéine dans cette région de l'enzyme.

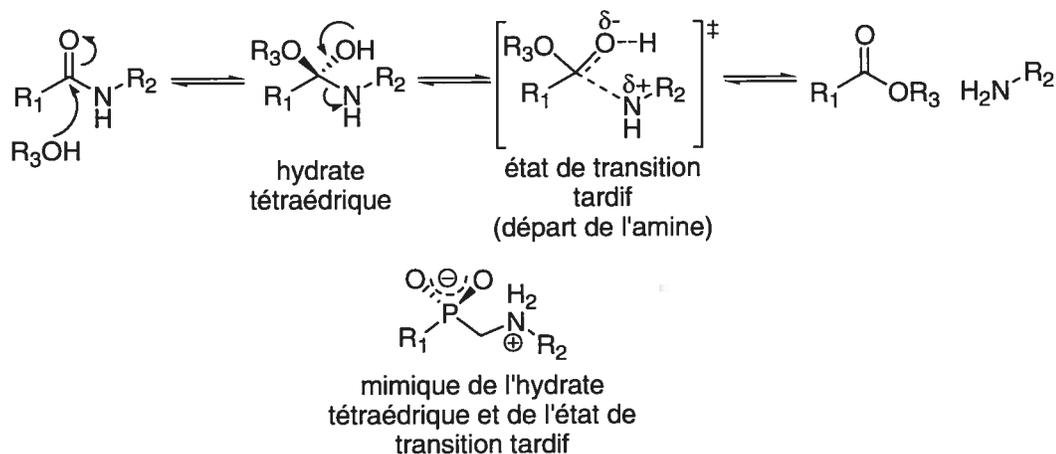


Figure 14 : un acide aminophosphonique imite l'hydrolyse d'un lien peptidique.

Le phosphoramidon a été originalement isolé de *Streptomyces tanashiensis*. Il est couramment utilisé comme référence en tant qu'inhibiteur de la NEP<sup>47</sup>. Il possède aussi une faible activité envers l'ECE. Des modifications sélectives sur le phosphoramidon permettent de suggérer qu'un groupe aliphatique d'une longueur minimale de 3 carbones à la position P1' conjointement avec un groupe indole à la position P2' sont des facteurs importants pour l'activité inhibitoire envers l'ECE<sup>48</sup>. Il n'est cependant pas oralement actif à cause de la présence d'un lien phosphore-azote labile en milieu acide, comme par exemple dans l'estomac. Pour remédier à ce problème, il est possible d'insérer un méthylène entre les deux de façon à le rendre résistant aux milieux acides. On obtient alors un acide aminophosphonique qui imite l'état de transition tardif de l'hydrolyse d'un lien peptidique<sup>49</sup>. En effet, l'hydrate tétraédrique est imité par le phosphore qui est sous une forme tétraédrique, et le départ de l'amine de l'état de transition tardif est imité par l'amine qui est éloignée par un méthylène (figure 14). Une telle stratégie de design a été utilisée avec succès dans le développement d'inhibiteurs d'autres métalloprotéases à base de zinc<sup>50</sup>.

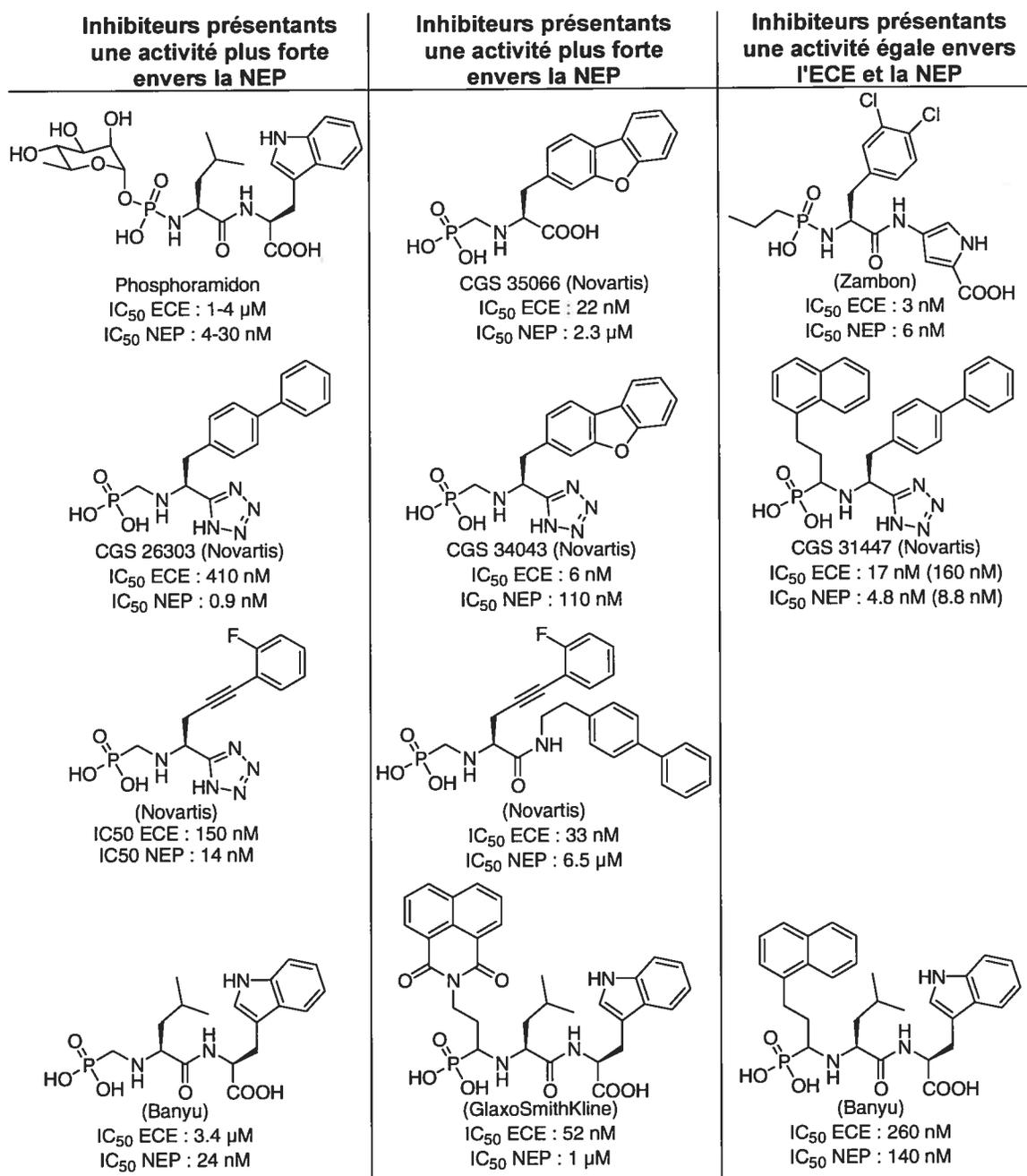


Figure 15 : Comparaison de la sélectivité entre l'ECE et la NEP<sup>48</sup>.

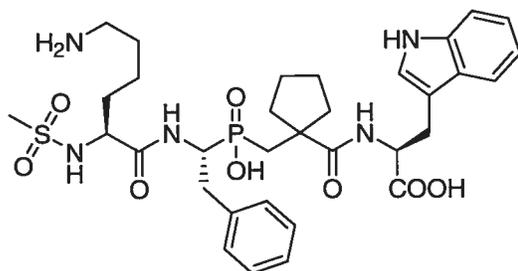
Le composé CGS 26303 est un exemple de cette stratégie<sup>51</sup> (figure 15). Fait intéressant, ce dernier est plus sélectif envers la NEP, mais si le groupe biphényle est remplacé par un dibenzofurane plus volumineux (CGS 34043), il devient plus sélectif envers l'ECE<sup>52</sup>. Cette observation est en concordance avec l'étude de modélisation citée précédemment

où il est mentionné que la poche S1' de l'ECE est plus profonde que celle de la NEP. Si le tétrazole de CGS 34043 est changé pour un acide carboxylique (CGS 35066), le composé devient alors encore plus sélectif envers l'ECE tout en conservant une certaine efficacité<sup>53</sup>. Les changements apportés depuis CGS 26303 jusqu'à CGS 35066 améliorent la sélectivité envers l'ECE de 50 000 fois. De plus, lorsque le tétrazole d'un dérivé arylacétylène de Novartis est changé pour un autre groupe (acide carboxylique, leucine, valine, ou un arylamide), la sélectivité envers l'ECE est augmentée<sup>54</sup>. Ces 2 derniers exemples sont aussi en concordance avec l'étude de modélisation où il est mentionné que la poche S2' de l'ECE est très différente de celle de la NEP. Cela suggère que de jouer avec le substituant P2' influence sur la sélectivité ECE vs NEP plutôt que sur l'activité.

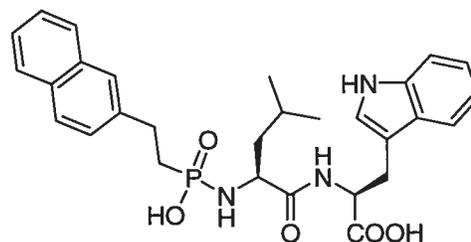
D'autres optimisations de CGS 26303 révèlent que la poche S1 est aussi fortement impliquée dans l'activité envers l'ECE. Le simple fait d'ajouter un groupe naphthyléthyl à CGS 26303 à la position P1 donne CGS 31447, l'inhibiteur double de ECE/NEP le plus puissant connu à ce jour<sup>55</sup>. Il a aussi été démontré qu'il y a une préférence stéréochimique quant à la position P1. À titre d'exemple, le diastéréoisomère de CGS 31447 est beaucoup moins puissant que ce dernier envers l'ECE ( $IC_{50} = 160$  nM). Malheureusement, la configuration absolue de ces composés n'est pas rapportée. Cette modification de CGS 26303 à la position P1 améliore la puissance inhibitrice envers l'ECE plutôt que sa sélectivité. Toutefois, la même modification effectuée sur l'acide aminophosphonique dipeptidique de Banyu améliore la sélectivité plutôt que la puissance inhibitrice<sup>56</sup>. De plus, si le groupe inséré en P1 est encore plus hydrophobique, tel un 1,8-naphthalimide (GlaxoSmithKline), il en résulte non seulement une amélioration de l'activité inhibitrice envers l'ECE mais aussi une diminution envers la NEP. La sélectivité envers l'ECE de ce dernier est alors environ de 600 fois supérieure à celle du phosphoramidon<sup>57</sup>. La configuration absolue de ces composés semble importante aussi dans cette série, mais n'a pas été déterminée.

D'autres composés comme celui développé par Zambon présentent une forte activité envers les 2 enzymes<sup>58</sup>.

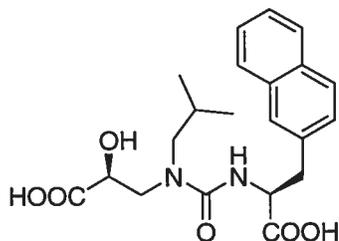
## Inhibiteurs triples de l'ECE/NEP/ECA



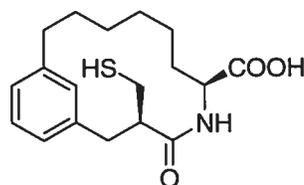
SCH 54470 (Schering)  
 $IC_{50}$  ECE : 70 nM  
 $IC_{50}$  NEP : 90 nM  
 $IC_{50}$  ECA : 2.5 nM



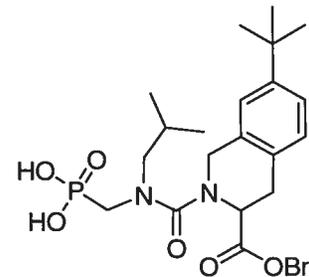
(Takeda)  
 $IC_{50}$  ECE : 550 nM  
 $IC_{50}$  NEP : 20 nM  
 $IC_{50}$  ECA : 380 nM



SA-6817 (Santen)  
 $IC_{50}$  : 910 nM  
 $K_i$  NEP : 4.4 nM  
 $K_i$  ECA : 15 nM



CGS 26582 (Novartis)  
 $IC_{50}$  ECE : 620 nM  
 $IC_{50}$  NEP : 4 nM  
 $IC_{50}$  ECA : 175 nM



(Wakamoto)  
 $IC_{50}$  ECE : 6  $\mu$ M  
 $IC_{50}$  NEP : 300 nM  
 $IC_{50}$  ECA : 500 nM

**Figure 16 : Exemples d'inhibiteurs triples de l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE), de l'endopeptidase neutre 24.11 (ENP) et de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA).**

Les acides phosphiniques ont aussi été évalués comme inhibiteurs potentiels de l'ECE, partiellement à cause de leur stabilité chimique supérieure comparée aux phosphonamides. La plupart possèdent des substituants  $P_1$  et  $P_2$  en plus des groupes  $P_1'$  et  $P_2'$  habituels aux phosphoramidates et aux phosphonamides. Le poids moléculaire de ces acides phosphiniques est donc de beaucoup supérieurs aux autres séries, ce qui n'est pas recherché dans le développement de drogues. SCH 54470, un acide phosphinique, est le plus puissant inhibiteur triple à ce jour<sup>59</sup> (figure 16). Les phosphonamides sont chimiquement labiles, particulièrement en milieu acide, ce qui limite leur valeur

thérapeutique. En général, ils sont plus puissants en tant qu'inhibiteurs ECE que leurs homologues phosphoramidates. Le composé de Takeda est plus puissant que le phosphoramidon comme inhibiteur de l'ECE<sup>60</sup>. L'atome d'azote de la leucine de cette série de composé est nécessaire puisque toute activité est perdue s'il est remplacé par un carbone ou un oxygène<sup>61</sup>. Les inhibiteurs de métalloprotéases à base d'acide carboxylique sont bien connus. Toutefois, aucun composé de cette série n'est plus puissant que le phosphoramidon et aucune expérience *in vivo* n'a été rapportée. SA-6817 est un exemple d'inhibiteur triple de cette série<sup>62</sup>. Les thiols inhibiteurs de l'ECE ne présentent que des activités égales ou inférieures au phosphoramidon. Aucun de ces composés ne montre d'activité supérieur au phosphoramidon *in vivo* probablement à cause d'un métabolisme rapide. CGS 26582 est un thiolactame macrocyclique présentant une activité triple<sup>63</sup>. D'autres inhibiteurs triples ont été synthétisés mais ils sont pour la plupart de puissants inhibiteurs de la NEP, mais de faibles inhibiteurs de l'ECE.

## Chapitre 2 Conception et synthèse d'inhibiteurs de l'ECE

### **Objectifs**

L'objectif de cette étude est d'acquérir plus d'informations sur le site actif de l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE). Pour ce faire, différents analogues seront synthétisés. Comme aucune donnée cristallographique de l'ECE n'est disponible, les seules informations accessibles pour le moment proviennent des composés actifs connus. Ces derniers étant pour la plupart linéaires, donc ayant plusieurs possibilités de conformations actives, les informations utiles en découlant sont plutôt limitées. L'étude devra s'inspirer d'un composé actif déjà connu. Le candidat idéal sera un inhibiteur peptidomimétique puissant et sélectif.

### **Conception initiale**

La série synthétisée sera basée sur le composé de GlaxoSmithKline puisque celui-ci présente une inhibition très sélective envers l'ECE contre la NEP. La clé de cette conception réside dans la diminution du degré de liberté conformationnelle du composé de GlaxoSmithKline en le rigidifiant, c'est-à-dire en faisant un analogue cyclique (figure 17). De cette façon, la molécule aura une conformation plus fixe, ce qui permettra de tirer des conclusions quant à la conformation active de façon plus pertinente. La synthèse d'analogues de stéréochimie différente permettra de tirer plus d'informations quant à l'emplacement dans l'espace des différentes poches du site actif. Il est donc important d'obtenir le plus de diastéréoisomères possible en limitant la diastéréosélectivité des réactions prévues. Les modifications de la longueur de la chaîne de carbone attachant chaque substituants donneront des indices sur la profondeur de ces

poches. Finalement, la diversification des différents substituants fournira de l'information quant à la nature de ces poches.

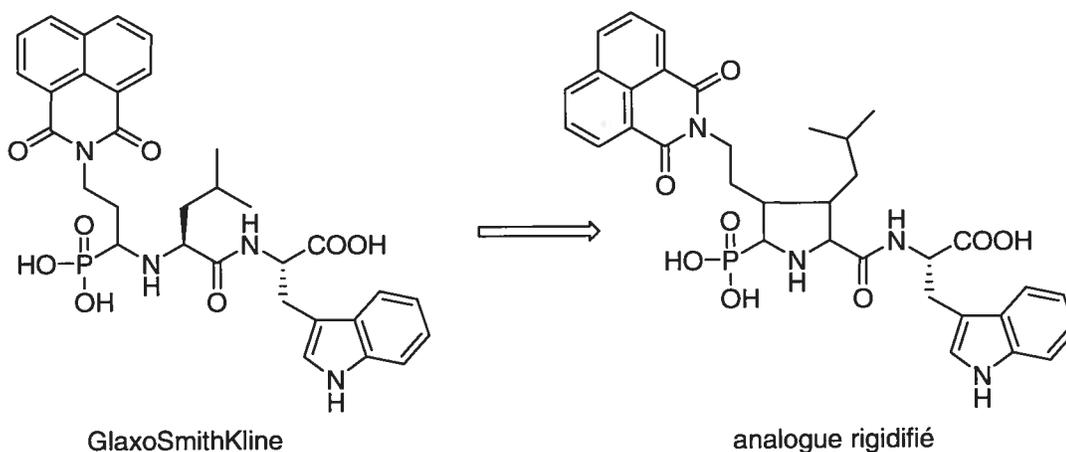


Figure 17 : Cyclisation d'un inhibiteur de l'ECE comme moyen de rigidifier la structure.

L'acide phosphonique sera le groupe chélateur du zinc utilisé. La queue hydrophobe sera un 1,8-naphthalimide monté sur une chaîne de 2 carbones. Certains analogues comporteront un isobutyle, d'autres non afin d'en mesurer la nécessité. L'acide aminé sera une phénylalanine, une homophénylalanine ou un tryptophane afin de déterminer l'effet de la nature de l'acide aminé et de la longueur de la chaîne.

D'autres analogues ont été synthétisés par le Dr Philippe Nakache et la Dr Cécile Gauchet<sup>64</sup> au cours de cette même étude. Ils ont essayé d'autres chélateurs du zinc et d'autres substituants hydrophobes montés sur différentes longueurs de chaînes de carbone.

## Rétrosynthèse

Les composés cibles sont constitués d'un cœur cyclique à 5 membres, dont un azote, soit une pyrrolidine (figure 18). Chaque carbone sur la pyrrolidine pourrait être substitué. Le premier carbone (C-2) est substitué par un acide aminé. Un couplage

peptidique permettrait d'introduire l'acide aminé sur l'acide correspondant, soit la proline. Les acides aminés sont une source de chiralité peu coûteuse. Une synthèse partant d'un acide aminé énantiomériquement pur permettrait de fixer un des centres stéréogéniques dès le départ et ainsi d'effectuer une synthèse énantiosélective. Il faut ajouter d'autres groupes fonctionnels sur la proline afin d'introduire les substituants en C-3, C-4 et C-5. L'ajout d'un oxygène en C-5 formerait un lactame commercialement disponible : l'acide pyroglutamique. Il serait alors possible d'introduire un substituant en C-4 en alkylant l'énolate de lithium de l'acide pyroglutamique. Inclure un substituant en C-3 est aussi envisageable par une addition 1,4 si le lactame  $\alpha,\beta$ -insaturé est préalablement formé. Le substituant en C-5 pourrait être inséré en passant par l'ion N-acyliminium. C'est pourquoi l'azote de la pyrrolidine devra être protégé en le transformant en carbamate (ex. : Boc).

Les substituants insérés ne sont pas nécessairement les substituants finaux. En effet, puisque le but de cette étude est de varier les substituants afin d'en déterminer l'effet sur l'activité biologique, il est préférable d'introduire des substituants fonctionnalisés qui pourront à leur tour être transformés. Cela évite de devoir recommencer la synthèse du début pour simplement changer la nature d'un substituant. De cette façon, des intermédiaires synthétiques avancés, dont la configuration est fixée, pourront être conservés pour usage ultérieur. Le substituant en C-4, par exemple, sera un allyle qui pourrait être clivé par ozonolyse réductrice et le tosylate de l'alcool obtenu pourrait être déplacé par divers nucléophiles (ex. : 1,8-naphthalimide).

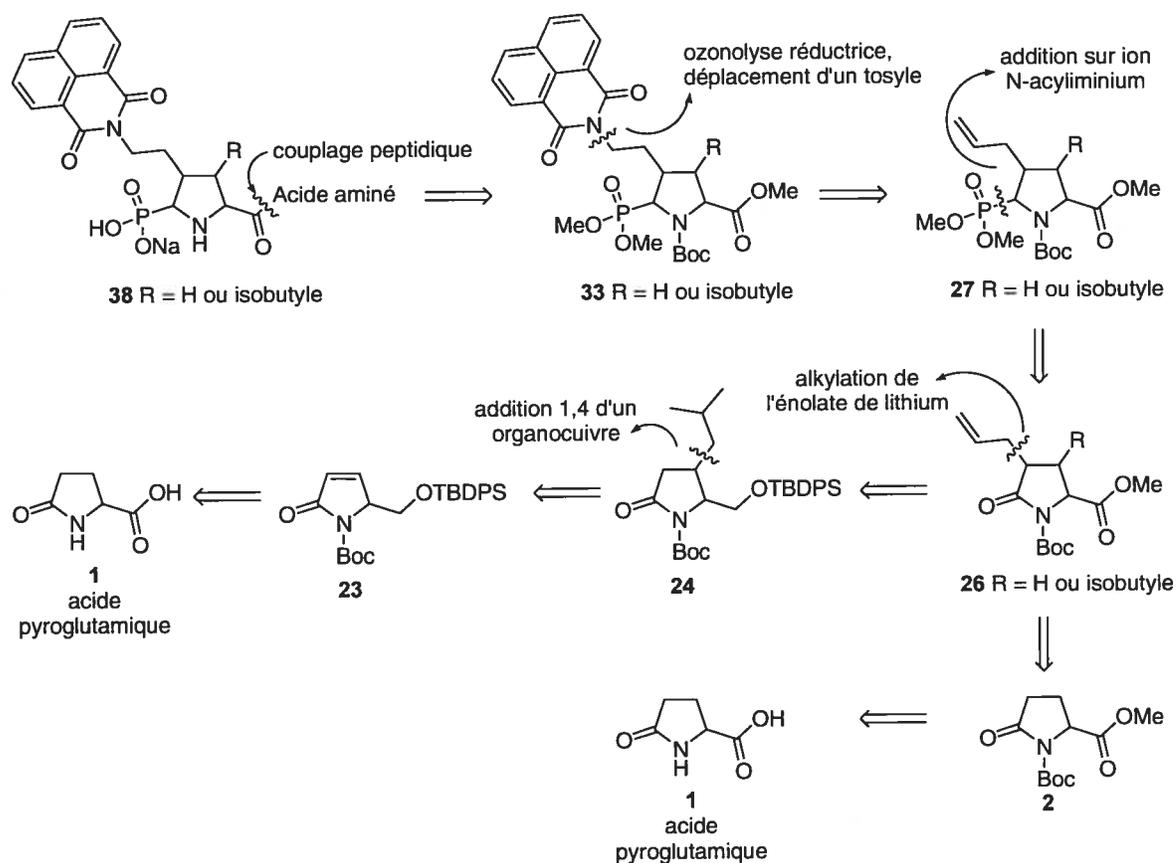


Figure 18 : Analyse rétrosynthétique des inhibiteurs cibles.

### Synthèse des analogues trisubstitués

L'acide (*R*)-(+)-pyroglutamique (1) est utilisé comme produit de départ. Il provient de la compagnie Lancaster en bouteilles de 25 g. Il s'agit de la forme non-naturelle de l'acide pyroglutamique. Dans le but d'atteindre le plus de molécules cibles possible, la même synthèse, partant de l'acide (*S*)-(-)-pyroglutamique, a été effectuée par la Dr Cécile Gauchet et est rapportée dans sa thèse<sup>64</sup>. Le premier centre stéréogénique étant déjà fixé, cela permet une synthèse énantiosélective. L'acide (1) en solution dans le méthanol est traité avec le chlorure de thionyle pour obtenir l'ester méthylique correspondant sous la forme d'une huile jaune (figure 19). Cette dernière est utilisée telle quelle sans purification subséquente. Elle est dissoute dans l'acétonitrile avec une quantité

stoechiométrique d'anhydride dicarboxylique et de triéthylamine ainsi qu'une quantité catalytique de 4-diméthylaminopyridine. Les premières transformations effectuées fournissent, avec un bon rendement, l'acide (*R*)-(+)-pyroglutamique (**2**) sous forme protégée<sup>65</sup>.

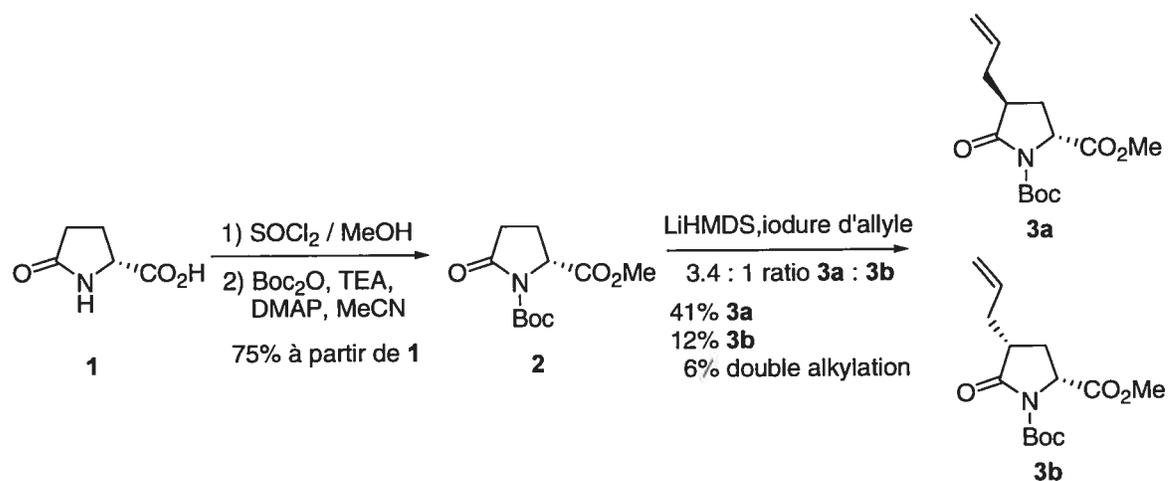


Figure 19 : Protection puis alkylation de l'acide pyroglutamique.

Le lactame protégé par un groupe électroattracteur peut alors être alkylé, en formant l'énolate de lithium à basse température, par un halogénure d'alkyle activé puisque le carbonyle a maintenant une réactivité se rapprochant d'une cétone<sup>66</sup>. Dans ce cas-ci, l'hexaméthylsilylamidure de lithium fait office de base forte et l'iodure d'allyle d'halogénure d'alkyle activé. Un mélange de diastéréoisomères séparables par chromatographie est obtenu dans un rendement modeste avec un ratio de 3.4 : 1 en faveur du composé *trans* (**3a**) à cause de l'encombrement stérique de l'ester de méthyle. La stéréochimie relative est assignée par RMN NOESY (figure 20). Il est à noter qu'un excès de base conduit à une augmentation de double alkylation. De plus, une grande sélectivité n'est pas souhaitée dans la présente étude puisque le but est d'avoir accès à tous les diastéréoisomères possibles.

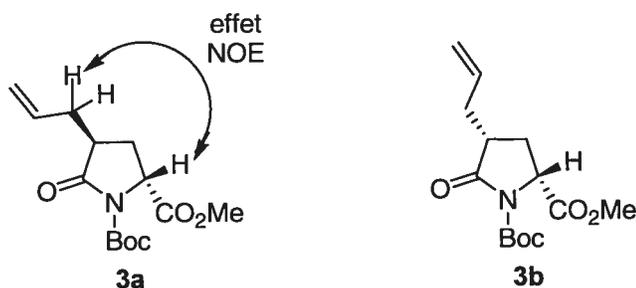


Figure 20 : Détermination de la stéréochimie par observation de l'effet NOE indiqué par la double flèche.

Si le composé *trans* est désiré, un ester et un halogénure d'alkyle plus volumineux devraient être utilisés. L'encombrement stérique supérieur augmentera de beaucoup la diastéréosélectivité (table 1).

Structure			
Diastéréosélectivité ( <i>trans/cis</i> )	2.9 : 1	4.7 : 1	10 : 1

Table 1 : Diastéréosélectivité de l'alkylation selon la nature des substituants de dérivés de l'acide pyroglutamique.

Par contre, si le composé *cis* est voulu, une aldolisation avec l'aldéhyde correspondant, en présence de trifluorure de bore étheré, suivi d'une élimination de l'alcool obtenu puis d'une hydrogénation en présence d'une quantité catalytique d'oxyde de platine(IV) donnera exclusivement le composé *cis* (figure 21)<sup>67</sup>.

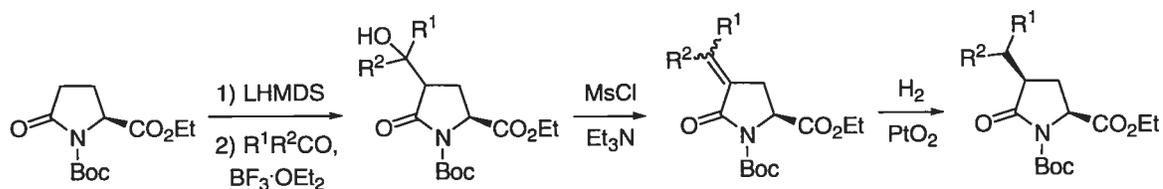


Figure 21 : Synthèse stéréosélective de dérivés 2,4-*cis* de l'acide pyroglutamique<sup>67</sup>.

Le composé *trans* (**3a**) est traité avec 1 équivalent d'une solution 1 M de triéthylborohydrure de lithium (Super-Hydride©) dans le THF pour en obtenir l'hémiacétal correspondant (figure 22). L'hémiacétal ayant une prédisposition à éliminer une molécule d'eau pour former l'ène-carbamate, il est immédiatement transformé, sans purification, en O-Acyl hémiacétal.

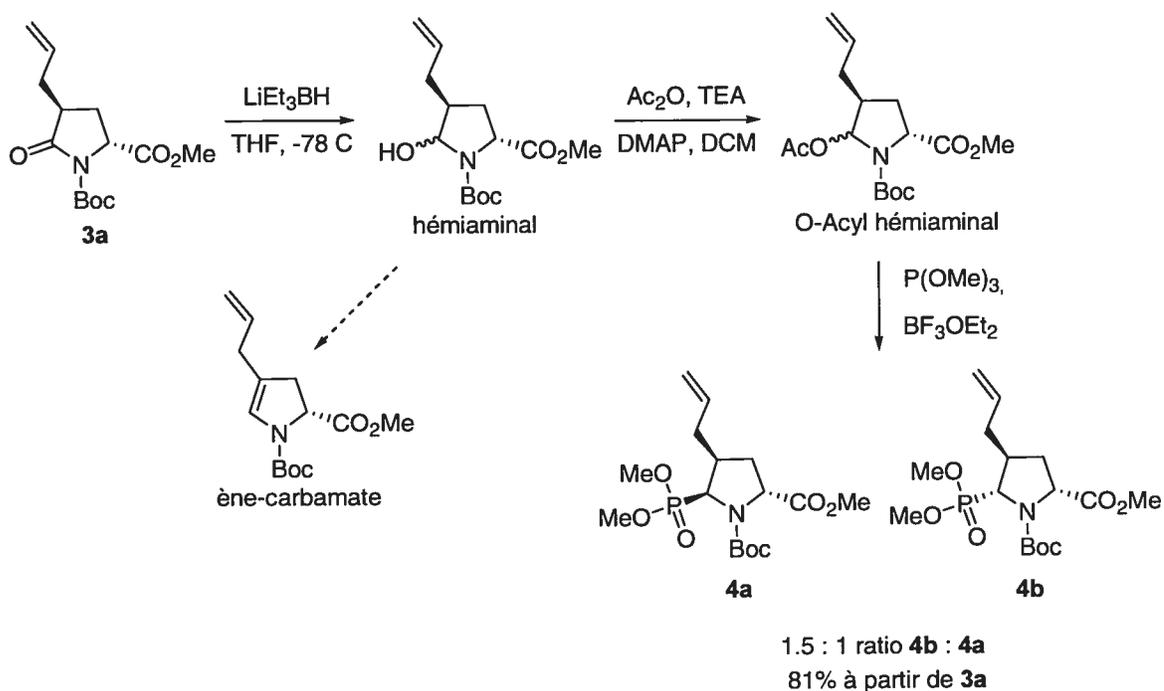


Figure 22 : Formation de l'ion N-acyliminium puis insertion du phosphonate sur le dérivé 2,4-*trans* de l'acide pyroglutamique.

Pour ce faire, il est acétylé avec 3 équivalents d'anhydride acétique en présence de triéthylamine et d'une quantité catalytique de 4-diméthylaminopyridine. L'éther

d'hémiaminal a lui aussi tendance à former l'ène-carbamate correspondant en éliminant une molécule d'acide acétique. Il est donc immédiatement utilisé. Le groupe phosphonate est introduit par une attaque nucléophile de triméthylphosphite sur l'ion N-acyliminium généré *in situ* par l'acide de Lewis trifluorure de bore étheré (figure 23).

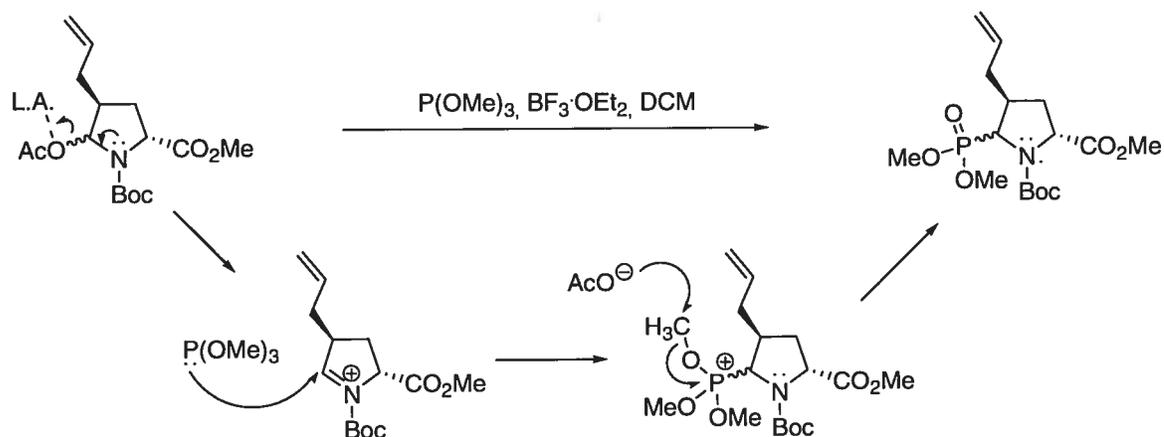


Figure 23 : Mécanisme de l'insertion du phosphonate sur l'ion N-acyliminium.

Il en résulte, dans un excellent rendement, un mélange de diastéréoisomères séparés par chromatographie dans un ratio de 1.5 : 1. Le composé C-2, C-5 *cis* (**4b**) est légèrement favorisé par une balance d'effets stériques. La stéréochimie relative est assignée par RMN NOESY (figure 24). Tel que spécifié précédemment, une faible stéréosélectivité est favorable afin d'obtenir le plus de diastéréoisomères possibles.

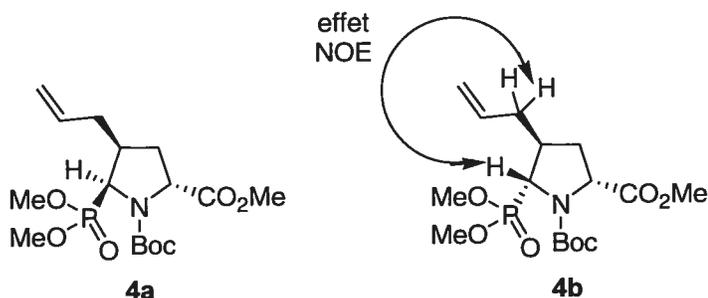


Figure 24 : Détermination de la stéréochimie par observation de l'effet NOE indiqué par la double flèche.

Les mêmes transformations ont été effectuées avec le composé *cis* (**3b**). Le rendement est légèrement inférieur et le mélange de diastéréoisomères est inséparable par chromatographie (figure 25). Il est impossible de déterminer un ratio entre les deux par RMN  $^1\text{H}$  puisque les pics se superposent. Le dédoublement des pics du RMN  $^{13}\text{C}$  suggère que le phosphonate **5** est obtenu sous la forme d'un mélange. De plus, le spectre RMN  $^{31}\text{P}$  montre 2 pics (ratio de 3 : 1). Il est présumé que le phosphonate est principalement orienté vers le haut puisque l'ester de méthyle et l'allyle encombrant la face du dessous. Ici, les composés (**4a**), (**4b**) et (**5**) constituent des intermédiaires synthétiques avancés contenant tous les centres stéréogéniques devant être introduits. Il ne reste plus qu'à fonctionnaliser la molécule avec divers groupes appropriés.

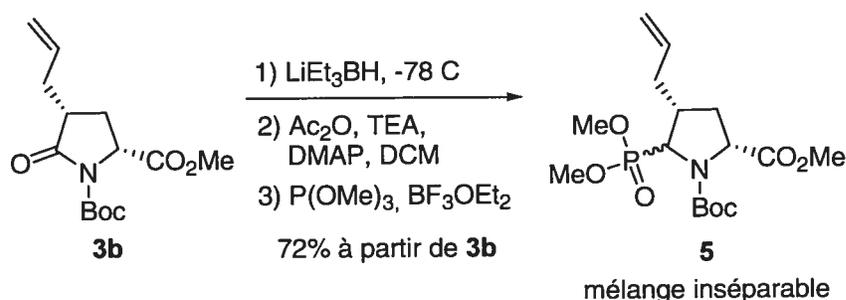


Figure 25 : Insertion du phosphonate sur le dérivé 2,4-*cis* de l'acide pyroglutamique.

L'alcène du composé (**4a**) est clivé par ozonolyse suivi d'un parachèvement réducteur (figure 26). L'ozone bullé dans la solution de (**4a**) transforme l'oléfine en ozonide. Normalement, l'ozonide est brisé par de la triphénylphosphine mais cette procédure produit de l'oxyde de triphénylphosphine qui a le même *R<sub>f</sub>* que l'aldéhyde. Cela empêche d'obtenir l'aldéhyde purifié par chromatographie ou de voir par chromatographie sur couche mince si la réaction subséquente avec l'aldéhyde brut est terminée. Du sulfure de diméthyle a aussi été utilisé pour briser l'ozonide mais la réaction est très lente. L'ozonide est donc directement réduit avec un large excès de borohydrure de sodium (10 équivalents) dans le méthanol. L'ozonide est ainsi réduit jusqu'à l'alcool en passant par l'aldéhyde *in situ*. L'ester de méthyle n'est pas réduit par le borohydrure de sodium. L'alcool est utilisé tel quel sans purification parce qu'il est très difficile à voir par chromatographie sur couche mince s'il n'est pas suffisamment

concentré. Il est traité avec une quantité stœchiométrique de chlorure de l'acide 4-méthylbenzènesulfonique et de triéthylamine dans le dichlorométhane. Le tosylate obtenu (**6**), étant UV-actif, est purifié par chromatographie dans un excellent rendement global depuis l'alcène.

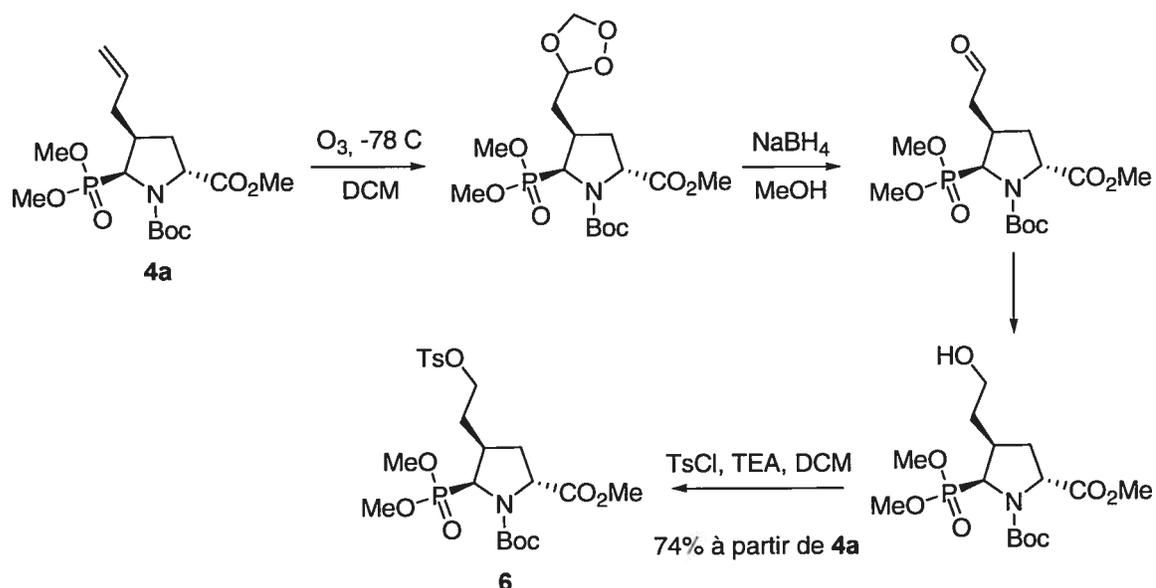


Figure 26 : Ozonolyse réductive puis tosylation de l'allyle du phosphonate 2,4-*trans*, 4,5-*cis*.

Les mêmes transformations sont effectuées sur les autres diastéréoisomères correspondants (**4b**) et (**5**) (figure 27). La série de réactions avec (**4b**) fournit le tosylate (**7**) dans un rendement plus modeste sans doute à cause d'erreurs de manipulations. Le composé (**5**) donne le composé (**8**), dans un rendement acceptable, sous la forme d'un mélange de diastéréoisomères inséparable par chromatographie. Le ratio n'est toujours pas déterminable puisque les pics de RMN  $^1H$  sont toujours superposés. La présence de 2 pics de RMN  $^{31}P$  (ratio 6 : 1) suggère toujours la présence d'un mélange de diastéréoisomères.

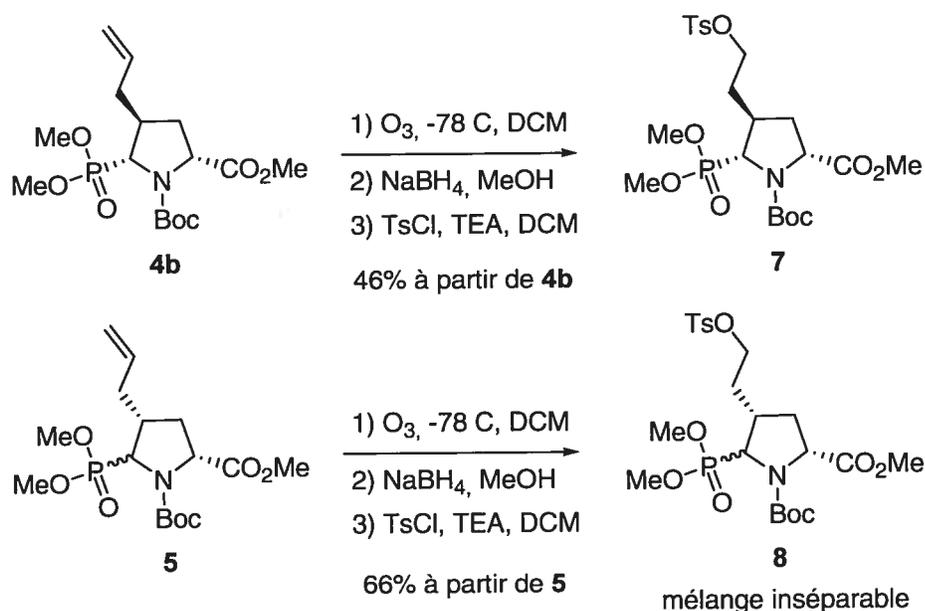


Figure 27 : Fonctionnalisation de l'alcène des autres diastéréoisomères des phosphonates.

Les tosylates (6), (7) et (8) sont ensuite déplacés par un excès de naphthalimide de sodium dans le DMF afin d'obtenir les composés portant un naphthalamide en C-4, soit (9), (10) et (11) respectivement (figure 28). Les rendements sont faibles. Le 1,8-naphthalimide est insoluble dans presque tous les solvants et le DMF doit être utilisé. L'excédant de naphthalimide, qui est moins polaire que le composé voulu, est aussi difficile à enlever par chromatographie. Il doit être sorti de la colonne sans faire éluer le composé voulu. Comme il est très peu soluble dans les solvants organiques, une grande quantité de solvant est nécessaire pour le faire sortir. Même si le composé voulu n'est pas sensé migrer à la polarité utilisée (20% EtOAc/Hexanes), une faible quantité peut être entraînée avec l'excédant de naphthalimide. Tous ces détails expliquent les faibles rendements observés. Encore une fois, le composé (11) est isolé sous la forme d'un mélange de diastéréoisomères, inséparable par chromatographie, de ratio inconnu. Les composés (9), (10) et (11) étant maintenant fonctionnalisés en C-4, il ne reste plus qu'à les fonctionnaliser en C-1 avec divers acides aminés.

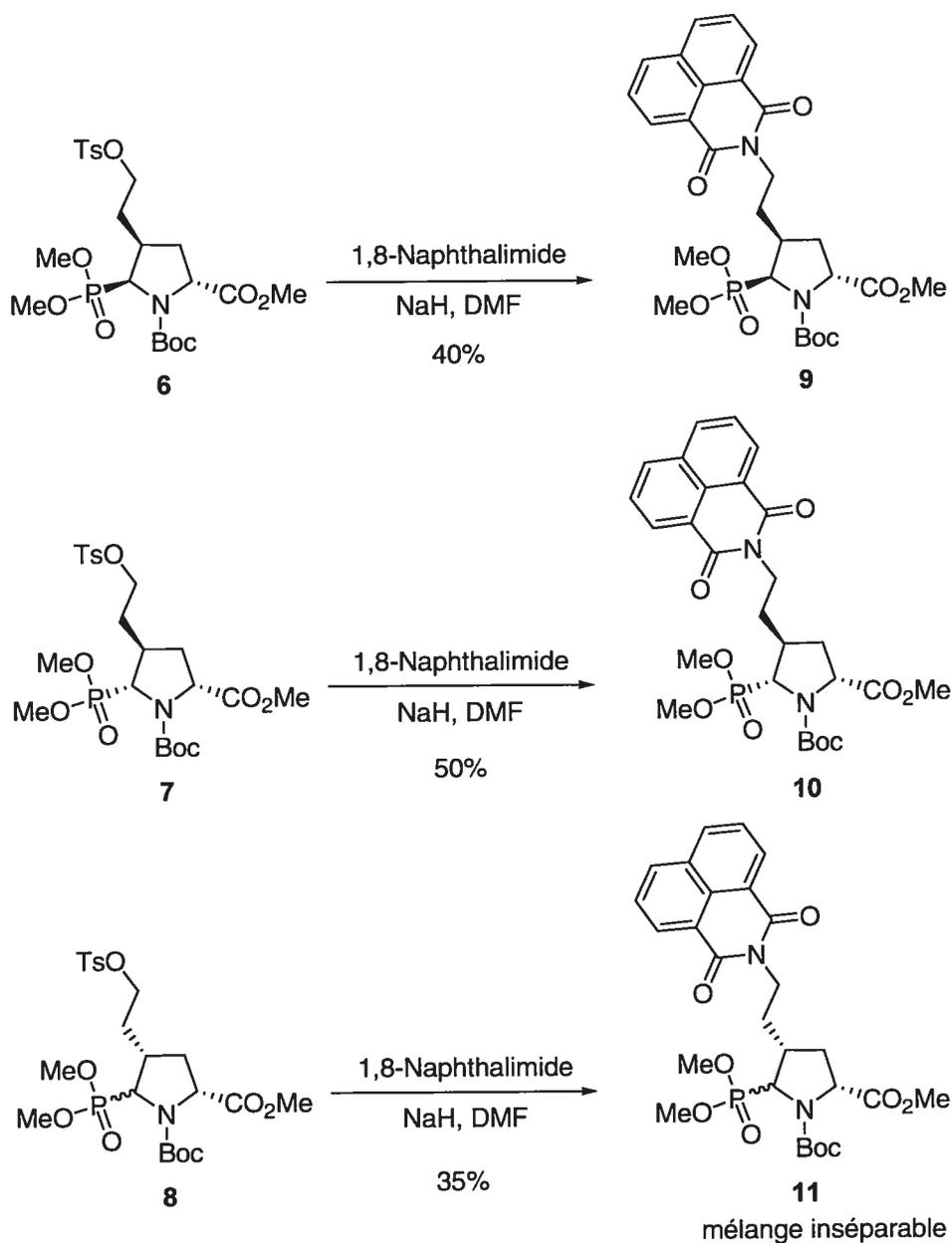
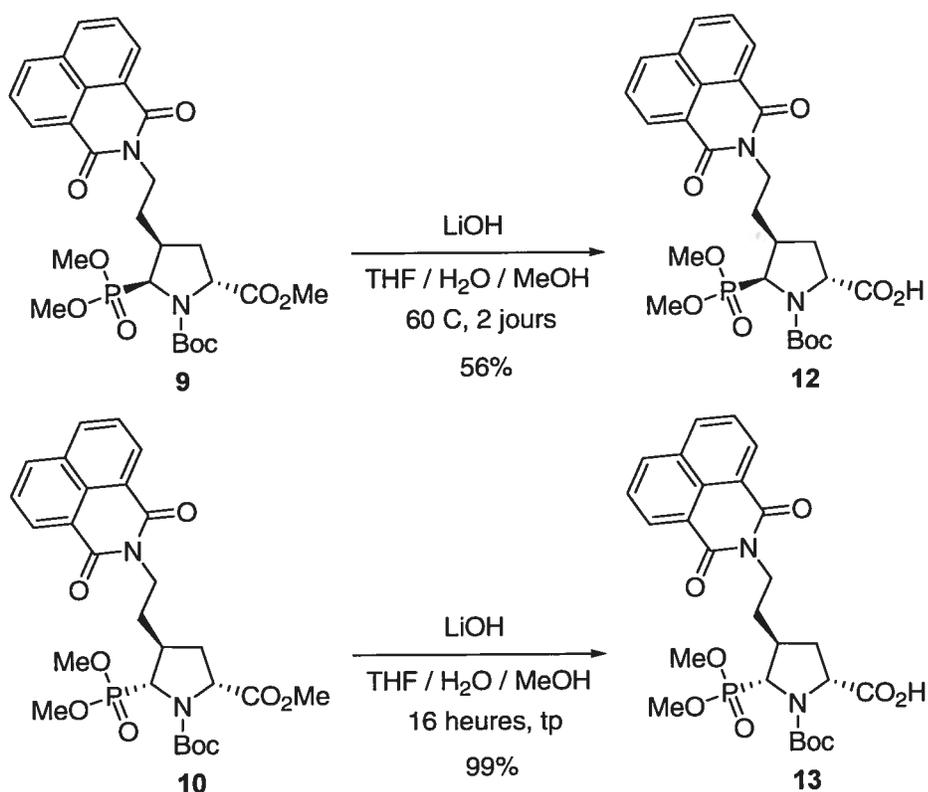


Figure 28 : Déplacement du tosylate par le naphthalimidure de sodium.

L'ester de méthyle (**9**) est saponifié avec 2 équivalents d'hydroxyde de lithium dans un mélange de THF, eau et méthanol (figure 29). Il n'y a aucune réaction à la température ambiante et la réaction dure 2 jours à reflux à 60°C. L'acide (**12**) est récupéré dans un rendement modeste. L'ester de méthyle (**10**) est saponifié dans les mêmes conditions et l'acide (**13**) est obtenu dans un excellent rendement, mais la réaction est complète après 16 heures à la température de la pièce.



**Figure 29 :** Conditions différentes de saponification de l'ester méthylique selon sa stéréochimie relative au phosphonate.

Cette facilité qu'expose le composé (**10**) à être hydrolysé comparé au composé (**9**) ne peut être expliqué avec certitude. Une des hypothèses émise est la participation d'un groupe adjacent, souvent appelé effet de proximité. Il est proposé que le phosphonate *cis* à l'ester de méthyle se retrouve très près de ce dernier et pourrait participer à l'hydrolyse de l'ester. Des analyses RMN sur un composé analogue ont été effectuées mais aucune preuve de ce phénomène n'a pu être rapportée.

L'ester de méthyle (**11**) réagit dans les mêmes conditions de saponification à la température de la pièce mais très peu : il reste beaucoup de produit de départ (figure 30). Après 2 jours à 60°C, la réaction est complète et l'acide (**14**) est obtenu, dans un excellent rendement, sous la forme d'un mélange de diastéréoisomères. Cela présume que l'acide (**14**) contient principalement le composé avec le phosphonate *trans* à l'acide

carboxylique puisque très peu a réagi à la température de la pièce, il a fallu chauffer comme dans le cas du composé *trans* (9).

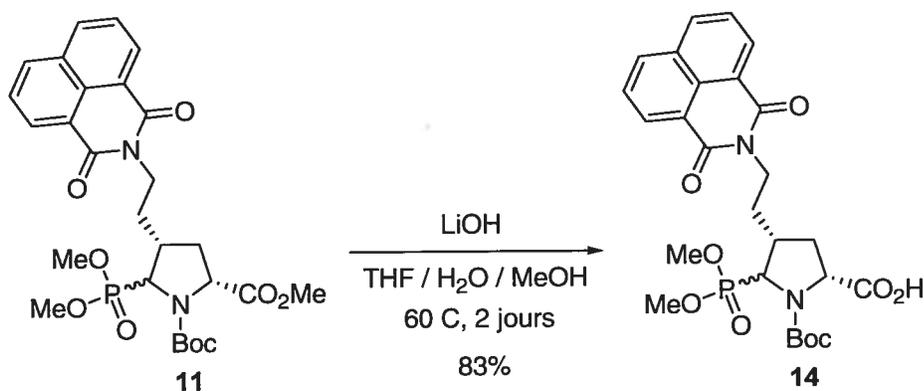


Figure 30 : Saponification du composé 2,4-*cis*.

Un couplage peptidique entre les acides (12), (13) et (14) et la phénylalanine protégée en ester de *tert*-butyle, donne les composés finaux protégés (15), (16) et (17) respectivement, dans un rendement plutôt faible. Comme le sel d'hydrochlorure de phénylalanine est utilisé, la base de Hunig's est d'abord ajoutée à l'amine (figure 31). Le stabilisateur 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) est ensuite ajouté, suivi de l'acide puis finalement de l'activateur iodure de 1-(3-triméthylammonio)propyl-3-éthylcarbodiimide (EDCI). D'autres agents de couplages n'ont pas été essayés.

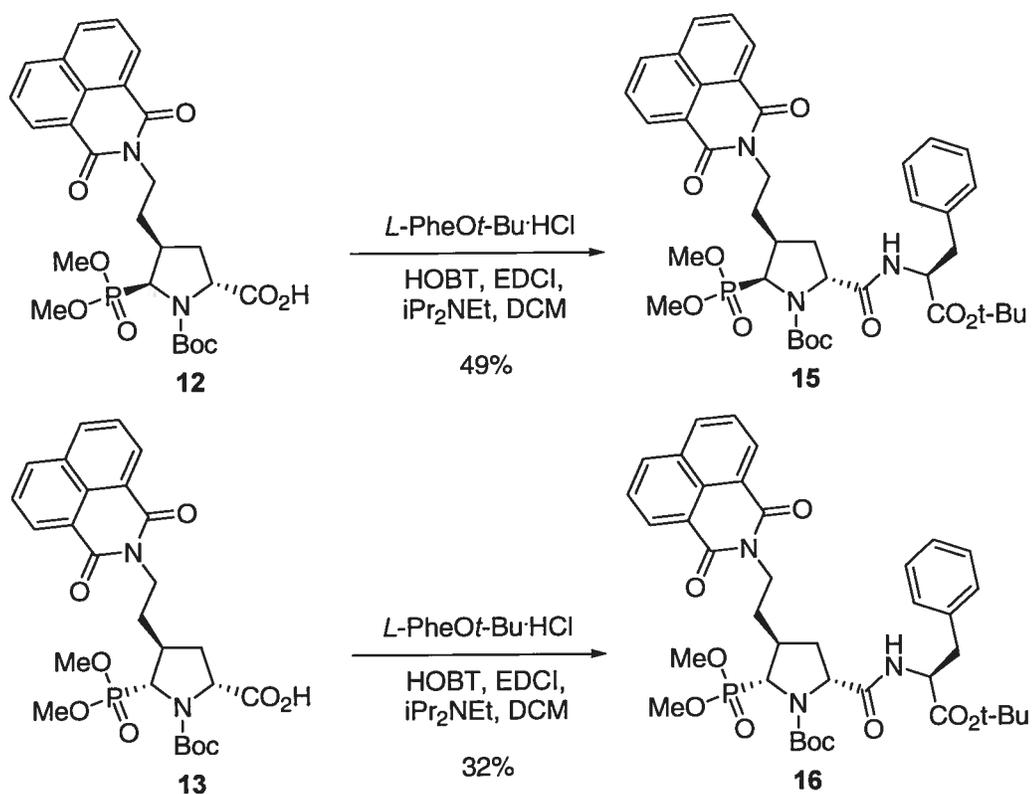


Figure 31 : Couplage peptidique des composés 2,4-*trans*.

Le composé (**17**) est obtenu sous la forme d'un seul diastéréoisomère (figure 32). La stéréochimie relative a été assignée par RMN NOESY (figure 33). Le ratio devait fortement favoriser le composé *trans* en C-2, C-5 de tel sorte que le composé *cis* n'a pas pu être isolé en raison de sa faible quantité. Cette observation a aussi été relevée par le Dr Cécile Gauchet lors de la synthèse de l'énantiomère correspondant<sup>64</sup>.

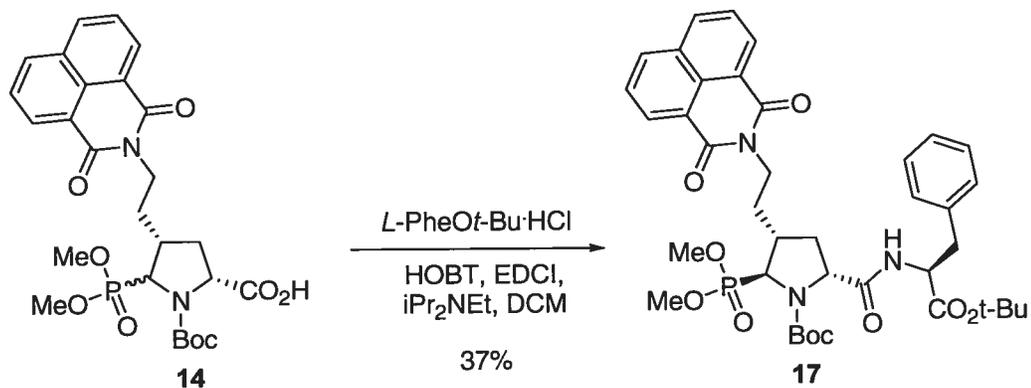
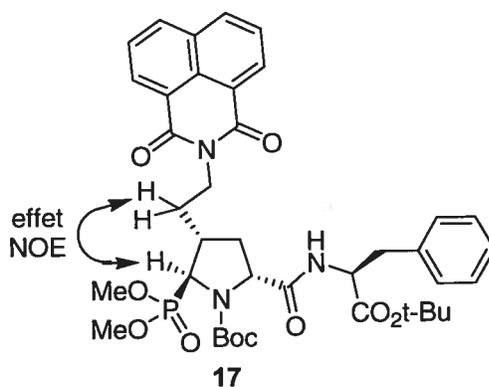
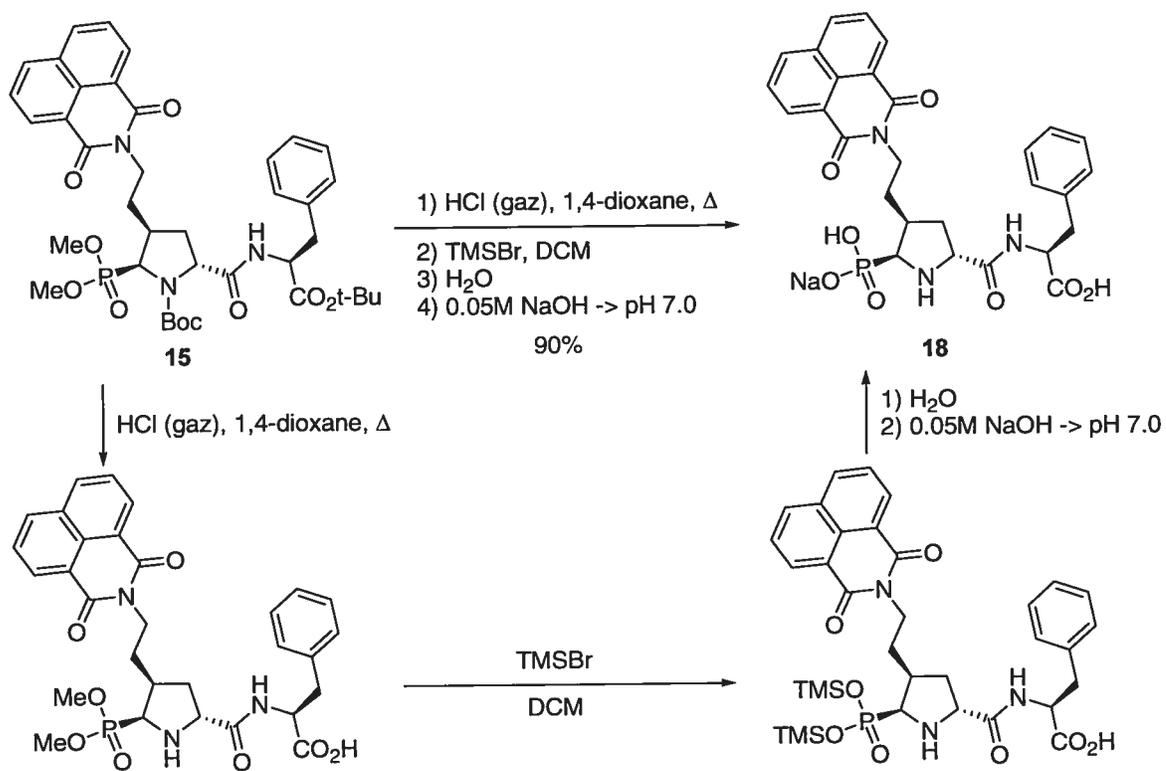


Figure 32 : Couplage peptidique du composé 2,4-*cis*.



**Figure 33 : Détermination de la stéréochimie par observation de l'effet NOE indiqué par la double flèche.**

Les composés (15), (16) et (17) sont ensuite déprotégés (figure 34 et 36). Ils sont dissous dans du 1,4-dioxane anhydre et du HCl gazeux est bullé dans la solution. Cela clive les *tert*-butyles, soit le Boc et l'ester de *tert*-butyle, pour donner l'amine et l'acide correspondant respectivement.



**Figure 34 : Déprotections finales de l'inhibiteur potentiel de l'ECE 2,4-trans, 4,5-cis.**

Ensuite les composés sont traités avec un excès de bromure de triméthylsilane. Cela clive le phosphonate de dialkyle en phosphonate de *bis*(triméthylsilane) (figure 35)<sup>68</sup>.

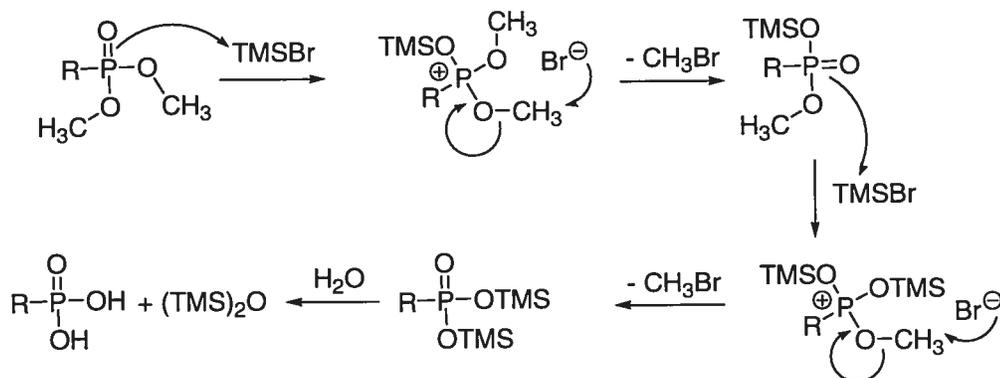


Figure 35 : Mécanisme de l'hydrolyse du phosphonate en acide phosphonique.

De l'eau est ajoutée afin d'obtenir l'acide phosphonique. Comme le composé n'est pas soluble dans l'eau acide, le pH est ensuite ajusté à 7.0 avec une faible solution d'hydroxyde de sodium. Le mono sel de sodium de l'acide phosphonique (18), (19) et (20) sont finalement lyophilisés et envoyés à la compagnie Servier pour des tests enzymatiques.

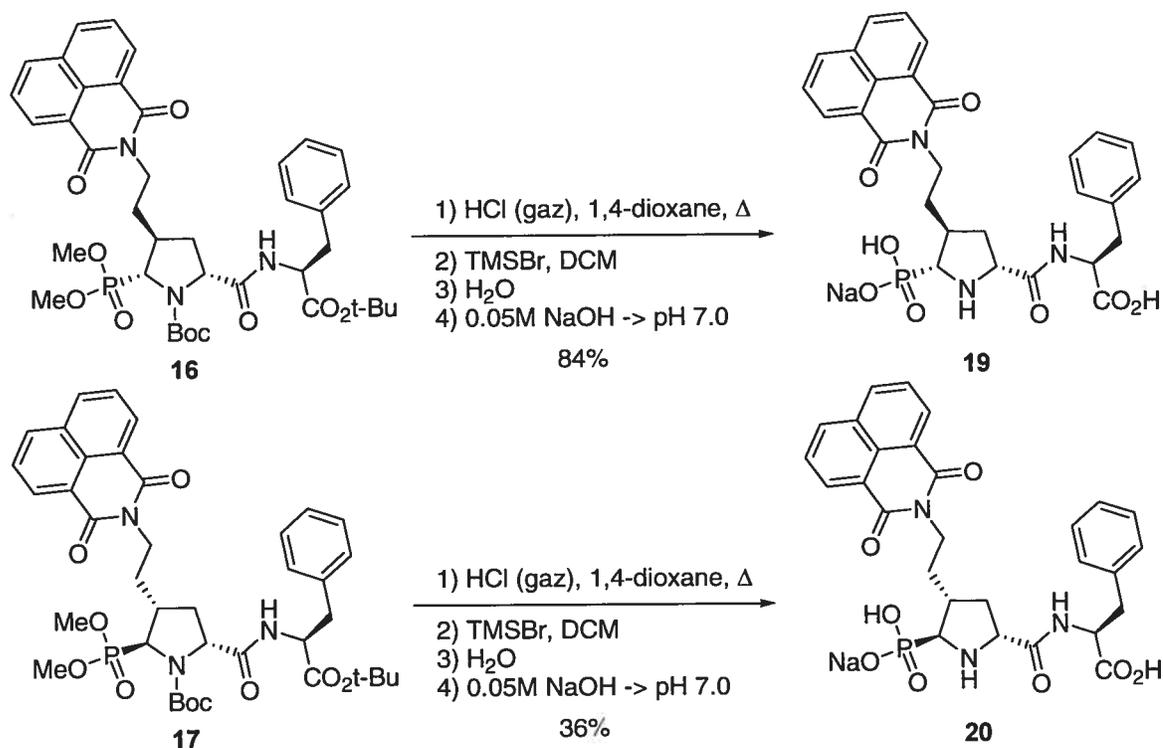


Figure 36 : Déprotections finales des autres diastéréoisomères inhibiteurs potentiels de l'ECE

### Synthèse des analogues quadrisubstitués

L'acide (*R*)-(+)-pyroglutamique (**1**) est utilisé comme produit de départ. L'acide est d'abord transformé en ester de méthyle par traitement avec un excès de chlorure de thionyle dans le méthanol (figure 37). L'ester doit ensuite être réduit jusqu'à l'alcool, par une quantité stoechiométrique de borohydrure de sodium dans l'éthanol, afin de diminuer l'acidité de l'hydrogène en C-2. Si l'ester de méthyle était conservé comme groupe protecteur, l'acidité de l'hydrogène en C-2 favoriserait la formation du dérivé pyrrole lors de la formation de l' $\alpha,\beta$ -insaturation. Cela aurait comme conséquence d'enlever toute chiralité à la molécule, annulant la pertinence d'une synthèse énantiosélective. L'alcool est donc protégé sous la forme d'un éther de *tert*-butyldiphenylsilane (**21**) en présence de chlorure de *tert*-butyldiphenylsilane et d'imidazole dans le DMF. Le lactame (**21**) est purifié par chromatographie après 3

étapes dans un excellent rendement. Le lactame (21) est ensuite protégé par un Boc dans les mêmes conditions que citées précédemment. Le pyroglutaminol protégé (22) est purifié par chromatographie dans un excellent rendement<sup>69</sup>.

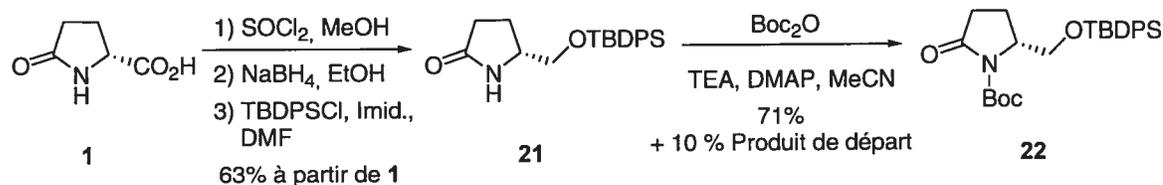


Figure 37 : Estérification, réduction et protection de l'acide pyroglutamique<sup>69</sup>.

L'énolate de lithium du lactame protégé (22) est formé avec l'hexaméthylidisilylamidure de lithium dans le THF à  $-78^\circ\text{C}$  puis est neutralisé avec le bromure de phénylsélénane (figure 38). Il en résulte le lactame protégé alkylé par le phénylsélénane. Ce dernier est utilisé tel quel et est traité avec un excès de peroxyde d'hydrogène afin d'oxyder le sélénium. En présence d'une quantité catalytique de pyridine, il y a élimination et le lactame  $\alpha,\beta$ -insaturé (23) est purifié par chromatographie dans un excellent rendement<sup>70</sup>.

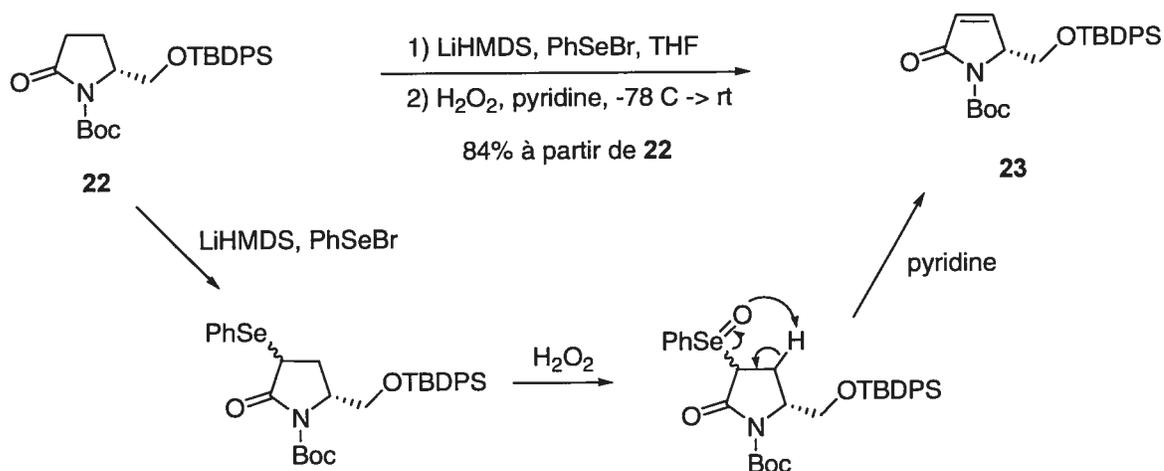


Figure 38 : Oxydation de l'acide pyroglutamique protégé en lactame  $\alpha,\beta$ -insaturée par élimination d'un sélénoxynane<sup>70</sup>.

Un groupement isobutyle est introduit en C-3 par une addition 1,4 catalysée par le cuivre(I). Le lactame  $\alpha,\beta$ -insaturé (**23**) est traité avec une quantité stoechiométrique de bromure d'isobutylmagnésium et une quantité catalytique d'iodure de cuivre (figure 39). Le composé (**24**) est isolé par chromatographie en tant qu'un seul isomère dans un excellent rendement. La stéréosélectivité est induite par l'éther de silane qui est très encombrant stériquement. La stéréochimie relative est assignée par RMN NOESY (figure 40). Aucun isomère *cis* n'est observé par RMN  $^1\text{H}$  du produit brut.

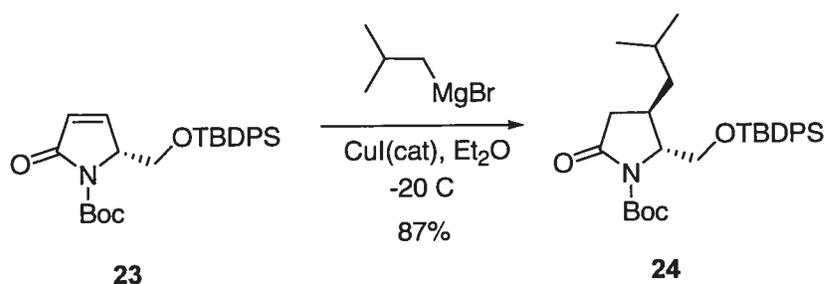


Figure 39 : Addition catalysée par le cuivre d'un organomagnésien en position 3.

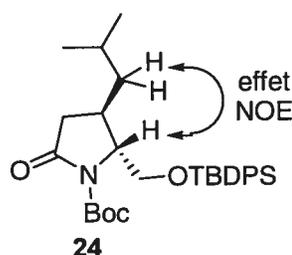


Figure 40 : Détermination de la stéréochimie par observation de l'effet NOE indiqué par la double flèche.

L'énolate de lithium du lactame (**24**) est de nouveau formé avec l'hexaméthylidisilylamidure de lithium dans le THF à  $-78^\circ\text{C}$  (figure 41). L'iodure d'allyle piège l'énolate pour former, dans un rendement modeste, un mélange de diastéréoisomères séparés par chromatographie dans un ratio de 4 : 1 en faveur du composé *trans,trans* (**25a**). La stéréochimie relative est assignée par RMN NOESY (figure 42).

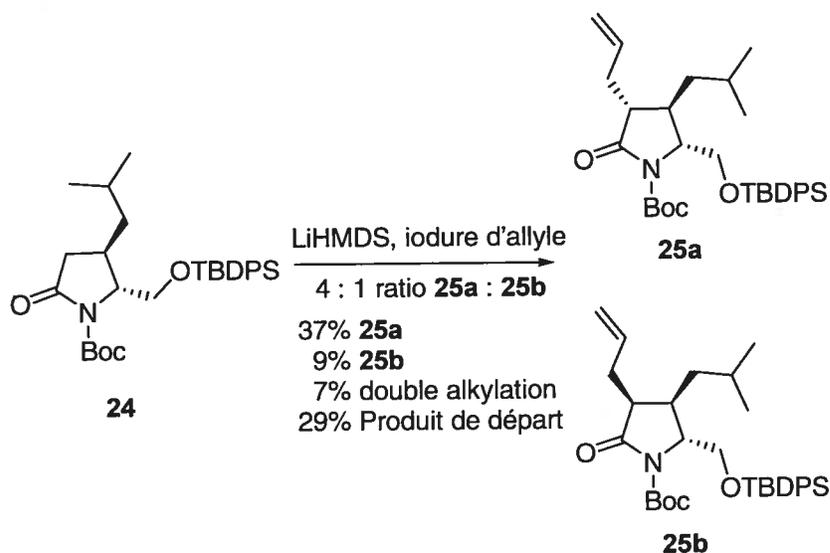


Figure 41 : Alkylation du dérivé de l'acide pyroglutamique.

Il est à noter que la réaction ne semble pas aller jusqu'à complétion et que du produit de départ est récupéré. Il y a aussi formation de produit doublement alkylé. La stéréosélectivité semble contrôlée par l'isobutyle vicinal. Puisque cette sélectivité est moyennement élevée, seul l'isomère (**25a**) sera utilisé pour poursuivre la synthèse en raison de la trop faible quantité de (**25b**) disponible.

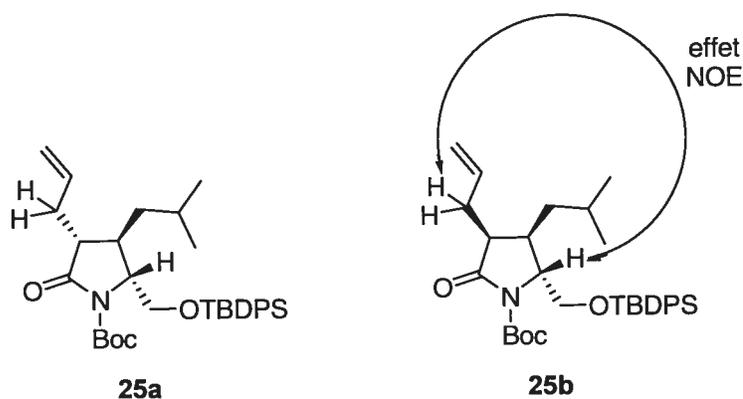


Figure 42 : Détermination de la stéréochimie par observation de l'effet NOE indiqué par la double flèche.

Le Dr Philippe Nakache a rencontré des difficultés à introduire le phosphonate en présence du volumineux éther de silane<sup>71</sup>. Les temps de réaction étant plus longs, une

exposition prolongée au trifluorure de bore étheré clive le Boc. Ce dernier est alors difficile à réintroduire. Le groupe protecteur éther de silane sera donc changé pour un ester. L'éther de silane (**25a**) est clivé en présence d'une quantité stoechiométrique de fluorure de tétrabutylammonium et d'un excès d'acide acétique dans le THF. La présence d'acide ralentit la réaction mais est nécessaire pour protonner l'alcoolate qui autrement procède à une attaque intramoléculaire sur le lactame pour former la lactone (**27**) par ouverture de cycle (figure 43)<sup>72</sup>.

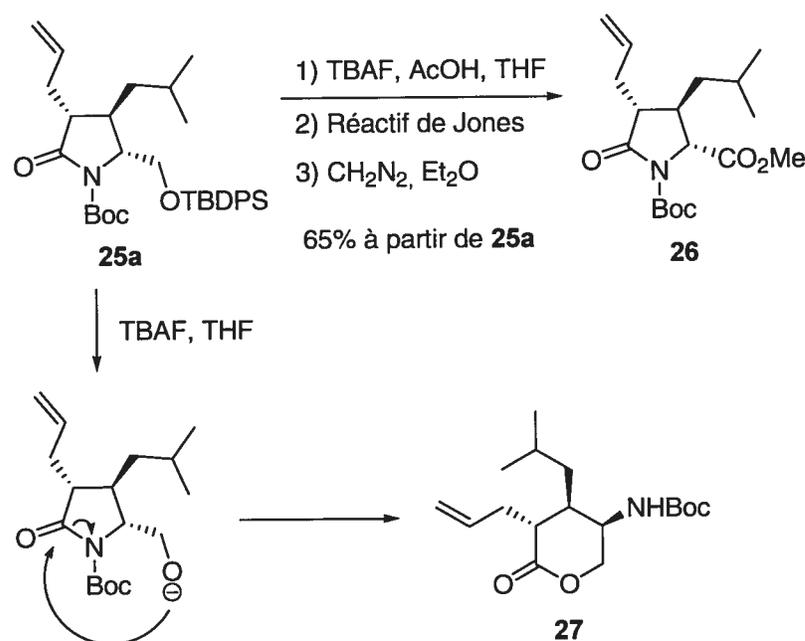


Figure 43 : Déprotection, oxydation et estérification du dérivé de l'acide pyroglutamique.

Ensuite l'alcool, dissout dans l'acétone, est oxydé jusqu'à l'acide carboxylique par le réactif de Jones qui est une solution de trioxyde de chrome(VI) dans l'acide sulfurique dilué. L'acide carboxylique est protégé en ester de méthyle par l'action d'un excès de diazométhane dans l'éther. L'ester (**26**) est purifié par chromatographie dans un excellent rendement après 3 étapes.

Le lactame (**26**) est ensuite converti en hémiaminal avec une quantité stoechiométrique de Super-Hydrider®, puis directement en aminal avec un excès d'anhydride acétique, de triéthylamine et une quantité catalytique de 4-diméthylaminopyridine (figure 44).

L'aminal est immédiatement transformé en ion N-acyliminium par l'action du trifluorure de bore étheré et le triméthylphosphite donne les phosphonates correspondant (**28a**) et (**28b**) *in situ* dans un excellent rendement après 3 étapes et dans un ratio de 2 : 1 en faveur du phosphonate *cis* à l'ester de méthyle. La stéréochimie relative est assignée par RMN NOESY (figure 45). Aussi, une faible diastéréosélectivité est souhaitable dans le but d'accéder au plus grand nombre de composés possibles.

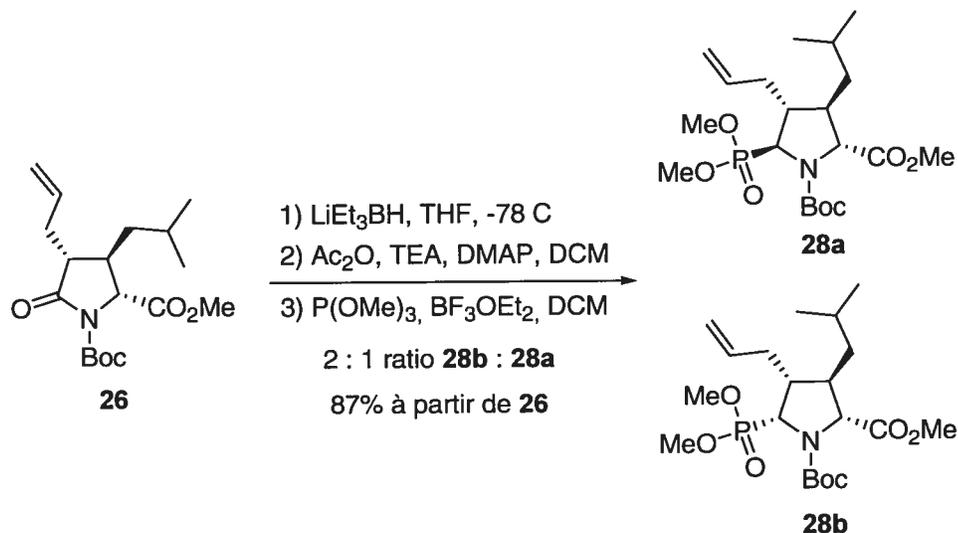


Figure 44 : Insertion du phosphonate par addition sur l'ion N-acyliminium.

Les composés (**28a**) et (**28b**) obtenus sont des intermédiaires synthétiques avancés. Ils comportent déjà tous les centres stéréogéniques qui étaient à construire et il ne reste plus qu'à fonctionnaliser diversement : avec un groupe hydrophobe en C-4 et avec un acide aminé en C-2.

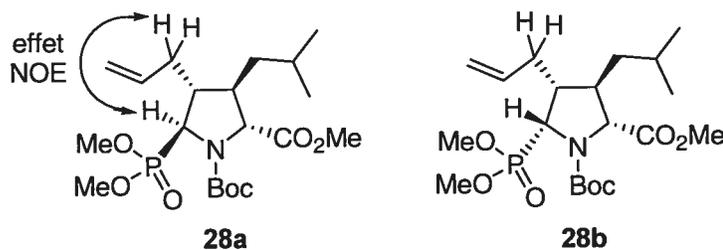
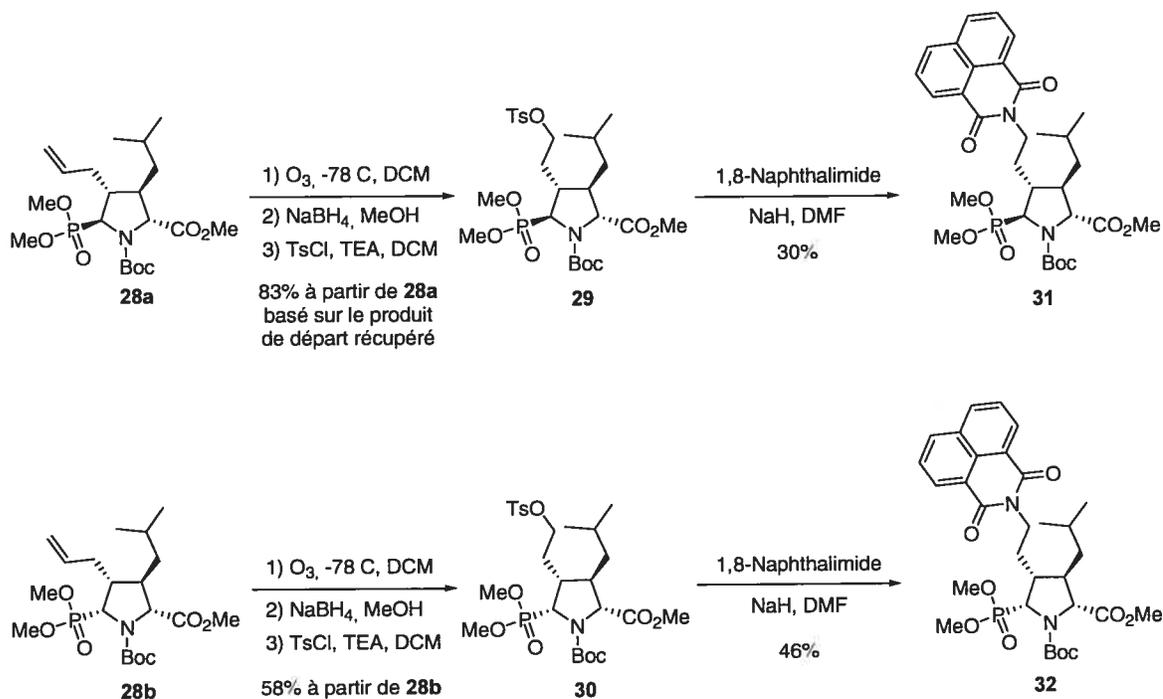


Figure 45 : Détermination de la stéréochimie par observation de l'effet NOE indiqué par la double flèche.

Les composés (**28a**) et (**28b**) sont donc ozonolysés séparément afin de cliver l'alcène (figure 46). L'ozonide obtenu est directement réduit par un excès de borohydrure de sodium. L'ester de méthyle ne réagit pas dans ces conditions. L'alcool est ensuite tosylé et les tosylates (**29**) et (**30**) sont purifiés par chromatographie dans de bons rendements sur 3 étapes.



**Figure 46 : Fonctionnalisation de l'alcène en naphthalimide des composés tétrasubstitués.**

Les tosylates sont déplacés par le 1,8-naphthalimidure de sodium préalablement généré dans le DMF. Après chromatographie, les composés (**31**) et (**32**) sont obtenus dans des rendements modestes. La branche C-4 est maintenant fonctionnalisée.

Les esters de méthyles (**31**) et (**32**) sont saponifiés avec de l'hydroxyde de lithium (figure 47). Les deux sont traités dans les mêmes conditions, soit 2 jours à 60°C. Les acides (**33**) et (**34**) sont obtenus avec d'excellents rendements après extraction.

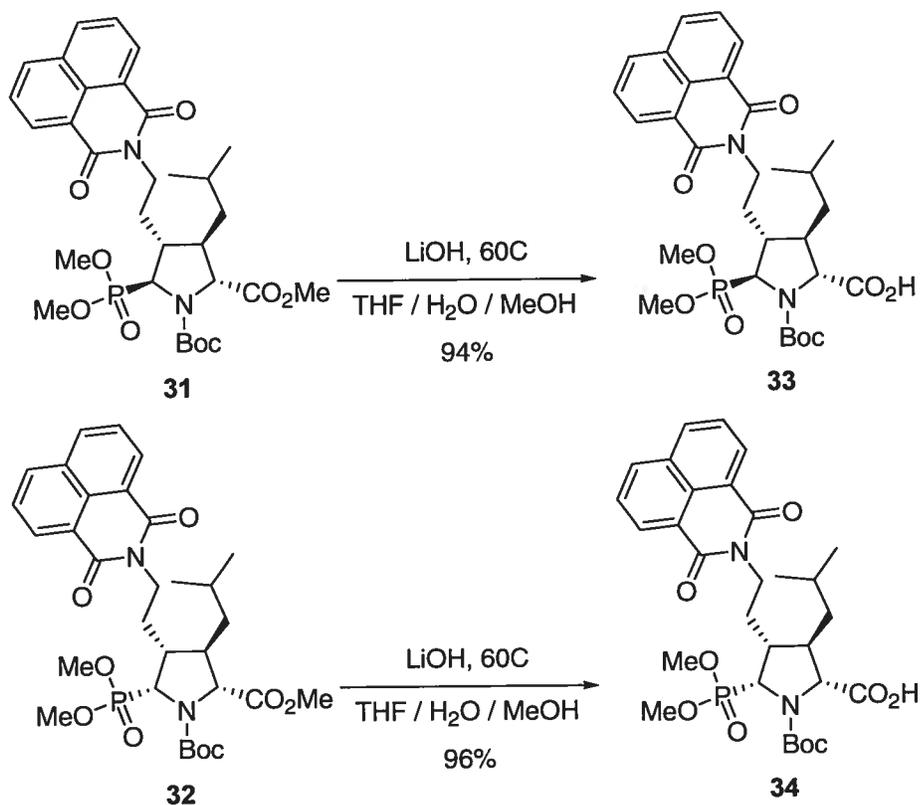


Figure 47 : Saponification de l'ester des composés tétrasubstitués.

L'acide (**33**) a été soumis aux mêmes conditions de couplage peptidique que les composés trisubstitués. Cependant, aucun produit n'a été formé (figure 48). Le produit de départ a été récupéré par chromatographie puis soumis à d'autres conditions : PyBOP (1 équivalent), *i*Pr<sub>2</sub>NEt (2 équivalents) et *L*-PheO*t*-Bu (1 équivalent) mais sans succès. Il n'y a pas eu assez de produit de départ (**33**) pour poursuivre plusieurs essais puisque ce diastéréoisomère est minoritaire.

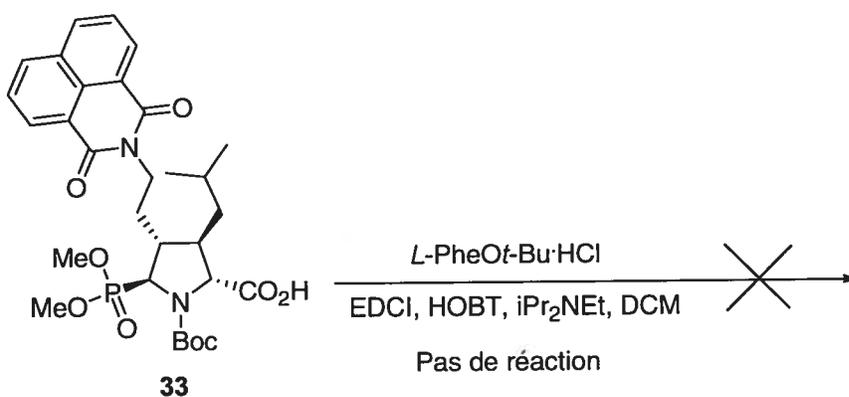


Figure 48 : L'acide ne réagit pas aux conditions de couplage peptidique.

L'acide (34) a cependant bien réagit dans les mêmes conditions de couplage que les composés trisubstitués. Il a été couplé, dans des rendements acceptables, avec 3 acides aminés différents afin de mesurer l'impact de l'acide aminé lors de l'inhibition de l'enzyme de conversion de l'endothéline (figure 49). Le composé (35) est obtenu après couplage avec l'ester de *tert*-butyle de la *L*-phénylalanine. Le composé (36) est obtenu après couplage avec l'ester de *tert*-butyle du *L*-tryptophane. Le composé (37) est obtenu après couplage avec l'ester de méthyle de la *L*-homophénylalanine.

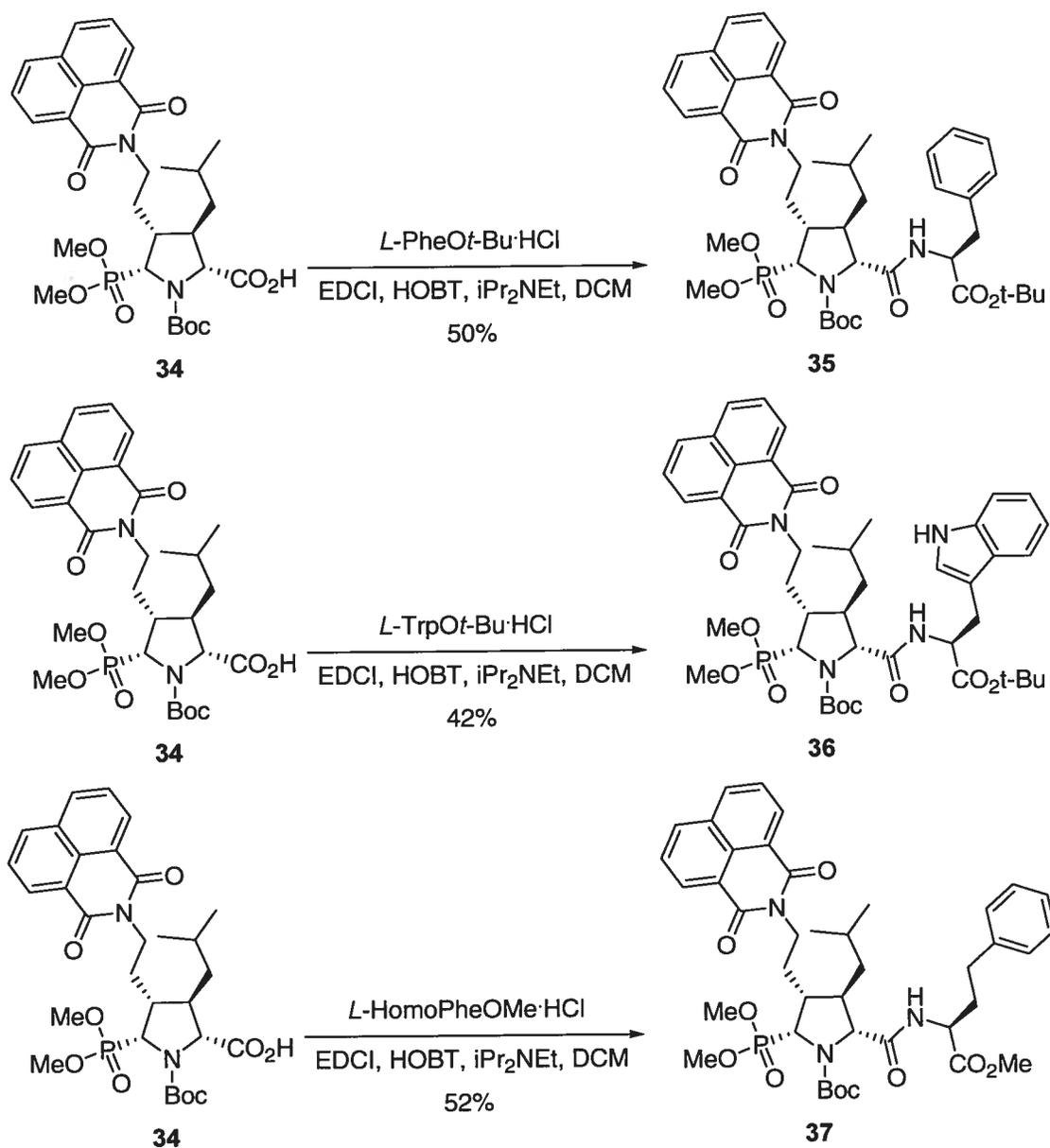


Figure 49 : Diversification de l'acide aminé dans les couplages peptidiques.

Il ne reste plus qu'à déprotéger les composés (**35**) et (**36**) selon les mêmes conditions que les composés trisubstitués (figure 50). Clivage du Boc et de l'ester de *tert*-butyle avec du HCl gazeux dans le 1,4-dioxane. Hydrolyse du phosphonate en acide phosphonique avec le bromure de triméthylsilane, et finalement ajustement jusqu'à pH 7.0 avec une solution diluée (0.05 M) d'hydroxyde de sodium pour former les sels de sodium (**38**) et (**39**) respectivement, dans des rendements excellents. Le composé (**39**) a

dû être purifié par HPLC préparatif à phase inverse afin d'enlever une impureté (alkylation de l'indole par le cation *tert*-butyle lors de la déprotection avec HCl), ce qui explique le rendement global de seulement 7%.

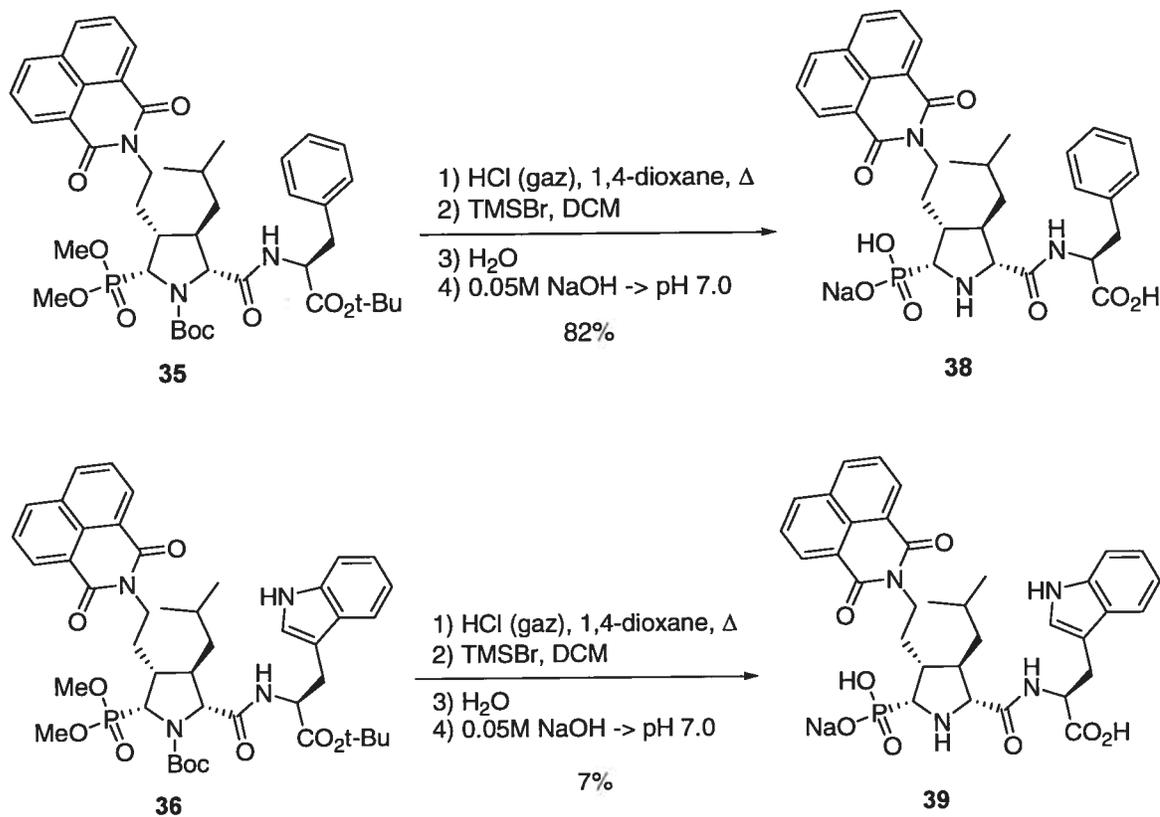


Figure 50 : Déprotections finales des inhibiteurs potentiels de l'ECE tétrasubstitués.

Le composé (**37**) est traité dans les mêmes conditions mais, en plus, l'ester de méthyle doit être saponifié avec de l'hydroxyde de lithium après le traitement au HCl gazeux (figure 51). Le produit final (**40**) est obtenu dans un rendement faible. Les composés (**38**), (**39**) et (**40**) sont lyophilisés et envoyés à la compagnie Servier pour des tests d'activité enzymatique.

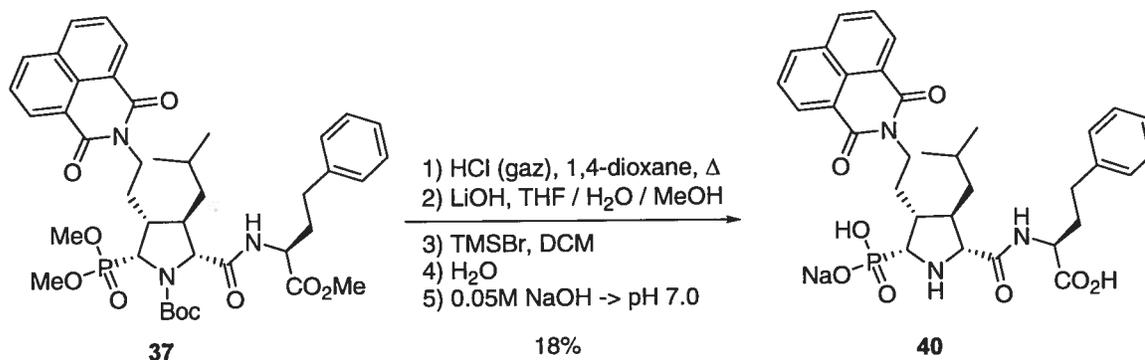


Figure 51 : Déprotections finales de l'inhibiteur potentiel de l'ECE avec un ester de méthyle.

## Conclusion

Les composés (18), (19), (20), (38), (39) et (40) ont été synthétisés et envoyés pour tests enzymatiques envers l'enzyme de conversion de l'endothéline (figure 52). Parmi ceux-ci, 3 composés sont trisubstitués (18), (19) et (20). Ils possèdent tous une stéréochimie différente. En fait, ils représentent toutes les stéréochimies atteignables depuis l'acide (*R*)-(+)-pyroglutamique dans le chemin synthétique présenté puisque le composé C-2/C-4 *cis*, C-4/C-5 *trans* n'est observé qu'en trop faible quantité pour être amené jusqu'à la fin de la synthèse. Ces composés révéleront l'importance ou non de la stéréochimie et, si oui, laquelle est la plus favorable à l'inhibition de l'enzyme de conversion de l'endothéline.

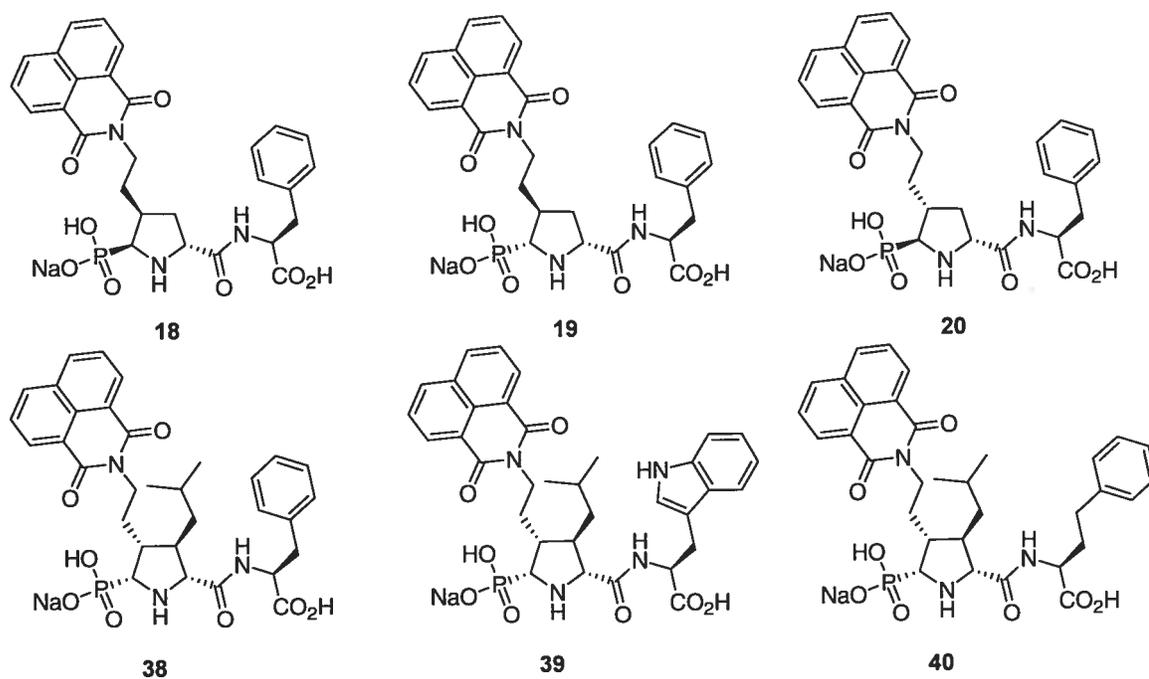


Figure 52 : Inhibiteurs potentiels de l'ECE synthétisés.

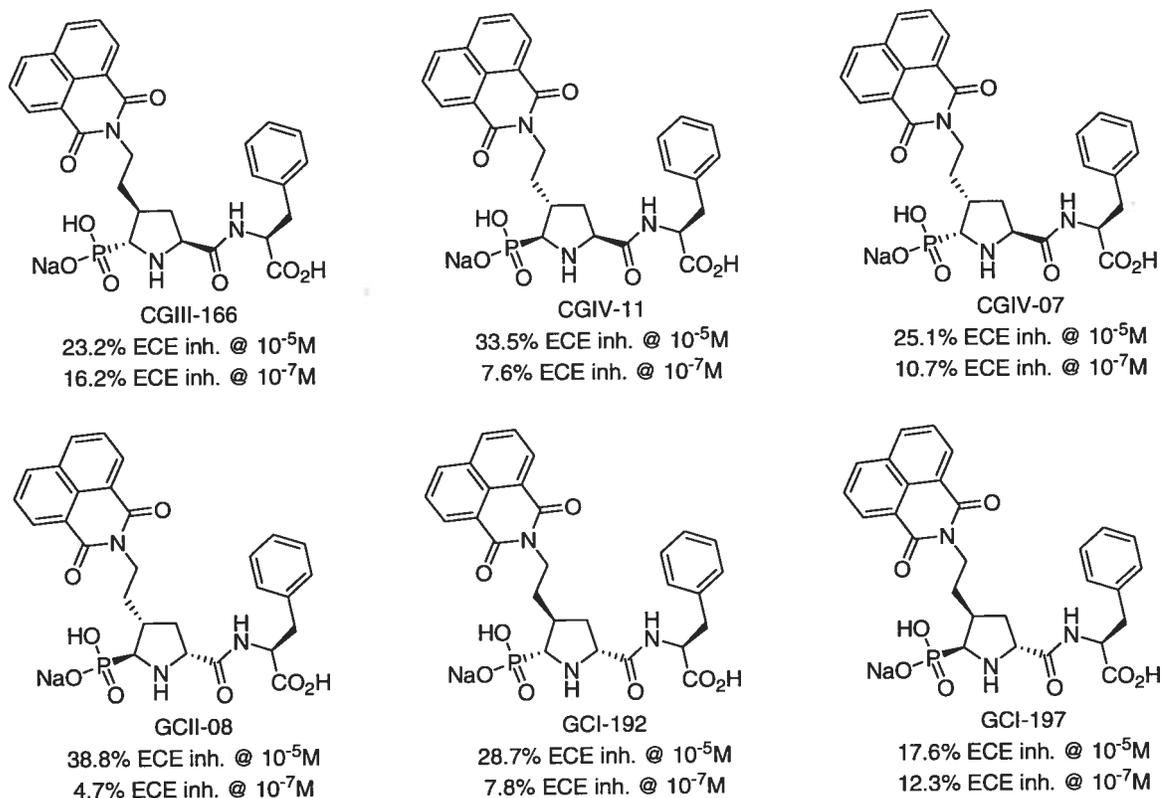
Les 3 autres composés (38), (39) et (40) sont quadrisubstitués. Ils ont tous la même configuration relative puisque, dans la synthèse présentée, l'insertion de l'isobutyle en C-3 est complètement stéréosélective, l'insertion en C-4 est trop sélective pour permettre à l'isomère minoritaire d'être amené en fin de synthèse et le diastéréoisomère avec le phosphonate (C-2/C-5) *trans* n'a pu être couplé à un acide aminé. L'étude de ces composés permettra donc de déterminer l'effet de l'acide aminé dans la stéréochimie donnée.

## Chapitre 3 Résultats et analyse des tests enzymatiques

### ***Analyse des tests enzymatiques***

Voici les résultats des essais enzymatiques *in vitro* effectués par la compagnie pharmaceutique Servier en tant qu'inhibiteurs de l'ECE humaine recombinée. Les résultats présentés ici sont ceux de tous les composés synthétisés dans le laboratoire Hanessian pour cette étude dans le but de faire une analyse complète de tous les résultats obtenus. Les composés portant un nom commençant par CG sont ceux ayant été synthétisés par les docteurs Cécile Gauchet et Philippe Nakache, et ceux dont le nom commence par GC sont ceux synthétisés par moi-même.

Une première série tri-substituée, avec un groupe naphthalimide en  $S_1$  et la phénylalanine en  $S_2'$ , est comparée. Tous les diastéréoisomères sont présentés (figure 53). Une certaine inhibition est atteinte mais aucune relation structure-activité ne peut être développée puisque l'inhibition est semblable pour tous les diastéréoisomères.



**Figure 53 : Résultats des inhibiteurs tri-substitués avec naphthalimide et phénylalanine.**

Par contre, il est possible de prouver la nécessité de chacun des groupes en les substituant un à un (figure 54). On remarque alors que le remplacement de l'acide phosphonique comme groupe chélateur du zinc par un acide carboxylique (CGIV-08) diminue de beaucoup l'inhibition. Aussi, si le gros groupe hydrophobe naphthalimide est remplacé par un autre groupe plus petit (CGIV-02 et CGIII-185) l'inhibition est encore diminuée. Finalement, l'élimination de l'acide aminé phénylalanine (CGIV-195) diminue aussi l'inhibition.

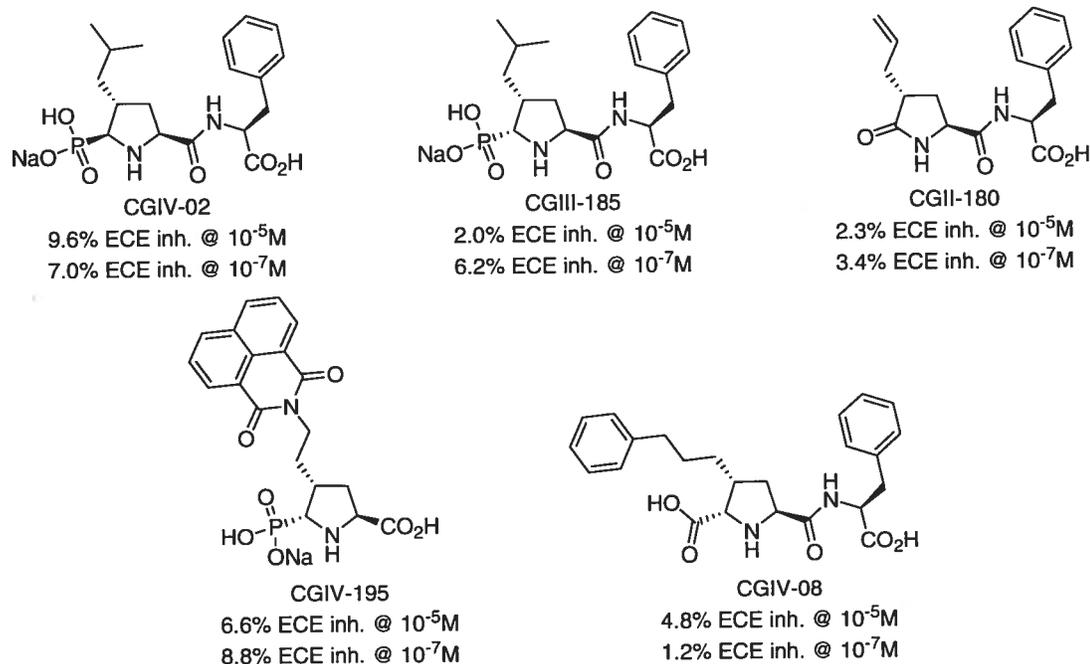


Figure 54 : Vérification de la nécessité des groupes dans la série tri-substituée.

Dans le but d'améliorer l'inhibition de la série tri-substituée, une diversification de l'acide aminé en  $S_2'$  a été essayée (figure 55). Il se trouve que l'homophénylalanine (CGIV-189) et le tryptophane (CGIV-23 et CGIV-194) améliorent quelque peu l'inhibition comparé à la phénylalanine. Une autre diversification effectuée est l'élongation d'un carbone de la chaîne portant le naphthalimide (CGIV-178). Il en résulte une faible réduction de l'inhibition.

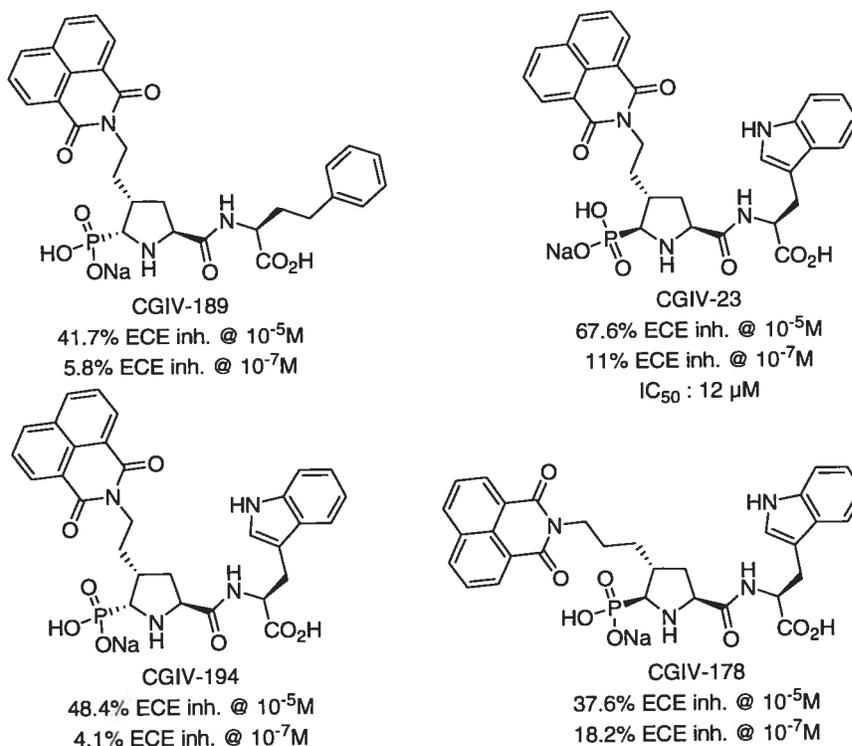


Figure 55 : Variations sur la série tri-substituée.

Dans le cas des inhibiteurs tétra-substitués (figure 56), les résultats sont plus éloquentes. En effet, il y a une grosse différence d'inhibition entre les 2 diastéréoisomères portant les groupes naphthalimide et phénylalanine (GCI-206 et CGIV-13). Il semble donc que les inhibiteurs tétra-substitués dérivés de l'acide *R*-(+)-pyroglutamique non naturel soient plus actifs que l'autre. La nécessité du groupe naphthalimide est encore prouvée avec une diminution de l'inhibition pour les composés CGIV-27 et CGIV-15.

Le composé GCI-206 ayant un  $IC_{50}$  de 3  $\mu$ M, il est intéressant de le diversifier afin de pousser l'étude. Un remplacement de la phénylalanine par une homophénylalanine (GCII-138) ou un tryptophane (GCII-199) entraîne une amélioration de l'inhibition comme dans le cas des inhibiteurs tri-substitués. De plus, un test plus récent indique que le composé GCII-199 possède un  $IC_{50}$  de 100 nM, ce qui en fait un composé intéressant pour une étude plus poussée.

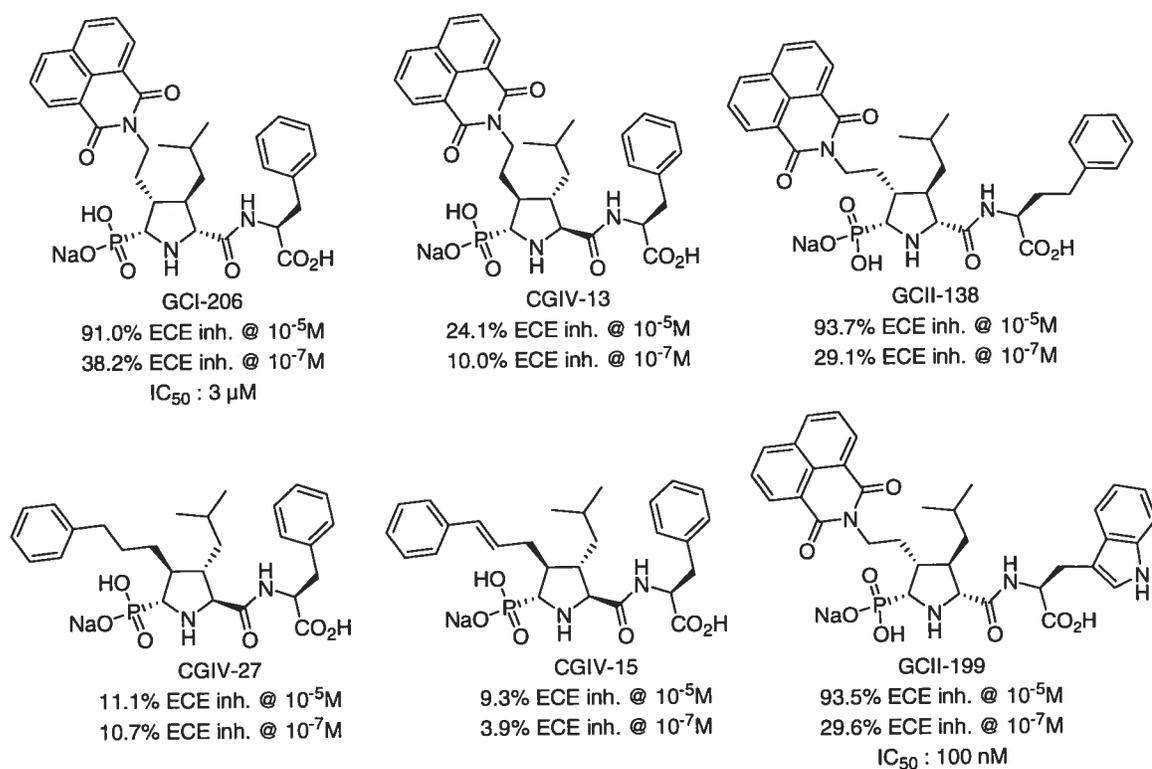


Figure 56 : Résultats des inhibiteurs tétra-substitués.

## Travaux futurs

Quelques suggestions de travaux futures peuvent être proposés (figure 57). Notamment de remplacer le groupe isobutyle par un arylacétyle (41) ou un dibenzofurane (42) comme dans les études de Novartis (figure 15). Ils obtiennent des  $IC_{50}$  de 6-33 nM avec des inhibiteurs qui n'ont même pas de substituants en  $S_1$ . Il serait intéressant de voir le comportement d'un tel composé face à l'ECE.

La configuration à l'acide phosphonique semble importer peu dans notre étude. Cela est peut-être dû à ce que l'acide phosphonique est trop près du cycle. La différence entre le groupe chélateur par en haut ou par en bas est trop semblable pour engendrer une grande différence d'inhibition. L'ajout d'un carbone pour créer une chaîne portant l'acide

phosphonique (**43**) éloignera celui-ci du cycle en plus de lui conférer plus de portée et de flexibilité conformationnelle.

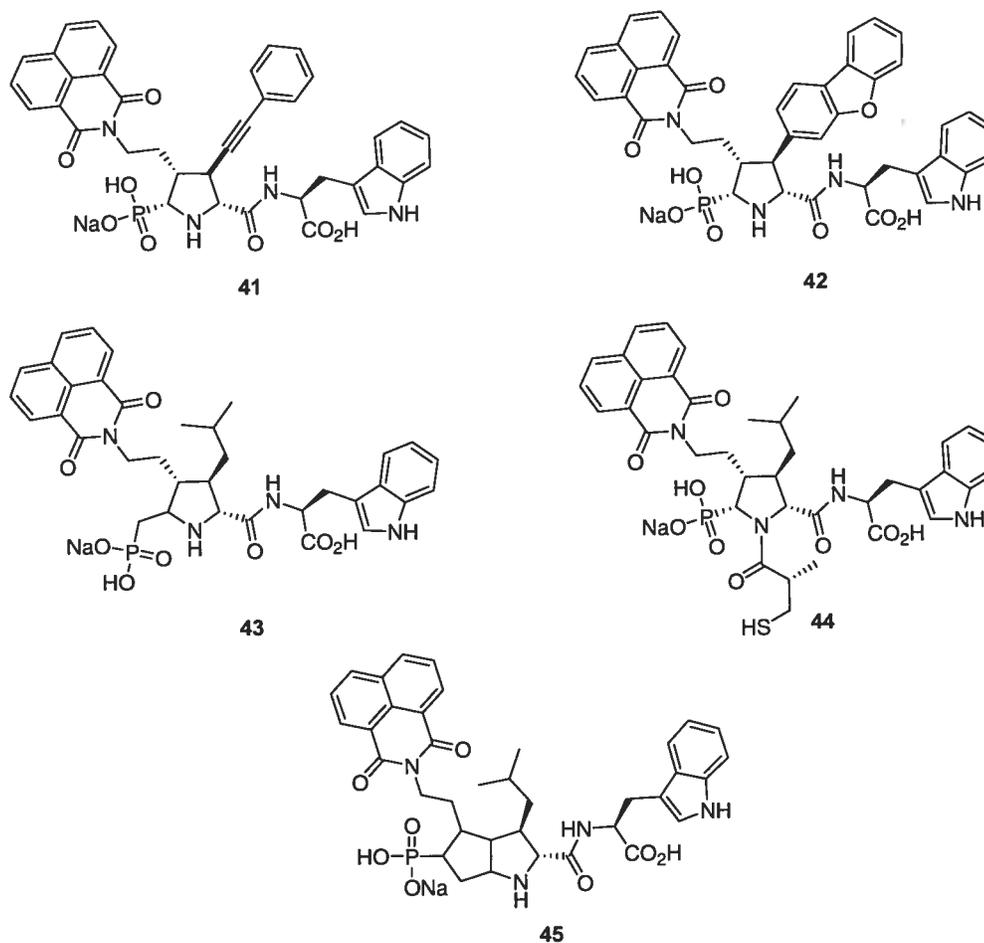


Figure 57 : Propositions de travaux futurs

Un inhibiteur double de l'ECE et de l'ECA pourrait aussi être souhaitable pour certaines applications thérapeutiques. Un inhibiteur de l'ECA connu, le captopril, possède un groupe proline facilement associable à la pyrrolidine de nos inhibiteurs. Il serait donc possible de greffer une queue sur l'azote de la pyrrolidine (**44**) qui correspondrait au captopril. Il en résulterait des inhibiteurs doubles penta-substitués.

Finalement, il pourrait être intéressant d'espacer les substituants isobutyle et naphthalimide pour vérifier s'ils sont bien placés optimalement au cœur du site actif de l'enzyme. Un composé de type bicyclique (45) pourrait bien convenir à cette approche.

## **Conclusion**

Plusieurs inhibiteurs de l'ECE ont été synthétisés et testés *in vitro*. Aucune relation structure-activité n'a pu être déduite en ce qui a trait à la stéréochimie si ce n'est pour le composé GCII-206 qui semble avoir la meilleure stéréochimie. Il faut par contre spécifier que tous les diastéréoisomères possibles n'ont pas été synthétisés dans la série tétra-substituée. Néanmoins, la nécessité de tous les groupes a été vérifiée.

Bref, le groupe isobutyle en S<sub>1</sub>' semble améliorer de beaucoup l'activité inhibitrice. Le tryptophane est un meilleur choix d'acide aminé en S<sub>2</sub>' que la phénylalanine. Il est défavorable d'allonger la chaîne portant le naphthalimide. Tel que déjà rapporté dans la littérature (*Curr. Pharm. Des.* **1997**, 3, 597), plus le groupe hydrophobe en S<sub>1</sub> est volumineux, plus l'activité est grande.

## Chapitre 4 Section expérimentale

### *Instrumentation*

Les spectres infra-rouge ont été enregistrés avec un spectrophotomètre Perkin-Elmer FTIR Paragon 1000. Les échantillons ont été déposés en solution sur une pastille de NaCl et le solvant a été évaporé.

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été pris en solution dans des tubes de Pyrex avec un appareil Bruker 400MHz ou 300MHz. Les déplacements chimiques sont exprimés en parties par million (ppm) selon l'échelle  $\delta$  et ont comme référence le solvant utilisé (7.27 ppm pour le  $\text{CDCl}_3$ , 4.80 ppm pour le  $\text{D}_2\text{O}$ ). Les valeurs des constantes de couplage  $J$  sont exprimées en Hertz (Hz). Les symboles employés pour la description de la multiplicité sont les suivants :

s : singulet	t : triplet
d : doublet	q : quadruplet
dd : doublet de doublets	qt : quintuplet
ddd : doublet de doublets de doublets	m : multiplet
br : pic large	

Les spectres de masse ont été enregistrés avec un spectromètre Kratos MS-50 TCTA ou VG-autospec-C1 par la technique de bombardement d'atomes rapides (FAB). Seul les fragments moléculaires de haute résolution ont été assignés.

## **Chromatographie**

La plupart des produits ont été purifiés par chromatographie éclair sur un gel de silice Kieselgel 60 (Merck no 9385, treillis 200-400). Les solvants utilisés comme éluant ont été distillés avant usage.

Des chromatographies sur couche mince (CCM) ont été faites sur des plaques de silice avec support de verre disponibles commercialement pour suivre la progression des réactions (épaisseur 250  $\mu\text{m}$ , Merck, Kieselgel 60 F<sub>254</sub>).

## **Agents révélateurs**

Lumière ultra-violette (254 nm) : Les produits possédant des chromophores qui montrent une absorption dans la région ultraviolette ont été facilement détectés sur la CCM.

Permanganate de potassium : Les plaques ont été immergées dans une solution aqueuse de  $\text{KMnO}_4$  (3 g), de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (20 g) et de 5 mL d'une solution NaOH 5% dans 300 mL d'eau, puis chauffées. La plupart des produits ont donné une tache jaune.

Ninhydrine : Les groupes amines ont été visualisés par l'action de la ninhydrine (2 g) dans le *n*-butanol (600 mL) et l'acide acétique (18 mL). Les plaques sont ensuite chauffées et montrent une tache jaune ou rouge dépendant du type d'amine.

## **Solvants de réaction**

Le méthanol et la *N,N*-diméthylformamide sont utilisés tel quel, sans autre purification, de grade spectrophotométrique disponible commercialement.

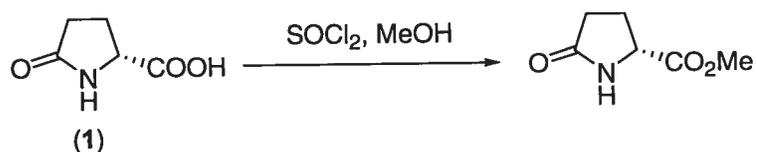
Le tétrahydrofurane (THF), le diéthyl éther ( $\text{Et}_2\text{O}$ ) et le dichlorométhane (DCM) anhydre proviennent d'un système de séchage par colonne SDS.

## Notes

Dans le but de simplifier la nomenclature, le logiciel Autonom (version 2.2) de la société Beilstein a été utilisé pour nommer les composés. Il en résulte des noms anglophones.

## Procédures générales et données expérimentales

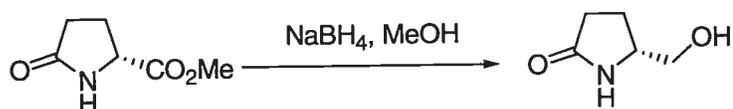
### 5-Oxo-pyrrolidine-(2*R*)-carboxylic acid methyl ester



Une solution d'acide D-pyroglutamique 1 (25.37 g, 196 mmol) dans le méthanol (220 mL) est refroidie dans un bain de glace sèche-méthanol. Du chlorure de thionyle (16 mL, 221 mmol) est ajouté en 15 min à la solution de -25 à -20°C. La solution est laissée réchauffer jusqu'à la température ambiante et agitée 1.5 h de plus. Le solvant du mélange obtenu est évaporé sous pression réduite et donne l'ester, une huile incolore qui est utilisée telle quelle pour la prochaine réaction.

Les données de caractérisation (RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) sont identiques à celles obtenues dans la littérature<sup>73</sup>.

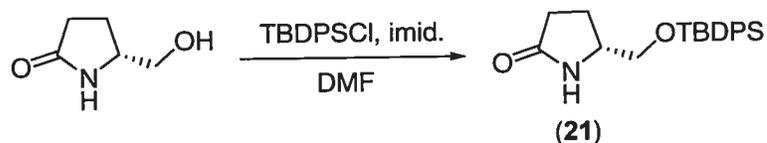
### (5*R*)-Hydroxymethyl-pyrrolidin-2-one



À une solution de l'ester (théoriquement 196 mmol) dans 250 mL de méthanol sous atmosphère d'argon à 0°C est ajouté par portions du borohydrure de sodium (8.36 g, 221 mmol). Une évolution de gaz est observée. La réaction est agitée pendant 1 heure à 0°C puis le pH de la solution est ramené à 6 avec de l'acide acétique glacial ajouté goutte à goutte. Le mélange est passé sur une colonne de gel de silice et de terre de diatomée. La colonne est lavée avec du méthanol chaud. Le solvant est évaporé sous pression réduite puis le résidu est co-évaporée avec du toluène (3 fois) pour donner l'alcool sous la forme d'une huile légèrement teintée de vert qui est utilisée telle quelle pour la réaction suivante.

Les données de caractérisation (RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) sont identiques à celles obtenues dans la littérature<sup>74</sup>.

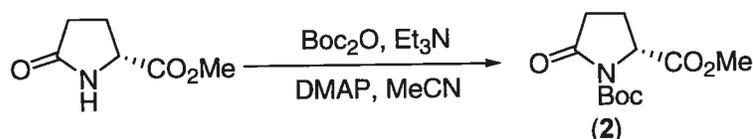
**(5R)-(tert-Butyl-diphenyl-silanyloxymethyl)-pyrrolidin-2-one (21)**



À une solution d'alcool (théoriquement 196 mmol) dans 250 mL de DMF sous atmosphère d'argon à la température ambiante sont ajoutés du chlorure de *tert*-butyldiphénylsilyle (76.4 mL, 294 mmol) et de l'imidazole (40.0 g, 588 mmol). La réaction est agitée pendant 48 heures. La solution est diluée dans de l'éther diéthylique, la phase organique est lavée avec de l'eau (3 fois), puis avec une solution saturée en NaCl, séchée avec du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le mélange est purifié par chromatographie sur gel de silice (EtOAc/hexanes, gradient de 0 : 1 à 3 : 1) pour donner l'alcool protégé **21** (43.6 g, 63%, 3 étapes) sous la forme d'une huile incolore.

Les données de caractérisation (RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) sont identiques à celles obtenues dans la littérature<sup>75</sup>.

**5-Oxo-pyrrolidine-(1,2R)-dicarboxylic acid 1-tert-butyl ester 2-methyl ester (2)**

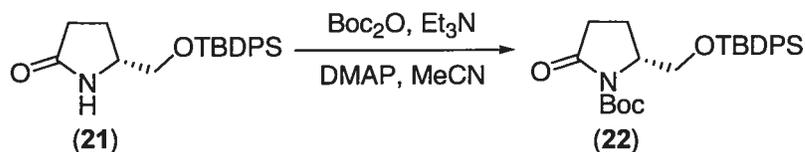


Procédure A :

Du dicarbonate de di-*tert*-butyle (53.3 g, 244 mmol) est ajouté à une solution d'ester (théoriquement 121 mmol) et de DMAP (1.01 g, 9 mmol) dans l'acétonitrile (275 mL) et la triéthylamine (90 mL). Le mélange est agité à température ambiante pendant 48 heures. Le solvant est évaporé sous pression réduite, le résidu est dissout dans l'acétate d'éthyle (350 mL) et lavé successivement avec une solution aqueuse de HCl 1N (350 mL), une solution aqueuse saturée de NaHCO<sub>3</sub> (350 mL) et une solution aqueuse saturée de NaCl (175 mL). La phase organique est séchée avec du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre, filtrée et le filtrat concentré sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (EtOAc/hexanes, 3 : 7) pour donner **2** (22.1 g, 75%, 2 étapes) sous forme de cristaux incolores.

Les données de caractérisation (RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) sont identiques à celles obtenues dans la littérature<sup>76</sup>.

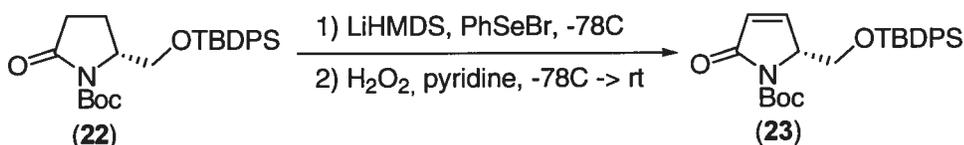
**(2R)-(tert-Butyl-diphenyl-silanyloxymethyl)-5-oxo-pyrrolidine-1-carboxylic acid tert-butyl ester (22)**



La procédure A est utilisée. Le mélange est purifié par chromatographie sur gel de silice (EtOAc/hexanes, 2 : 8) pour donner l'amine protégée **22** (16.9 g, 71% + 10% de produit de départ récupéré) sous la forme d'un solide jaune pâle.

Les données de caractérisation (RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) sont identiques à celles obtenues dans la littérature<sup>77</sup>.

**(2R)-(tert-Butyl-diphenyl-silanyloxymethyl)-5-oxo-2,5-dihydro-pyrrole-1-carboxylic acid tert-butyl ester (23)**



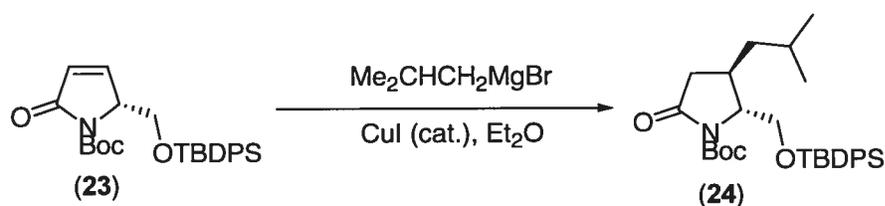
À une solution de la lactame **22** (16.9 g, 37 mmol) dans 250 mL de THF à  $-78^\circ\text{C}$  sous atmosphère d'argon est ajoutée une solution de LiHMDS (41 mL, 1.0 M/THF, 41 mmol) et la solution est agitée à  $-78^\circ\text{C}$  pendant 1 heure. Une solution de bromure de phénylsélane (9.7 g, 41 mmol) dans le THF est préalablement refroidie à  $-78^\circ\text{C}$  avant de l'ajouter par canule à la solution précédente et le mélange est ensuite agité à  $-78^\circ\text{C}$  pendant 5 heures. Une solution aqueuse saturée en  $\text{NH}_4\text{Cl}$  est ajoutée à la solution qui est ensuite extraite avec de l'EtOAc. Les phases organiques combinées sont lavées avec une solution saturée de NaCl, séchées avec du  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydre, filtrées et le filtrat évaporé sous pression réduite.

Le résidu obtenu, une huile rouge, est dissout dans 250 mL de DCM. Cette solution est refroidie à  $-78^\circ\text{C}$  avant que de la pyridine (8.96 mL) et du peroxyde d'hydrogène 30% (12.53 mL) y soient ajoutés lentement. Le mélange est laissé réchauffer sous agitation

jusqu'à la température ambiante. La phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée de NaCl, séchée avec du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre, filtrée et le filtrat est concentré sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (EtOAc/hexanes, 2 : 8) pour donner **23** (14.0 g, 84%, 2 étapes) sous forme de cristaux incolores.

Les données de caractérisation sont identiques à celles obtenues dans la littérature<sup>78</sup>.

**(2R)-(tert-Butyl-diphenyl-silanyloxymethyl)-(3R)-isobutyl-5-oxo-pyrrolidine-1-carboxylic acid tert-butyl ester (24)**



De l'iodure de cuivre(I) placé dans un ballon sous la pompe à palettes est activé au préalable en le chauffant jusqu'à ce que la poudre devienne jaune clair. Dans un ballon préalablement flambé sous courant d'argon est ajoutée une solution 2 M/Et<sub>2</sub>O de bromure d'isobutylmagnésium (8.3 mL, 16.5 mmol) dans de l'éther anhydre à -20°C. L'iodure de cuivre(I) (225 mg, 1.2 mmol) y est ajouté et la suspension est agitée à -20°C pendant 15 minutes. Le mélange devient alors noir. La lactame insaturée **23** (5.3 g, 11.8 mmol), dissoute au préalable dans de l'éther, est additionnée goutte à goutte par canule. Après 3 heures, un mélange équimolaire d'une solution aqueuse saturée en NH<sub>4</sub>Cl et d'une solution aqueuse de NH<sub>4</sub>OH 0.5 M est ajouté et la solution est laissée remonter à la température ambiante. La phase organique est extraite à l'éther, lavée avec une solution saturée de NaCl, séchée avec du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre, filtrée et le filtrat concentré sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (EtOAc/hexanes, gradient de 1.5 : 8.5 à 2 : 8) pour donner **24** (5.4 g, 87%) comme seul isomère sous la forme d'une huile légèrement jaune.

$[\alpha]_D +19.9^\circ$  ( $c = 3.68$ ,  $\text{CHCl}_3$ );

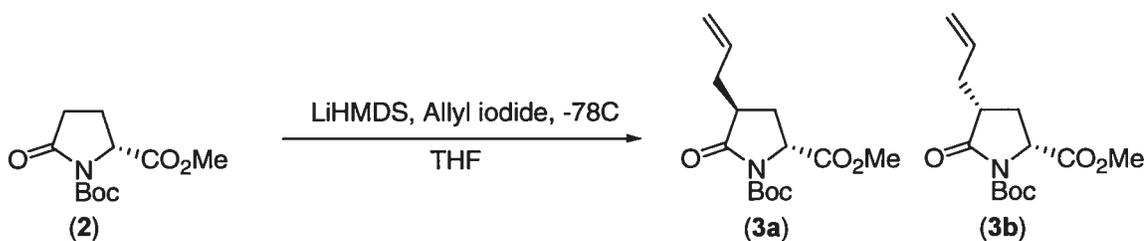
RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.59 (t, 4H, TBDPS-ArH,  $J = 7.7$  Hz); 7.33-7.25 (m, 6H, TBDPS-ArH); 3.88-3.81 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$  et NCH); 3.69 (d, 1H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ,  $J = 9.2$  Hz); 2.86 (dd, 1H,  $\text{O}=\text{CCH}_2$ ,  $J = 8.8, 17.6$  Hz); 2.37 (ddd, 1H, CH,  $J = 7.7, 7.7, 7.7$  Hz); 2.09 (d, 1H,  $\text{O}=\text{CCH}_2$ ,  $J = 17.6$  Hz); 1.60-1.53 (m, 1H, CH); 1.39 (s, 9H, Boc); 1.33-1.21 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 1.01 (s, 9H, TBDPS); 0.85 (d, 6H,  $\text{CH}_3$ ,  $J = 6.4$  Hz);

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  175.0, 150.4, 135.9, 133.3, 130.3, 128.3, 83.2, 65.0, 64.8, 44.9, 39.0, 31.4, 28.4, 27.2, 25.7, 23.2, 22.8, 19.6;

SM : (BR) 410.2 ;

**(4S)-Allyl-5-oxo-pyrrolidine-(1,2R)-dicarboxylic acid 1-tert-butyl ester 2-methyl ester (3a)**

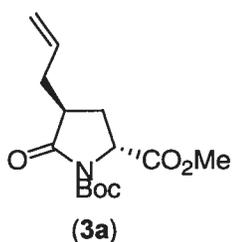
**(4R)-Allyl-5-oxo-pyrrolidine-(1,2R)-dicarboxylic acid 1-tert-butyl ester 2-methyl ester (3b)**



Procédure B :

Dans un ballon préalablement flambé sous un courant d'argon est dissoute la lactame **2** (22.1 g, 91 mmol) dans le THF (0.12 M) puis la solution est refroidie à  $-78^\circ\text{C}$ . Après 15 min d'agitation à cette température, une solution de LiHMDS (95 mL, 1.0 M/THF, 95 mmol) est additionné goutte à goutte sur une période de 30 min puis le mélange est agité pour encore 30 min. Une solution d'iodure d'allyle (9.1 mL, 100 mmol) dans le THF (0.12 M), préalablement refroidie à  $-78^\circ\text{C}$ , est ajoutée lentement par canule et le

mélange réactionnel est agité à  $-78^{\circ}\text{C}$  pendant 9 heures. Une solution aqueuse saturée de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  est alors ajoutée et la solution est laissée remonter jusqu'à température ambiante. Le mélange est extrait avec  $\text{Et}_2\text{O}$ , lavé avec une solution saturée de  $\text{NaCl}$ , séchée avec du  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydre, filtrée et le filtrat concentré sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice ( $\text{EtOAc}$ /hexanes, gradient de 1 : 9 à 2 : 8) pour donner **3a** (10.5 g, 41%) et **3b** (3.1 g, 12%) sous la forme de solides blancs dans un rapport de 3.4 : 1.



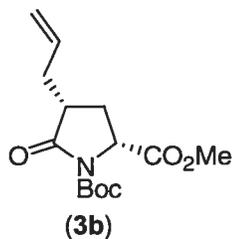
$[\alpha]_{\text{D}} +32.3^{\circ}$  ( $c = 0.47$ ,  $\text{CHCl}_3$ );

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.73 (dddd, 1H, =CH,  $J = 7.0, 7.0, 10.0, 17.0$  Hz); 5.13-5.06 (m, 2H, =CH<sub>2</sub>); 4.57 (dd, 1H, NCH,  $J = 1.7, 9.5$  Hz); 3.78 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.76-2.60 (m, 2H); 2.18 (ddd, 2H,  $J = 1.8, 8.7, 13.4$  Hz); 2.01 (ddd, 1H,  $J = 9.6, 11.4, 13.4$  Hz); 1.50 (s, 9H, Boc);

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  174.2, 171.7, 158.3, 134.2, 117.7, 83.5, 56.8, 52.4, 41.1, 34.3, 27.8, 27.6;

IR (pur) : 2981.4, 1793.1, 1751.9, 1718.4, 1642.4, 1438.7, 1370.8, 1316.9, 1251.7, 1213.5, 1153.3, 1014.4, 955.2, 918.1, 855.4, 802.8, 776.3  $\text{cm}^{-1}$ ;

SM : (BR) 284 ;



$[\alpha]_{\text{D}} -3.4^{\circ}$  ( $c = 0.93$ ,  $\text{CHCl}_3$ );

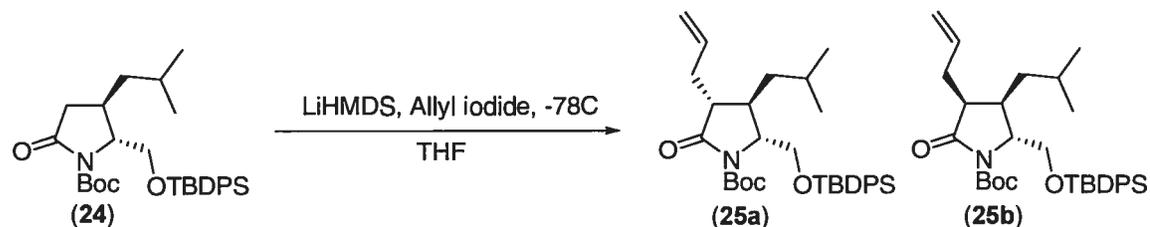
RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.74 (dddd, 1H, =CH,  $J = 6.1, 7.6, 9.6, 17.7$  Hz); 5.10-5.03 (m, 2H, =CH $_2$ ); 4.51 (dd, 1H, NCH,  $J = 7.0, 8.8$  Hz); 3.78 (s, 3H, CH $_3$ ); 2.71-2.60 (m, 2H); 2.47 (ddd, 1H,  $J = 8.9, 8.9, 13.3$  Hz); 2.27-2.16 (m, 1H); 1.73 (ddd, 1H,  $J = 7.7, 7.7, 13.3$  Hz); 1.49 (s, 9H, Boc);

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  174.1, 171.8, 158.7, 134.4, 117.6, 83.6, 57.2, 52.4, 42.0, 35.0, 27.7, 26.7;

IR (pur) : 2981.4, 1792.7, 1752.4, 1720.7, 1439.4, 1370.8, 1319.6, 1256.3, 1210.6, 1152.1, 1020.7, 847.1, 788.4  $\text{cm}^{-1}$ ;

SM : (BR) 284 ;

**(3R)-Allyl-(5R)-(tert-butyl-diphenyl-silanyloxymethyl)-(4R)-isobutyl-2-oxo-pyrrolidine-1-carboxylic acid tert-butyl ester (25a)**



La procédure B est utilisée. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (EtOAc/hexanes, 0.5 : 9.5) pour donner **25a** (2.1 g, 37%) et **25b** (0.5 g, 9%) sous la forme de solides blancs dans un rapport de 4 : 1. Seul le composé **25a** est caractérisé et utilisé par la suite.

$[\alpha]_D +14.9^\circ$  ( $c = 1.49, \text{CHCl}_3$ );

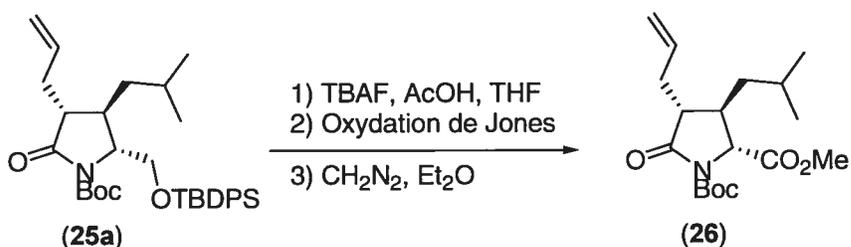
RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.66-7.61 (m, 4H, TBDPS-ArH); 7.46-7.35 (m, 6H, TBDPS-ArH); 5.82-5.73 (m, 1H, =CH); 5.11-5.04 (m, 2H, =CH $_2$ ); 3.83-3.69 (m, 3H, CH $_2\text{O}$  et NCH); 2.60-2.54 (m, 1H); 2.40-2.22 (m, 3H); 1.65-1.56 (m, 1H); 1.42 (s, 9H, Boc); 1.38-1.29 (m, 2H); 1.07 (s, 9H, TBDPS); 0.91 (t, 6H, CH $_3$ ,  $J = 6.3$  Hz);

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  175.8, 149.9, 135.5, 132.9, 132.7, 129.7, 127.7, 117.3, 82.7, 64.1, 63.7, 49.6, 46.3, 36.1, 33.8, 27.8, 26.7, 25.1, 22.6, 19.1;

SM : (BR) 450.3 ;

(HR) calc. pour  $\text{C}_{33}\text{H}_{47}\text{NO}_4\text{NaSi}$  572.317208, obt. 572.318400.

**(4R)-Allyl-(3R)-isobutyl-5-oxo-pyrrolidine-(1,2R)-dicarboxylic acid 1-tert-butyl ester 2-methyl ester (26)**



La lactame **25a** (2.0 g, 3.65 mmol) est mise en solution dans du THF. L'acide acétique est ajouté (0.84 mL, 14.60 mmol) suivit d'une solution 1.0 M/THF de TBAF (4.75 mL, 4.74 mmol) et la solution est agitée pendant 48h. Une solution aqueuse saturée de  $\text{NaHCO}_3$  est ajoutée, le mélange est extrait à l'éther. Les phases organiques combinées sont lavées avec une solution aqueuse saturée de  $\text{NaCl}$ , séchées avec du  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydre, filtrées et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu est utilisé tel quel pour la réaction suivante.

L'alcool obtenu est mis en solution dans l'acétone et le réactif de Jones est additionné goutte à goutte jusqu'à ce qu'une couleur orange-rouge persiste (excès de réactif). La solution est agitée encore 10 min. Une solution aqueuse saturée de  $\text{NaCl}$  est ajoutée au mélange qui est ensuite extrait avec de l'éther. La phase aqueuse est extraite une seconde fois avec de l'EtOAc. Les phases organiques combinées sont séchées avec du  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydre, filtrées et le filtrat est évaporé sous pression réduite pour donner un solide brut utilisé tel quel pour la prochaine réaction.

L'acide carboxylique brut est mis en suspension dans de l'éther à  $0^\circ\text{C}$  et une solution de diazométhane dans de l'éther (fraîchement préparée à partir de Diazald®) est ajoutée

jusqu'à ce que la couleur jaune persiste. Le solvant est alors évaporé sous pression réduite sans chauffer. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (EtOAc/hexanes, 2 : 8) pour donner l'ester **26** (0.8 g, 65%, 3 étapes) sous la forme d'une huile incolore.

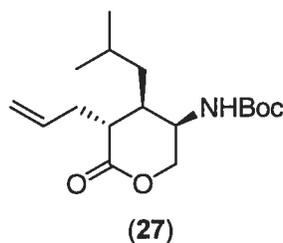
$[\alpha]_D -30.7^\circ$  (c = 0.82, CHCl<sub>3</sub>);

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 5.73 (dddd, 1H, =CH, *J* = 7.2, 7.2, 9.9, 17.3 Hz); 5.10-5.03 (m, 2H, =CH<sub>2</sub>); 4.17 (d, 1H, NCH, *J* = 4.3 Hz); 3.77 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.55-2.49 (m, 1H); 2.39-2.27 (m, 2H); 2.14-2.07 (m, 1H); 1.76-1.69 (m, 1H); 1.49 (s, 10H, Boc et 1H); 1.38-1.31 (m, 1H); 0.90 (dd, 6H, CH<sub>3</sub>, *J* = 6.6, 12.8 Hz);

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 175.0, 172.6, 149.8, 135.1, 118.4, 84.1, 63.9, 52.8, 49.8, 45.6, 36.8, 35.6, 28.3, 25.5, 23.2, 22.5;

SM : (BR) 240.1 ;

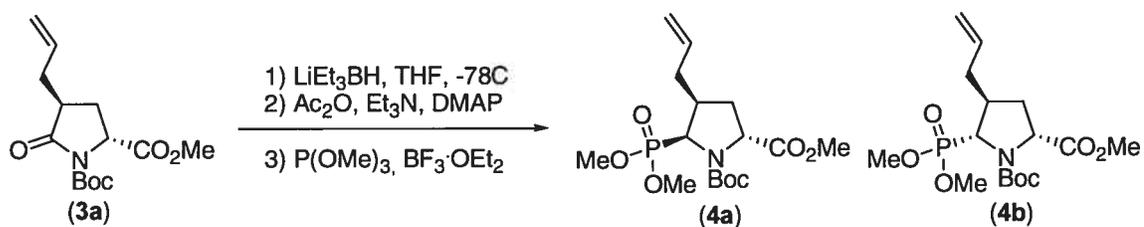
(HR) calc. pour C<sub>18</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>5</sub>Na 362.194343, obt. 362.194900.



RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 6.02 (br, 1H, NH); 5.83-5.67 (m, 1H, =CH); 5.16-5.07 (m, 2H, =CH<sub>2</sub>); 4.23-4.16 (m, 1H, OCH<sub>2</sub>); 3.86-3.77 (m, 1H, OCH<sub>2</sub>); 3.48-3.40 (m, 1H, NCH); 2.47-2.40 (m, 2H); 2.23-2.18 (m, 1H); 1.98-1.87 (m, 1H); 1.69-1.55 (m, 1H); 1.49 (s, 9H, Boc); 1.42-1.36 (m, 2H); 0.95-0.86 (m, 6H, CH<sub>3</sub>);

**(4S)-Allyl-(5S)-(dimethoxy-phosphoryl)-pyrrolidine-(1,2R)-dicarboxylic acid 1-tert-butyl ester 2-methyl ester (4a)**

**(4S)-Allyl-(5R)-(dimethoxy-phosphoryl)-pyrrolidine-(1,2R)-dicarboxylic acid 1-tert-butyl ester 2-methyl ester (4b)**

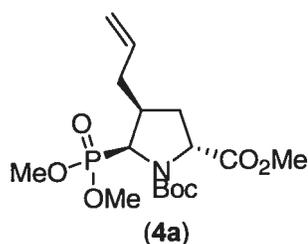


#### Procédure C :

Dans un ballon préalablement séché sous un courant d'argon, la lactame **3a** (10.5 g, 37 mmol) est dissoute dans 200 mL de THF anhydre et refroidie à  $-78^\circ\text{C}$ . Une solution de 1.0 M/THF de Super-Hydrine® (41 mL, 41 mmol) est additionné goutte à goutte sur une période de 30 min puis le mélange est agité à  $-78^\circ\text{C}$  pendant une heure. Une solution aqueuse saturée de  $\text{NaHCO}_3$  est ajoutée suivi de 20 gouttes de peroxyde d'hydrogène 30%. Le mélange est laissé sous agitation pendant 30 min à  $0^\circ\text{C}$ . Après évaporation du THF sous pression réduite, la phase aqueuse est extraite avec du DCM. Les phases organiques combinées sont lavées avec une solution aqueuse saturée de  $\text{NaCl}$ , séchées avec du  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydre, filtrées et le filtrat est évaporé sous pression réduite sans chauffer. Le résidu est utilisé tel quel pour la prochaine réaction.

L'hémiaminal est dissout dans 250 mL de DCM et traité sous agitation, dans l'ordre, avec de la  $\text{Et}_3\text{N}$  (15.5 mL, 111 mmol), de l' $\text{Ac}_2\text{O}$  (10.5 mL, 111 mmol) et du DMAP (0.7 g, 6 mmol). La solution est laissée sous agitation pendant 16 heures à la température ambiante. Une solution aqueuse saturée de  $\text{NaHCO}_3$  est ajoutée et le mélange est extrait au DCM. Les phases organiques combinées sont lavées avec une solution aqueuse saturée de  $\text{NaCl}$ , séchées avec du  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydre, filtrées et le filtrat est évaporé sous pression réduite sans chauffer. Le résidu est utilisé tel quel pour la prochaine réaction.

L'aminal est dissout dans 200 mL de DCM et refroidi à  $-78^{\circ}\text{C}$ . Du  $\text{P}(\text{OMe})_3$  (4.7 mL, 40 mmol) est ajouté goutte à goutte, suivit de  $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$  (4.7 mL, 37 mmol). La solution est agitée 1h à  $-78^{\circ}\text{C}$  et laissée réchauffer à la température ambiante. De l'eau est ajoutée et le mélange est extrait avec du DCM. Les phases organiques combinées sont lavées avec une solution aqueuse saturée de NaCl, séchées avec du  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydre, filtrées et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (EtOAc/hexanes, gradient de 5 : 5 à 1 : 0) pour donner les phosphonates **4a** (4.5 g, 32%, 3 étapes) et **4b** (6.7 g, 48%, 3 étapes) sous la forme de solides blancs dans un ratio de 1 : 1.5.



$[\alpha]_{\text{D}} +10.6^{\circ}$  ( $c = 0.70$ ,  $\text{CHCl}_3$ );

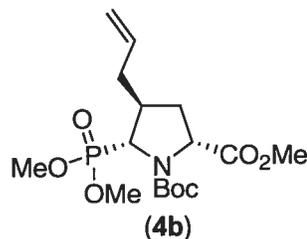
RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.77 (m, 1H, =CH); 5.11-5.00 (m, 2H, =CH<sub>2</sub>); 4.45 (dd, 1H,  $J = 2.7$ , 7.5 Hz); 4.31 (d, 1H,  $J = 8.7$  Hz); 3.77 (d, 3H,  $\text{P}(\text{OMe})_2$ ,  $J = 0.5$  Hz); 3.75 (d, 3H,  $\text{P}(\text{OMe})_2$ ,  $J = 1.1$  Hz); 3.72 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.71-2.43 (m, 3H); 2.31-2.23 (m, 1H); 1.96 (dd, 1H,  $J = 5.8$ , 12.7 Hz); 1.44 (s, 9H, Boc);

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  174.0, 153.7, 136.7, 116.9, 81.2, 59.4, 57.2, 55.7, 53.7, 52.5, 39.6, 35.4, 33.8, 28.5;

RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  25.8;

SM : (BR) 378.1 ;

(HR) calc. pour  $\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{O}_7\text{NP}$  378.16815, obt. 378.16760.



$[\alpha]_D -1.7^\circ$  ( $c = 0.82$ ,  $\text{CHCl}_3$ );

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.71 (dddd, 1H, =CH,  $J = 6.9, 6.9, 10.2, 17.2$  Hz); 5.11-5.04 (m, 2H, =CH<sub>2</sub>); 4.41-4.26 (m, 1H); 4.08-3.99 (m, 1H); 3.86 (d, 3H,  $\text{P}(\text{OMe})_2$ ,  $J = 10.4$  Hz); 3.76 (d, 3H,  $\text{P}(\text{OMe})_2$ ,  $J = 10.6$  Hz); 3.73 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.63-2.47 (m, 2H); 2.13-2.04 (m, 3H); 1.45 (s, 9H, Boc);

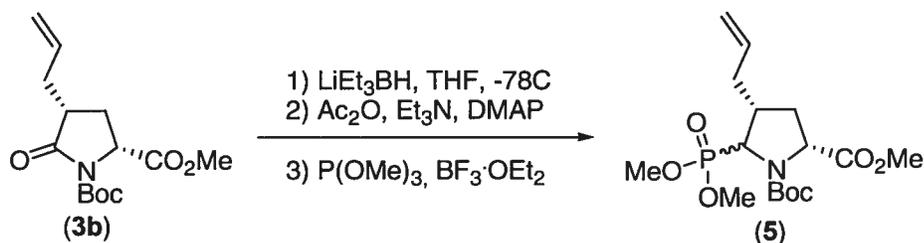
RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.9, 154.3, 135.2, 118.4, 81.4, 59.3, 54.4, 53.0, 52.5, 39.2, 38.4, 34.2, 33.5, 28.5;

RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  26.4;

SM: (BR) 378.1 ;

(HR) calc. pour  $\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{O}_7\text{NP}$  378.16815, obt. 378.16720.

**(4R)-Allyl-5-(dimethoxy-phosphoryl)-pyrrolidine-(1,2R)-dicarboxylic acid 1-tert-butyl ester 2-methyl ester (5)**



La procédure C est utilisée. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (EtOAc/hexanes, 8 : 2) pour donner **5** (3.0 g, 72%), un mélange inséparable, sous la forme d'un solide blanc.

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.84-5.65 (m, 1H, =CH); 5.12-5.01 (m, 2H, =CH<sub>2</sub>); 4.36-4.30 (m, 1H); 4.27-4.20 (m, 1H); 3.94-3.89 (m, 3H,  $\text{P}(\text{OMe})_2$ ); 3.79-3.74 (m, 6H,  $\text{P}(\text{OMe})_2$  et CH<sub>3</sub>); 2.77-2.15 (m, 5H); 1.43 (s, 9H, Boc);

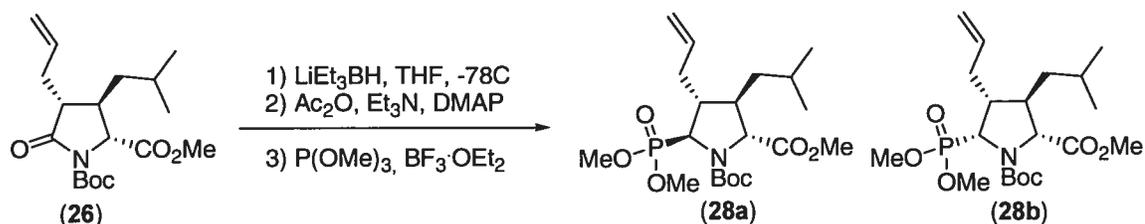
RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.5, 154.2, 136.6, 116.9, 81.8, 60.1, 59.9, 58.6, 56.7, 54.8, 52.4, 41.3, 38.4, 35.1, 34.5, 34.3, 28.5;

RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  27.3, 23.6;

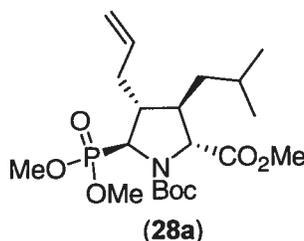
SM : (BR) 378.2 ;

**(4R)-Allyl-(5S)-(dimethoxy-phosphoryl)-(3R)-isobutyl-pyrrolidine-(1,2R)-dicarboxylic acid 1-tert-butyl ester 2-methyl ester (28a)**

**(4R)-Allyl-(5R)-(dimethoxy-phosphoryl)-(3R)-isobutyl-pyrrolidine-(1,2R)-dicarboxylic acid 1-tert-butyl ester 2-methyl ester (28b)**



La procédure C est utilisée. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice ( $\text{EtOAc}$ /hexanes, 3 : 7) pour donner **28a** (262 mg, 29%) et **28b** (544 mg, 58%) sous la forme de solides blancs dans un rapport de 1 : 2.



$[\alpha]_D +36.9^\circ$  ( $c = 2.02$ ,  $\text{CHCl}_3$ );

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.60-5.51 (m, 1H, =CH); 4.94-4.88 (m, 2H, =CH $_2$ ); 3.94 (br, 1H); 3.84 (d, 1H,  $J = 3.7$  Hz); 3.64-3.59 (m, 9H,  $\text{P}(\text{OMe})_2$  et  $\text{CH}_3$ ); 2.34-2.11 (m, 3H); 1.99 (br, 1H); 1.53-1.37 (m, 2H); 1.25 (s, 10H, Boc et 1H); 0.72 (t, 6H, 2CH $_3$ ,  $J = 7.6$  Hz);

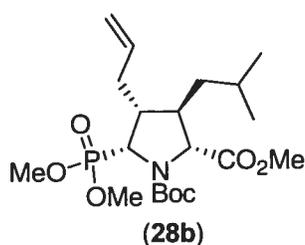
RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173.7, 153.7, 135.9, 118.0, 81.0, 66.4, 60.6, 58.5, 53.2, 52.2, 46.8, 45.0, 44.5, 40.4, 28.3, 25.9, 23.1, 22.3;

RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  28.8;

IR (pur): 3485.7, 3078.5, 2956.5, 2871.7, 2852.8, 1751.7, 1706.4, 1641.3, 1455.8, 1391.6, 1367.8, 1254.2, 1177.1, 1138.2, 1058.7, 1034.0, 917.6, 861.8, 828.7, 771.8, 752.3, 549.8  $\text{cm}^{-1}$ ;

SM: (BR) 434 ;

(HR) calc. pour  $\text{C}_{20}\text{H}_{37}\text{NO}_7\text{P}$  434.230766, obt. 434.232700.



$[\alpha]_{\text{D}} +36.5^\circ$  ( $c = 1.23$ ,  $\text{CHCl}_3$ );

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.77-5.66 (m, 1H, =CH); 4.94-4.82 (m, 2H, =CH<sub>2</sub>); 4.24-4.09 (m, 1H); 3.77-3.63 (m, 4H,  $\text{P}(\text{OMe})_2$  et 1H); 3.57-3.54 (m, 6H,  $\text{P}(\text{OMe})_2$  et  $\text{CH}_3$ ); 2.45-2.35 (m, 2H); 2.17-2.12 (m, 1H); 1.92-1.77 (m, 1H); 1.61-1.57 (m, 1H); 1.29-1.16 (s, 11H, Boc et 2H); 0.68 (dd, 6H, 2 $\text{CH}_3$ ,  $J = 6.5, 12.3$  Hz);

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.9, 153.6, 137.0, 116.2, 81.1, 66.5, 58.0, 55.9, 54.1, 52.0, 48.4, 45.0, 41.7, 31.8, 28.3, 26.3, 23.9, 22.3;

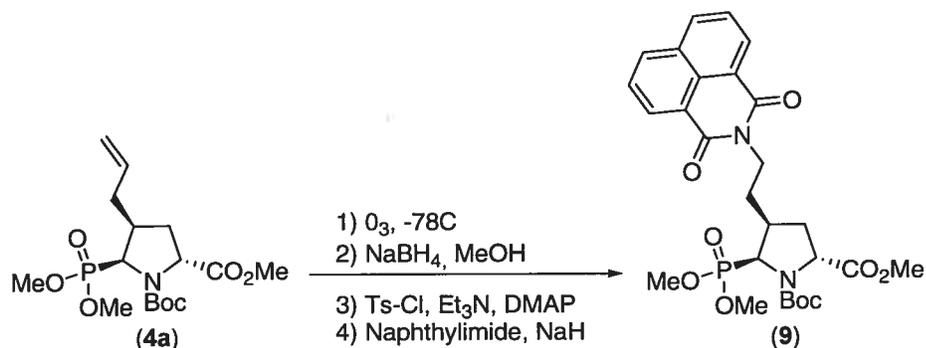
RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  24.6;

IR (pur): 3491.5, 2956.7, 2871.0, 1757.8, 1707.1, 1641.5, 1454.8, 1386.6, 1367.0, 1249.7, 1175.0, 1146.9, 1123.5, 1061.0, 1035.8, 912.8, 865.5, 829.8, 787.5, 762.0  $\text{cm}^{-1}$ ;

SM: (BR) 434 ;

(HR) calc. pour  $\text{C}_{20}\text{H}_{37}\text{NO}_7\text{P}$  434.230766, obt. 434.232200.

**(5S)-(Dimethoxy-phosphoryl)-(4S)-[2-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-yl)-ethyl]-pyrrolidine-(1,2R)-dicarboxylic acid 1-tert-butyl ester 2-methyl ester (9)**



Procédure D :

Le phosphonate **4a** (303 mg, 0.80 mmol) est dissout dans 10 mL de DCM et refroidit à  $-78^\circ C$ . De l'ozone est bullé dans la solution jusqu'à persistance d'une légère couleur bleue indiquant un excès d'ozone. De l'argon est alors bullé jusqu'à ce que la solution redevienne incolore, puis 10 mL de MeOH sont ajoutés à la solution. La solution est réchauffée jusqu'à  $0^\circ C$  et du  $NaBH_4$  (76 mg, 2.0 mmol) est ajouté en une seule portion. Le mélange est agité pendant 1 h à  $0^\circ C$ , puis laissé réchauffer jusqu'à la température ambiante. La réaction est suivie par CCM et du  $NaBH_4$  est périodiquement rajouté, au besoin, jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de d'ozonide ou d'aldéhyde (ils ont le même  $R_f = 0.5$  100% EtOAc) par CCM. L'excès d'hydrure est neutralisé par l'ajout d'une solution aqueuse de HCl 1 N jusqu'à  $pH < 7$ . Le méthanol est évaporé sous pression réduite sans chauffer. Le mélange est extrait avec du DCM. Les phases organiques combinées sont lavées avec une solution aqueuse saturée de NaCl, séchées avec du  $Na_2SO_4$  anhydre et filtrées. Le filtrat est évaporé sous pression réduite pour fournir l'alcool utilisé tel quel pour la prochaine réaction.

Dans un ballon séché sous un courant d'argon, l'alcool est dissout dans 10 mL de DCM anhydre. Sont ajoutés dans l'ordre, de la  $Et_3N$  (167  $\mu L$ , 1.2 mmol), du TsCl (229 mg, 1.2 mmol) et du DMAP (16 mg, 0.13 mmol) en quantité catalytique. La solution est agitée à température ambiante pendant 24h. Une solution aqueuse saturée de  $NH_4Cl$  est ajoutée et le mélange est extrait avec du DCM. Les phases organiques combinées sont lavées avec une solution aqueuse saturée de NaCl, séchées avec du  $Na_2SO_4$  anhydre, filtrées et

le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (MeOH/DCM, 3 : 97) pour donner le tosylate (316 mg, 74%, 3 étapes) utilisé immédiatement pour la prochaine réaction.

Du NaH (95 mg, 60% dans la graisse, 2.36 mmol), dans un ballon séché sous un courant d'argon, est débarrassé de sa graisse par lavages successifs à l'hexane. 5 mL de DMF anhydre sont ajoutés et la solution est ensuite refroidie à 0°C. Le 1,8-naphthyldiamide (524 mg, 2.66 mmol) est ajouté et le mélange est agité à 0°C pendant 30 min. L'alcool tosylé, mis préalablement en solution dans 5 mL de DMF anhydre, est canulé sur le sel de sodium de l'imide. Le mélange est agité 48 h à température ambiante. Une solution aqueuse saturée de NH<sub>4</sub>Cl est ajoutée et le mélange est extrait avec de l'EtOAc. Les phases organiques combinées sont lavées avec une solution aqueuse saturée de NaCl, séchées avec du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre, filtrées et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (EtOAc/hexanes, 1 : 1) pour enlever l'excès de 1,8-naphthyldiamide et (EtOAc/hexanes, 7 : 3) pour donner l'imide **9** (132 mg, 40%) sous la forme d'un solide jaune pâle.

$[\alpha]_D +8.5^\circ$  (c = 1.85, CHCl<sub>3</sub>);

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 8.53 (d, 2H, ArH, *J* = 7.2 Hz); 8.17 (d, 2H, ArH, *J* = 8.2 Hz); 7.71 (dd, 2H, ArH, *J* = 8.0, 7.5 Hz); 4.46-4.16 (m, 4H, PCHNCH et NCH<sub>2</sub>); 3.78-3.70 (m, 9H, P(OMe)<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub>); 2.67-2.57 (m, 2H); 2.30-2.22 (m, 2H); 1.95-1.92 (m, 1H); 1.37 (s, 9H, Boc);

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 173.7, 164.5, 153.6, 134.3, 132.0, 131.5, 128.5, 127.3, 123.0, 81.1, 59.6, 57.4, 55.8, 53.7, 52.5, 39.4, 37.6, 35.4, 28.5, 13.6;

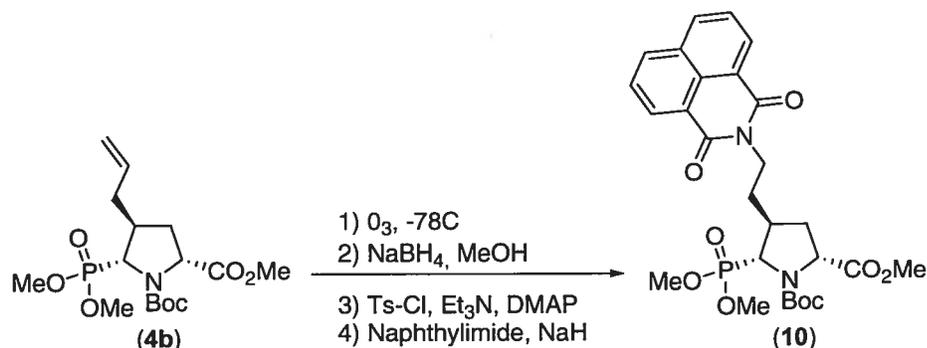
RMN <sup>31</sup>P (CDCl<sub>3</sub>) δ 25.3, 24.9;

IR (pur) : 2956.2, 2360.5, 1748.8, 1701.9, 1662.3, 1627.0, 1591.5, 1439.5, 1366.5, 1312.7, 1238.5, 1207.6, 1176.3, 1157.4, 1130.1, 1032.2, 895.3, 832.3, 780.8, 755.9, 667.5 cm<sup>-1</sup>;

SM : (BR) 561.1 ;

(HR) calc. pour C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>P 561.200195, obt. 561.199200.

**(5R)-(Dimethoxy-phosphoryl)-(4S)-[2-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-yl)-ethyl]-pyrrolidine-(1,2R)-dicarboxylic acid 1-tert-butyl ester 2-methyl ester (10)**



La procédure D est utilisée. Le tosylate a été purifié par chromatographie sur gel de silice (MeOH/DCM, 3 : 97), puis a été utilisé immédiatement pour la prochaine réaction (193 mg, 46%, 3 étapes). L'imide **10** a été purifié par chromatographie sur gel de silice (EtOAc/hexanes, 1 : 1) pour enlever l'excès de 1,8-naphthyldiamide et (EtOAc/hexanes, 7 : 3) afin de récupérer l'imide **10** sous la forme d'un solide jaune pâle (100 mg, 50%).

$[\alpha]_D -4.0^\circ$  ( $c = 1.53$ ,  $CHCl_3$ );

RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  8.58-8.54 (m, 2H, ArH); 8.22-8.18 (m, 2H, ArH); 7.73 (q, 2H, ArH,  $J = 7.3$  Hz); 4.55-4.35 (m, 1H); 4.29-4.04 (m, 3H); 3.86 (d, 3H,  $P(OMe)_2$ ,  $J = 9.6$  Hz); 3.76-3.74 (m, 6H,  $P(OMe)_2$  et  $CH_3$ ); 2.75-2.53 (m, 2H); 2.42-2.19 (m, 1H); 1.98-1.62 (m, 2H); 1.41 (s, 9H, Boc);

RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  172.2, 163.8, 153.1, 133.9, 131.4, 131.1, 128.0, 126.8, 122.3, 80.8, 60.6, 58.5, 53.9, 52.4, 51.9, 38.1, 37.4, 33.4, 31.5, 28.0;

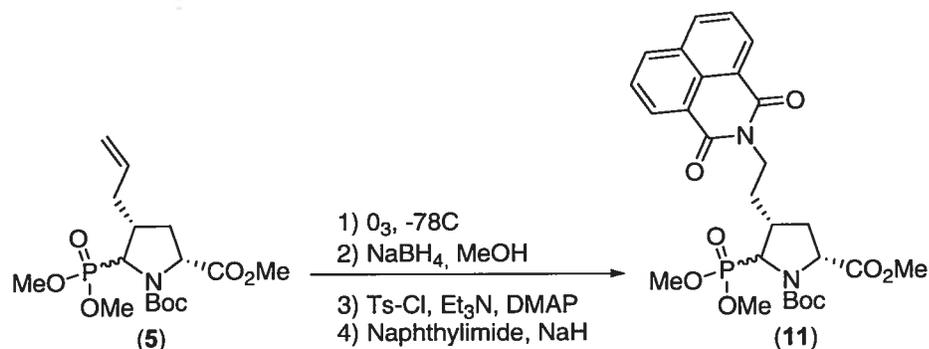
RMN  $^{31}P$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  25.2;

IR (pur) : 2957.2, 1759.6, 1701.0, 1661.7, 1627.3, 1591.7, 1439.2, 1367.6, 1309.8, 1243.9, 1163.0, 1129.2, 1032.3, 836.6, 781.1, 757.5  $cm^{-1}$ ;

SM : (BR) 561.1 ;

(HR) calc. pour  $C_{27}H_{34}N_2O_9P$  561.200195, obt. 561.198600.

**5-(Dimethoxy-phosphoryl)-(4R)-[2-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-yl)-ethyl]-pyrrolidine-(1,2R)-dicarboxylic acid 1-tert-butyl ester 2-methyl ester (11)**



La procédure D est utilisée. Le tosylate a été purifié par chromatographie sur gel de silice (MeOH/DCM, gradient de 3 : 97 à 5 : 95), puis a été utilisé immédiatement pour la prochaine réaction (568 mg, 66%, 3 étapes). L'imide **11** a été purifié par chromatographie sur gel de silice (EtOAc/hexanes, 1 : 1) pour enlever l'excès de 1,8-naphthylidiamide et (EtOAc/hexanes, 7 : 3) pour donner l'imide **11** sous la forme d'un solide jaune pâle (208 mg, 35%).

RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  8.58-8.44 (m, 2H, ArH); 8.22-8.15 (m, 2H, ArH); 7.80-7.63 (m, 2H, ArH); 4.39-4.00 (m, 4H, PCHNCH et  $NCH_2$ ); 3.99-3.82 (m, 3H,  $P(OMe)_2$ ); 3.80-3.63 (m, 6H,  $P(OMe)_2$  et  $CH_3$ ); 2.65-2.47 (m, 1H); 2.43-2.20 (m, 2H); 2.18-1.82 (m, 2H); 1.39 (s, 9H, Boc);

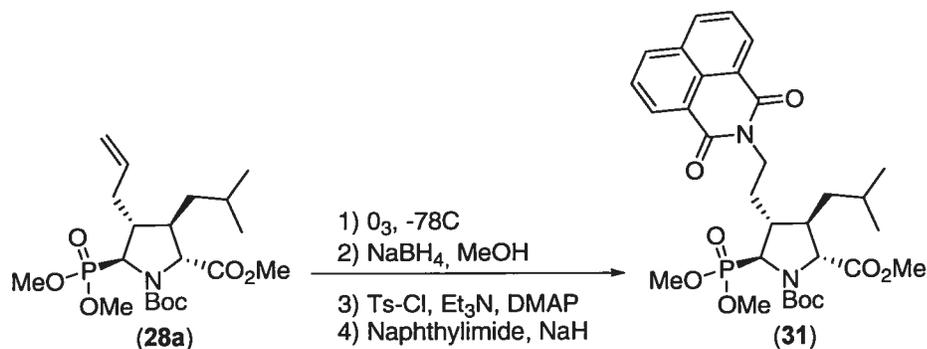
RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  173.7, 172.5, 164.5, 154.0, 134.4, 131.9, 131.6, 128.5, 127.3, 122.9, 81.2, 61.2, 60.7, 59.9, 59.4, 59.2, 58.3, 56.7, 54.4, 52.5, 52.3, 40.4, 39.8, 39.4, 38.7, 37.5, 35.1, 28.5, 28.1, 21.4, 14.6;

RMN  $^{31}P$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  23.8, 23.6;

SM : (BR) 561.1 ;

(HR) calc. pour  $C_{27}H_{34}N_2O_9P$  561.200195, obt. 561.198100.

**(5S)-(Dimethoxy-phosphoryl)-(4R)-[2-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-yl)-ethyl]-(3R)-isobutyl-pyrrolidine-(1,2R)-dicarboxylic acid 1-tert-butyl ester 2-methyl ester (31)**



La procédure D est utilisée. Le tosylate a été purifié par chromatographie sur gel de silice (EtOAc/hexanes, 1 : 1), puis a été utilisé immédiatement pour la prochaine réaction (184 mg, 52%, 3 étapes). L'imide **31** a été purifié par chromatographie sur gel de silice (EtOAc/hexanes, 2 : 8) pour enlever l'excès de 1,8-naphthylidiamide et (EtOAc/hexanes, 7 : 3) pour donner l'imide **31** sous la forme d'une huile incolore (57 mg, 30%).

$[\alpha]_D +23.0^\circ$  ( $c = 0.91$ ,  $CHCl_3$ );

RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  8.53 (d, 2H, ArH,  $J = 7.2$  Hz); 8.17 (d, 2H, ArH,  $J = 8.2$  Hz); 7.70 (t, 2H, ArH,  $J = 7.8$  Hz); 4.26-4.01 (m, 4H, PCHNCH et  $NCH_2$ ); 3.80-3.70 (m, 9H,  $P(OMe)_2$  et  $CH_3$ ); 2.48-2.14 (m, 2H); 2.01-1.93 (m, 2H); 1.71-1.62 (m, 2H); 1.38 (s, 10H, Boc et 1H); 0.93-0.87 (m, 6H, 2 $CH_3$ );

RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  173.7, 164.2, 153.9, 134.4, 131.9, 131.5, 128.4, 127.3, 122.9, 81.2, 66.5, 61.6, 59.5, 53.4, 52.5, 47.3, 44.7, 44.3, 38.8, 34.8, 28.5, 26.2, 23.5, 22.3;

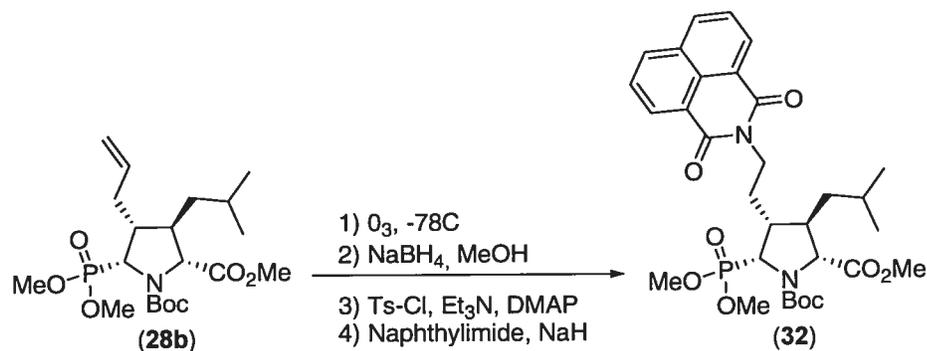
RMN  $^{31}P$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  28.8;

IR (pur) : 2956.5, 2361.9, 1749.5, 1702.1, 1663.0, 1627.4, 1591.7, 1513.9, 1438.6, 1391.3, 1367.1, 1236.1, 1175.2, 1032.4, 877.8, 827.4, 780.8, 755.0  $cm^{-1}$ ;

SM : (BR) 617.2 ;

(HR) calc. pour  $C_{31}H_{42}N_2O_9P$  617.262795, obt. 617.261192.

**(5R)-(Dimethoxy-phosphoryl)-(4R)-[2-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-yl)-ethyl]-(3R)-isobutyl-pyrrolidine-(1,2R)-dicarboxylic acid 1-tert-butyl ester 2-methyl ester (32)**



La procédure D est utilisée. Chromatographie sur gel de silice (EtOAc/hexanes, 1 : 1) pour donner le tosylate (193 mg, 58%, 3 étapes) utilisé immédiatement pour la prochaine réaction. Chromatographie sur gel de silice (EtOAc/hexanes, 4 : 6) pour enlever l'excès de 1,8-naphthylidiamide et (EtOAc/hexanes, 7 : 3) pour donner l'imide **32** (100 mg, 46%) sous la forme d'un solide blanc.

$[\alpha]_D +18.6^\circ$  ( $c = 1.14$ ,  $CHCl_3$ );

RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  8.54 (d, 2H, ArH,  $J = 7.2$  Hz); 8.16 (d, 2H, ArH,  $J = 7.6$  Hz); 7.70 (t, 2H, ArH,  $J = 7.2$  Hz); 4.63-4.58 (m, 1H); 4.41-4.17 (m, 2H); 3.86 (t, 7H,  $P(OMe)_2$  et 1H,  $J = 11.8$  Hz); 3.69 (s, 3H,  $CH_3$ ); 2.71-2.53 (br, 1H); 2.37-2.15 (m, 1H); 2.08-1.86 (m, 2H); 1.78-1.12 (m, 1H); 1.40 (s, 9H, Boc); 1.40-1.18 (m, 2H); 0.85-0.67 (m, 6H, 2 $CH_3$ );

RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  172.6, 163.9, 153.1, 133.7, 131.4, 131.0, 127.9, 126.7, 122.4, 80.7, 66.0, 57.5, 55.9, 53.9, 51.9, 46.1, 44.6, 41.6, 41.0, 39.4, 28.0, 25.8, 23.5, 21.9;

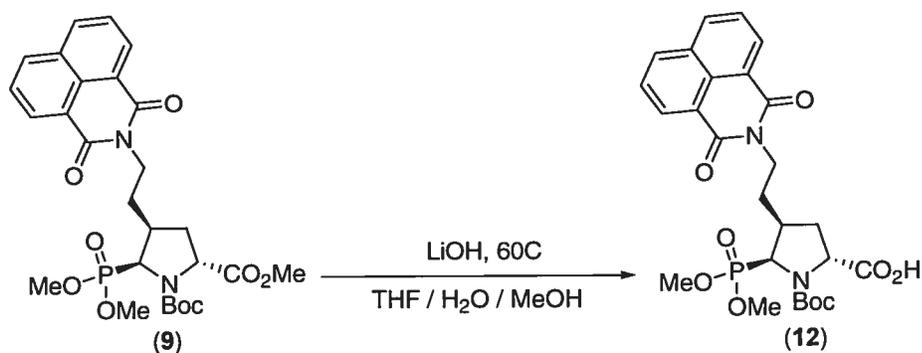
RMN  $^{31}P$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  24.4, 24.1;

IR (pur) : 3455.5, 2957.0, 2360.8, 1755.7, 1702.6, 1662.9, 1627.4, 1591.5, 1439.2, 1386.2, 1367.3, 1247.7, 1174.9, 1148.1, 1060.3, 1033.7, 832.3, 781.5, 755.8  $cm^{-1}$ ;

SM : (BR) 617.2 ;

(HR) calc. pour  $C_{31}H_{42}N_2O_9P$  617.262795, obt. 617.260922.

**(5S)-(Dimethoxy-phosphoryl)-(4S)-[2-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-yl)-ethyl]-pyrrolidine-(1,2R)-dicarboxylic acid 1-tert-butyl ester (12)**



Procédure E :

L'ester **9** (132 mg, 0.24 mmol) est dissout dans 2 mL d'un mélange THF/H<sub>2</sub>O/MeOH (5 : 4 : 1). Du LiOH.H<sub>2</sub>O (20 mg, 0.47 mmol) est ajouté et le mélange est laissé 48 h sous agitation à 60°C. Une quantité égale d'EtOAc et d'une solution aqueuse saturée de NaHCO<sub>3</sub> est ajoutée au mélange. La phase organique est extraite avec une solution aqueuse saturée de NaHCO<sub>3</sub>. Les phases aqueuses combinées sont acidifiées avec du HCl jusqu'à ce que l'acide précipite (pH ≈ 3), puis extraites avec du DCM. Les phases organiques combinées sont séchées avec du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre, filtrées et le filtrat est évaporé sous pression réduite pour donner l'acide **12** (74 mg, 56%) sous la forme d'une mousse blanche.

$[\alpha]_D +8.5^\circ$  (c = 0.92, CHCl<sub>3</sub>);

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 9.36-9.16 (br, 1H, COOH); 8.51 (d, 2H, ArH, *J* = 7.0 Hz); 8.13 (d, 2H, ArH, *J* = 7.4 Hz); 7.67 (t, 2H, ArH, *J* = 7.2 Hz); 4.49-4.09 (m, 4H, PCHNCH et NCH<sub>2</sub>); 3.77 (dd, 6H, P(OMe)<sub>2</sub>, *J* = 6.8, 10.6 Hz); 2.77-2.56 (m, 2H); 2.36-2.23 (m, 2H); 2.06-1.92 (m, 1H); 1.38 (s, 9H, Boc);

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  177.3, 163.9, 153.1, 133.8, 131.3, 131.1, 127.9, 126.7, 122.3, 80.9, 58.8, 57.1, 55.0, 52.6, 38.8, 37.2, 34.9, 27.9, 27.5;

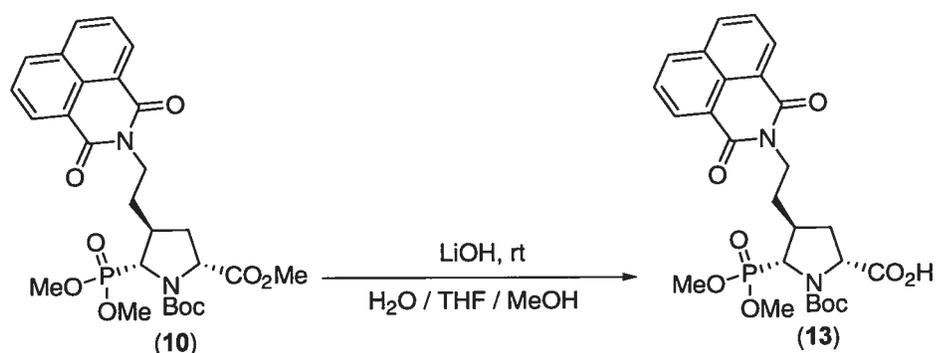
RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  26.1, 25.8;

IR (pur) : 2959.4, 1738.1, 1701.8, 1662.1, 1626.3, 1591.2, 1514.0, 1440.3, 1367.6, 1309.0, 1235.7, 1174.9, 1035.1, 913.9, 846.1, 780.2, 756.4, 667.2  $\text{cm}^{-1}$ ;

SM : (BR) 546.9 ;

(HR) calc. pour  $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_9\text{P}$  547.184544, obt. 547.184326.

**(5R)-(Dimethoxy-phosphoryl)-(4S)-[2-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-yl)-ethyl]-pyrrolidine-(1,2R)-dicarboxylic acid 1-tert-butyl ester (13)**



Procédure F :

L'ester **10** (100 mg, 0.18 mmol) est dissout dans 2 mL d'un mélange THF/H<sub>2</sub>O/MeOH (5 : 4 : 1). Du LiOH·H<sub>2</sub>O (20 mg, 0.47 mmol) est ajouté et le mélange est laissé 16 h sous agitation à la température ambiante. Une quantité égale d'EtOAc et d'une solution aqueuse saturée de NaHCO<sub>3</sub> est ajoutée au mélange. La phase organique est extraite avec une solution aqueuse saturée de NaHCO<sub>3</sub>. Les phases aqueuses combinées sont acidifiées avec du HCl jusqu'à ce que l'acide précipite (pH  $\approx$  3), puis extraites avec du DCM. Les phases organiques combinées sont séchées avec du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre, filtrées et le filtrat est évaporé sous pression réduite pour donner l'acide **13** (97 mg, 99%) sous la forme d'une mousse blanche.

$[\alpha]_D -15.5^\circ$  ( $c = 1.25$ ,  $\text{CHCl}_3$ );

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.57 (d, 2H, ArH,  $J = 7.3$  Hz); 8.22 (d, 2H, ArH,  $J = 8.0$  Hz); 7.75 (t, 2H, ArH,  $J = 7.7$  Hz); 4.48-4.42 (m, 1H); 4.30-4.12 (m, 3H); 3.90 (d, 3H,  $\text{P}(\text{OMe})_2$ ,  $J = 10.8$  Hz); 3.72 (d, 3H,  $\text{P}(\text{OMe})_2$ ,  $J = 10.6$  Hz); 2.71-2.62 (m, 1H); 2.46-2.28 (m, 2H); 1.85-1.71 (m, 2H); 1.24 (s, 9H, Boc);

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173.8, 164.5, 154.0, 134.7, 131.7, 129.4, 128.6, 127.4, 122.8, 82.9, 61.3, 58.6, 55.3, 53.4, 38.1, 34.5, 32.3, 28.5, 21.9;

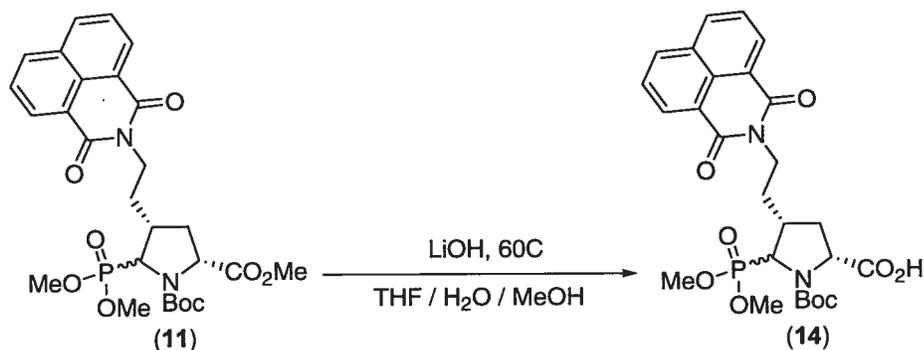
RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  31.6, 28.6;

IR (pur): 3437.6, 2917.9, 2850.0, 1699.4, 1660.0, 1591.5, 1440.1, 1369.1, 1236.2, 1164.4, 1043.6, 846.4, 780.1  $\text{cm}^{-1}$ ;

SM: (BR) 546.9;

(HR) calc. pour  $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_9\text{P}$  547.184544, obt. 547.185600.

**5-(Dimethoxy-phosphoryl)-(4R)-[2-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-yl)-ethyl]-pyrrolidine-(1,2R)-dicarboxylic acid 1-tert-butyl ester (14)**



La procédure E est utilisée. L'acide **14** (168 mg, 83%) est obtenu sous la forme d'une mousse blanche.

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.56 (d, 2H, ArH,  $J = 7.3$  Hz); 8.21 (d, 2H, ArH,  $J = 7.8$  Hz); 7.74 (t, 2H, ArH,  $J = 7.7$  Hz); 4.48 (t, 1H,  $J = 6.4$  Hz); 4.33-4.25 (m, 3H); 3.84 (t, 6H,  $\text{P}(\text{OMe})_2$ ,  $J = 9.7$  Hz); 2.64-2.14 (m, 4H); 2.01-1.97 (m, 1H); 1.44 (s, 9H, Boc);

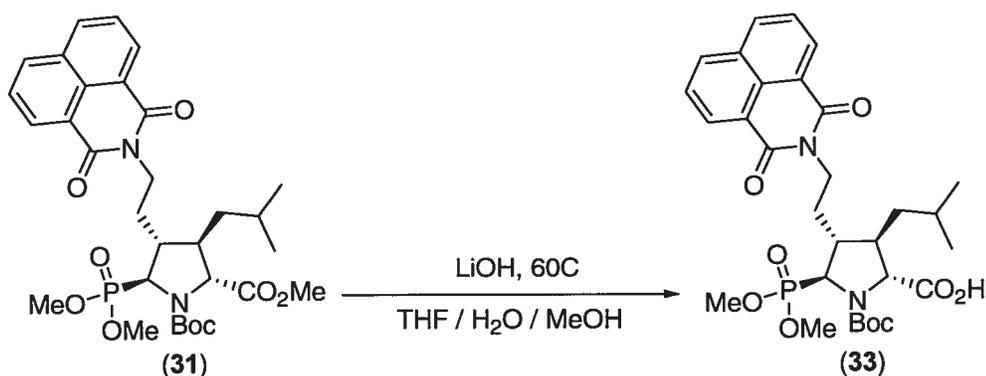
RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173.6, 164.6, 154.7, 134.5, 131.8, 129.4, 128.6, 127.4, 122.8, 82.4, 61.8, 55.4, 53.0, 52.9, 40.0, 39.4, 35.3, 28.5, 21.9;

RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  27.4, 25.9;

SM : (BR) 546.9 ;

(HR) calc. pour  $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_9\text{P}$  547.184544, obt. 547.186200.

**(5S)-(Dimethoxy-phosphoryl)-(4R)-[2-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-yl)-ethyl]-(3R)-isobutyl-pyrrolidine-(1,2R)-dicarboxylic acid 1-tert-butyl ester (33)**



La procédure E est utilisée. L'acide **31** (52 mg, 94%) est obtenu sous la forme d'une huile incolore.

$[\alpha]_{\text{D}} +28.2^\circ$  ( $c = 1.04$ ,  $\text{CHCl}_3$ );

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.59 (br, 1H, COOH); 8.53 (d, 2H, ArH,  $J = 7.0$  Hz); 8.18 (d, 2H, ArH,  $J = 7.9$  Hz); 7.71 (t, 2H, ArH,  $J = 7.6$  Hz); 4.24-4.04 (m, 4H); 3.83-3.73 (m, 6H); 2.49-2.37 (m, 2H); 1.99-1.88 (m, 2H); 1.73-1.69 (m, 2H); 1.41 (s, 9H, Boc); 1.23 (s, 1H); 0.96-0.86 (m, 6H, 2CH<sub>3</sub>);

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173.4, 164.2, 157.3, 134.4, 131.9, 131.6, 128.4, 127.3, 122.9, 83.7, 66.8, 62.0, 53.4, 52.7, 46.6, 44.7, 44.2, 38.8, 34.6, 28.5, 26.3, 23.5, 22.2;

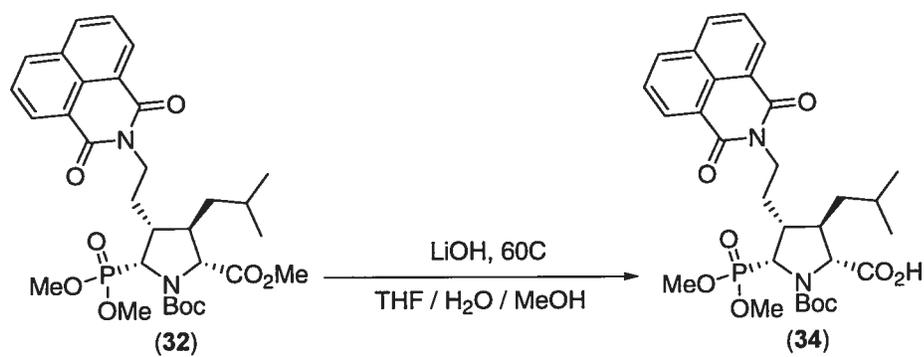
RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  25.9;

IR (pur) : 2657.9, 2131.7, 1748.2, 1702.0, 1662.9, 1627.4, 1591.8, 1514.1, 1438.7, 1392.4, 1368.6, 1235.6, 1175.7, 1050.4, 989.3, 877.3, 847.2, 780.4, 756.6, 666.5  $\text{cm}^{-1}$ ;

SM : (BR) 603.1 ;

(HR) calc. pour  $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_9\text{P}$  603.247145, obt. 603.246620.

**(5R)-(Dimethoxy-phosphoryl)-(4R)-[2-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-yl)-ethyl]-(3R)-isobutyl-pyrrolidine-(1,2R)-dicarboxylic acid 1-tert-butyl ester (34)**



La procédure E est utilisée. L'acide **34** (94 mg, 96%) est obtenu sous la forme d'une huile incolore.

$[\alpha]_{\text{D}} +15.9^\circ$  ( $c = 1.47$ ,  $\text{CHCl}_3$ );

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10.54-10.36 (br, 1H, COOH); 8.55 (d, 2H, ArH,  $J = 7.3$  Hz); 8.20 (d, 2H, ArH,  $J = 8.1$  Hz); 7.73 (t, 2H, ArH,  $J = 7.8$  Hz); 4.75 (t, 1H,  $J = 6.4$  Hz); 4.47-4.06 (m, 2H); 3.93 (d, 3H,  $\text{P}(\text{OMe})_2$ ,  $J = 11.3$  Hz); 3.83 (d, 3H,  $\text{P}(\text{OMe})_2$ ,  $J = 10.5$  Hz); 3.71 (t, 1H,  $J = 6.6$  Hz); 2.53 (br, 1H); 2.17-1.90 (m, 2H); 1.86-1.77 (m, 2H); 1.45 (s, 9H, Boc); 1.31-1.14 (m, 2H); 0.85-0.71 (m, 6H, 2 $\text{CH}_3$ );

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.9, 164.0, 154.1, 134.0, 131.4, 131.2, 128.0, 126.8, 122.3, 82.1, 67.8, 57.2, 54.9, 52.6, 46.1, 44.4, 42.1, 39.1, 27.9, 26.8, 25.4, 23.8, 21.4;

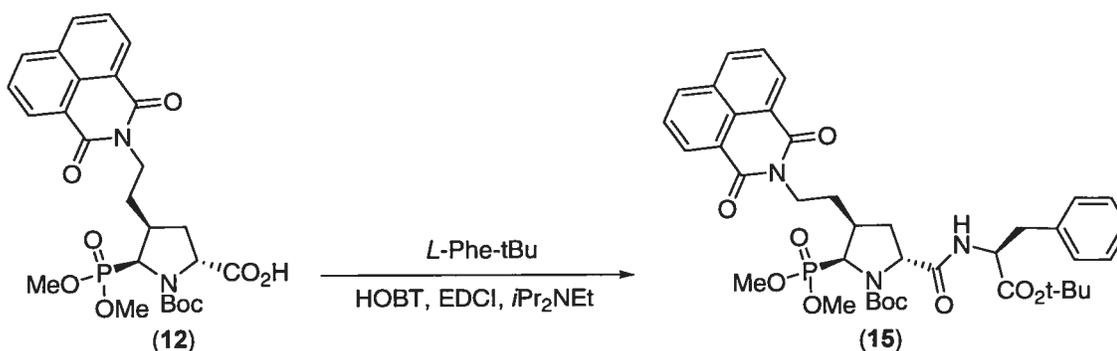
RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  28.8;

IR (pur) : 2959.6, 1748.9, 1702.6, 1662.4, 1626.7, 1591.4, 1442.0, 1386.4, 1368.6, 1236.8, 1175.6, 1151.3, 1039.5, 846.7, 781.5, 757.1, 666.9  $\text{cm}^{-1}$ ;

SM : (BR) 603.1 ;

(HR) calc. pour  $C_{30}H_{40}N_2O_9P$  603.247145, obt. 603.245828.

**(5R)-[(1S)-tert-Butoxycarbonyl-2-phenyl-ethylcarbamoyl]-(2S)-(dimethoxy-phosphoryl)-(3S)-[2-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-yl)-ethyl]-pyrrolidine-1-carboxylic acid tert-butyl ester (15)**



Procédure G :

Dans un ballon préalablement flambé sous courant d'argon, l'amine (42 mg, 0.16 mmol) sous forme de sel HCl est mis en suspension dans du DCM à 0°C. La base  $i\text{Pr}_2\text{NEt}$  (28  $\mu\text{L}$ , 0.16 mmol) est ajoutée, suivie de HOBT (26 mg, 0.19 mmol) et de l'acide carboxylique **12** (74 mg, 0.14 mmol), préalablement dissout dans du DCM. Le mélange est agité 15 min à 0°C et EDCI (52 mg, 0.18 mmol) est additionné. Le tout est laissé 48h sous agitation à température ambiante. La phase organique est lavée successivement avec une solution aqueuse saturée de  $\text{NaHCO}_3$ , une solution aqueuse de HCl 1N, une solution aqueuse saturée de NaCl, séchée avec du  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydre, filtrée et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (EtOAc/hexanes, 6 : 4) pour donner le produit final sous forme protégée **15** (50 mg, 49%) sous la forme d'un solide blanc.

$[\alpha]_D +30.2^\circ$  ( $c = 0.53$ ,  $\text{CHCl}_3$ );

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.53 (d, 2H, ArH,  $J = 7.2$  Hz); 8.18 (d, 2H, ArH,  $J = 8.1$  Hz); 7.67 (t, 2H, ArH,  $J = 7.7$  Hz); 7.32-7.20 (m, 5H, Ph); 4.76 (ddd, 1H,  $J = 6.5, 6.5, 7.3$  Hz); 4.48 (dd, 1H,  $J = 2.2, 7.7$  Hz); 4.33-4.23 (m, 1H); 4.21-4.15 (m, 1H); 4.13 (d, 1H,  $J = 8.9$  Hz); 3.75 (dd, 6H,  $\text{P}(\text{OMe})_2$ ,  $J = 5.7, 10.6$  Hz); 3.12 (d, 2H,  $J = 6.4$  Hz); 2.75-2.47 (m, 2H); 2.33-2.24 (m, 1H); 2.12-1.87 (m, 2H); 1.37 (s, 9H, Boc); 1.32 (s, 9H,  $\text{CO}_2t\text{-Bu}$ );

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.2, 171.0, 164.5, 153.9, 136.7, 134.3, 132.0, 131.6, 130.1, 128.8, 128.6, 127.4, 127.3, 123.1, 82.7, 80.9, 60.8, 57.6, 56.1, 53.7, 52.7, 39.5, 39.3, 37.2, 36.1, 28.5, 28.3, 27.9;

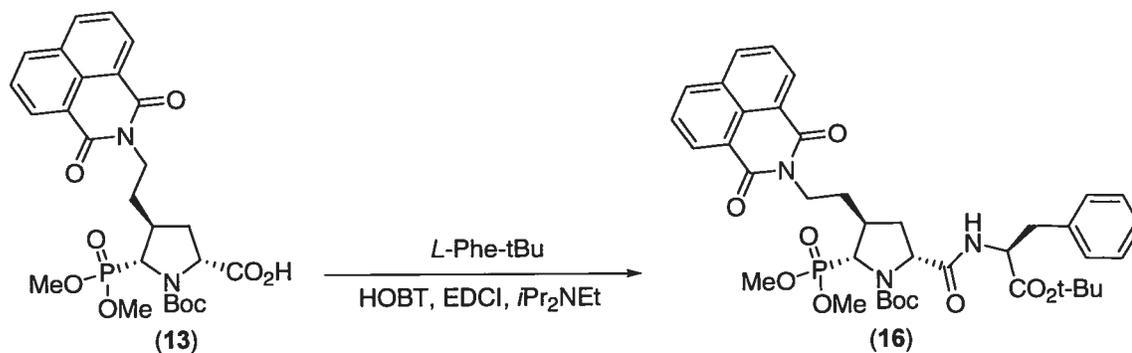
RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  26.0;

IR (pur): 3268.5, 2978.8, 1735.8, 1702.2, 1662.9, 1627.3, 1591.5, 1546.9, 1497.7, 1455.5, 1367.5, 1234.0, 1159.5, 1129.0, 1064.4, 1035.1, 977.0, 930.7, 837.5, 780.6, 755.6, 700.6, 666.6  $\text{cm}^{-1}$ ;

SM: (BR) 750.9 ;

(HR) calc. pour  $\text{C}_{39}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{P}$  750.315559, obt. 750.317400.

**(5R)-[(1S)-tert-Butoxycarbonyl-2-phenyl-ethylcarbamoyl]-(2R)-(dimethoxyphosphoryl)-(3S)-[2-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-yl)-ethyl]-pyrrolidine-1-carboxylic acid tert-butyl ester (16)**



La procédure G est utilisée. Le produit final sous forme protégée **16** (47 mg, 32%) est obtenu sous la forme d'un solide blanc.

$[\alpha]_D +3.3^\circ$  ( $c = 0.88$ ,  $\text{CHCl}_3$ );

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.57 (d, 2H, ArH,  $J = 7.3$  Hz); 8.30 (br, 1H, NH); 8.20 (d, 2H, ArH,  $J = 8.3$  Hz); 7.74 (t, 2H, ArH,  $J = 7.8$  Hz); 7.26-7.14 (m, 5H, Ph); 4.62-4.60 (m, 1H); 4.32-4.03 (m, 4H); 3.80 (d, 3H,  $\text{P}(\text{OMe})_2$ ,  $J = 10.6$  Hz); 3.73 (d, 3H,  $\text{P}(\text{OMe})_2$ ,  $J = 9.8$  Hz); 3.20-2.98 (m, 2H); 2.75-2.66 (m, 1H); 2.55 (ddd, 1H,  $J = 7.5, 7.5, 13.0$  Hz); 2.24-2.12 (m, 1H); 1.91-1.80 (m, 1H); 1.77-1.64 (m, 1H); 1.37 (s, 9H, Boc); 1.27 (s, 9H,  $\text{CO}_2t\text{-Bu}$ );

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.0, 171.2, 164.4, 155.1, 137.7, 134.5, 132.0, 131.7, 129.6, 128.7, 128.5, 127.4, 126.9, 122.9, 81.8, 81.7, 62.9, 60.8, 59.2, 55.0, 53.5, 38.8, 38.0, 35.7, 32.4, 28.5, 28.3, 14.6;

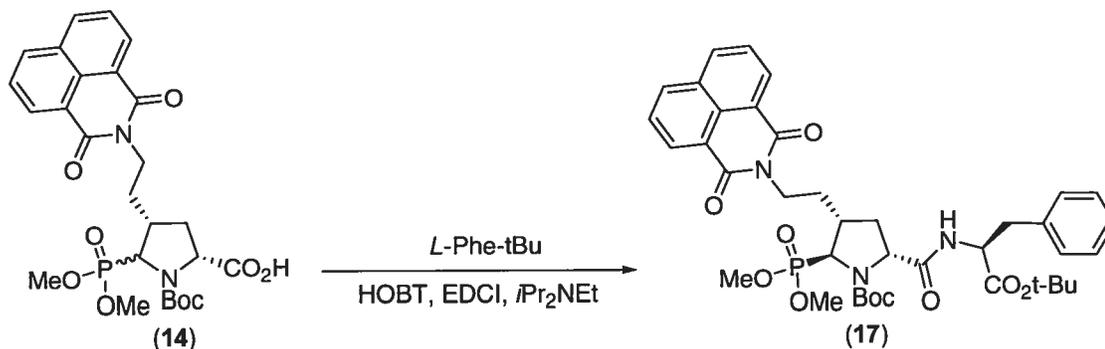
RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  29.8;

IR (pur): 3458.3, 2978.9, 2113.9, 1702.1, 1662.7, 1591.8, 1546.5, 1498.0, 1455.6, 1368.0, 1236.9, 1160.4, 1129.6, 1035.9, 847.3, 781.5, 754.8, 701.0  $\text{cm}^{-1}$ ;

SM: (BR) 750.9;

(HR) calc. pour  $\text{C}_{39}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{P}$  750.315559, obt. 750.315100.

**(5R)-[(1S)-tert-Butoxycarbonyl-2-phenyl-ethylcarbamoyl]-(2S)-(dimethoxyphosphoryl)-(3R)-[2-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-yl)-ethyl]-pyrrolidine-1-carboxylic acid tert-butyl ester (17)**



La procédure G est utilisée. Le produit final sous forme protégée **17** (86 mg, 37%) est obtenu sous la forme d'un solide blanc.

$[\alpha]_D +16.6^\circ$  ( $c = 0.94$ ,  $\text{CHCl}_3$ );

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.59 (d, 2H, ArH,  $J = 7.3$  Hz); 8.22 (d, 2H, ArH,  $J = 8.3$  Hz); 7.76 (t, 2H, ArH,  $J = 8.1$  Hz); 7.78-7.16 (m, 5H, Ph); 4.72-4.68 (m, 1H); 4.52 (t, 1H,  $J = 7.5$  Hz); 4.28-4.19 (m, 3H); 3.86 (d, 3H,  $\text{P}(\text{OMe})_2$ ,  $J = 10.6$  Hz); 3.64 (d, 3H,  $\text{P}(\text{OMe})_2$ ,  $J = 10.6$  Hz); 3.07 (d, 2H,  $J = 6.8$  Hz); 2.59-2.17 (m, 4H); 2.04-1.95 (m, 1H); 1.37 (s, 9H, Boc); 1.32 (s, 9H,  $\text{CO}_2t\text{-Bu}$ );

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171.9, 170.6, 164.7, 154.9, 136.9, 134.5, 132.0, 131.8, 129.6, 128.8, 128.6, 127.4, 127.2, 122.9, 82.4, 82.3, 63.1, 61.3, 54.6, 54.0, 53.7, 39.8, 39.4, 38.3, 36.2, 28.4, 28.3, 14.2;

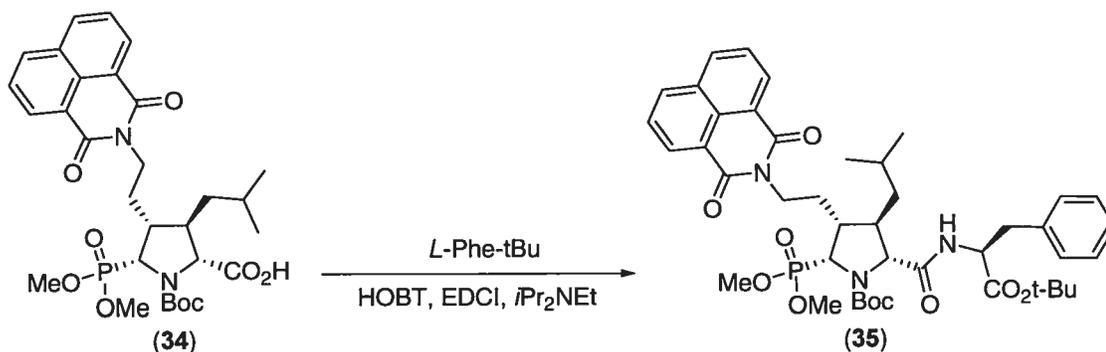
RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  26.9;

IR (pur) : 3283.4, 2979.6, 2362.0, 1702.8, 1664.0, 1627.2, 1591.3, 1515.2, 1455.9, 1368.3, 1237.0, 1158.5, 1034.7, 836.8, 780.7, 756.5, 700.2  $\text{cm}^{-1}$ ;

SM : (BR) 750.9 ;

(HR) calc. pour  $\text{C}_{39}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{P}$  750.315559, obt. 750.318900.

**(2R)-[(1S)-tert-Butoxycarbonyl-2-phenyl-ethylcarbamoyl]-(5R)-(dimethoxyphosphoryl)-(4R)-[2-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-yl)-ethyl]-(3R)-isobutyl-pyrrolidine-1-carboxylic acid tert-butyl ester (35)**



La procédure G est utilisée. Le produit final sous forme protégée **35** (63 mg, 50%) est obtenu sous la forme d'un solide blanc.

$[\alpha]_D +36.1^\circ$  ( $c = 1.45$ ,  $\text{CHCl}_3$ );

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.58 (d, 2H, ArH,  $J = 7.1$  Hz); 8.19 (d, 2H, ArH,  $J = 8.1$  Hz); 7.73 (t, 2H, ArH,  $J = 7.5$  Hz); 7.23-7.18 (m, 5H, Ph); 4.74 (br, 2H); 4.36 (br, 2H); 3.92 (d, 3H,  $\text{P}(\text{OMe})_2$ ,  $J = 9.3$  Hz); 3.74 (br, 1H); 3.67 (d, 3H,  $\text{P}(\text{OMe})_2$ ,  $J = 10.2$  Hz); 3.06-2.99 (m, 2H); 2.54 (br, 1H); 2.21-1.92 (m, 4H); 1.77 (br, 1H); 1.39 (s, 9H, Boc); 1.30 (s, 10H,  $\text{CO}_2t\text{-Bu}$  et 1H); 0.75 (t, 6H,  $2\text{CH}_3$ ,  $J = 6.1$  Hz);

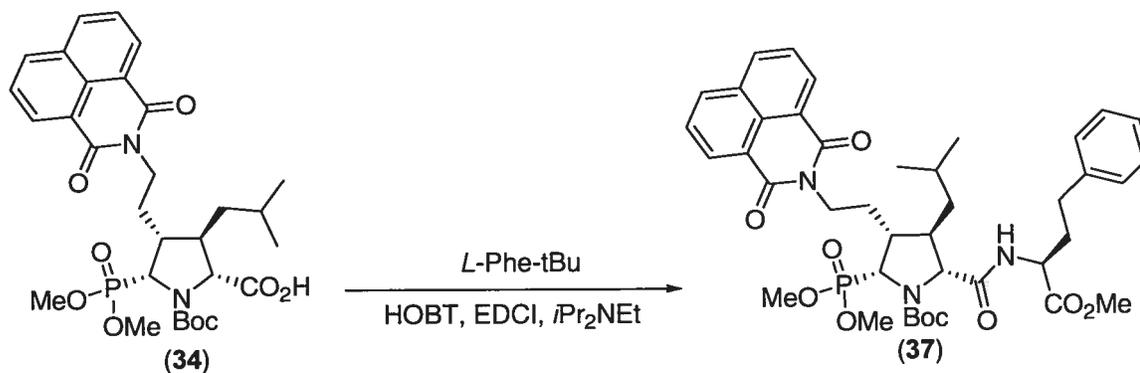
RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.3, 171.1, 164.6, 154.9, 137.4, 134.3, 132.0, 131.6, 129.8, 128.6, 127.3, 126.9, 124.3, 123.1, 81.7, 81.6, 64.8, 60.9, 54.3, 53.8, 53.2, 46.5, 42.5, 39.9, 39.0, 28.6, 28.3, 27.3, 25.8, 24.2, 22.4, 14.6;

RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  26.5;

IR (pur): 3264.9, 2956.9, 2869.8, 1737.1, 1703.0, 1663.9, 1627.3, 1591.3, 1543.7, 1498.0, 1455.6, 1367.7, 1294.1, 1235.9, 1154.1, 1036.3, 968.7, 926.0, 835.4, 781.6, 755.3, 700.5, 665.8  $\text{cm}^{-1}$ ;

SM: (BR) 806.5 ;

**(2R, 3R, 4R, 5R)-2-[(1S)-Methoxycarbonyl-3-phenyl-propylcarbamoyl]-5-(dimethoxy-phosphoryl)-4-[2-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-yl)-ethyl]-3-isobutyl-pyrrolidine-1-carboxylic acid tert-butyl ester (37)**



La procédure G est utilisée. Le produit final sous forme protégée **37** (49 mg, 52%) est obtenu sous la forme d'un solide beige.

$[\alpha]_D +26.9^\circ$  ( $c = 1.27$ ,  $\text{CHCl}_3$ );

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.60 (d, 2H, ArH,  $J = 7.3$  Hz), 8.22 (d, 2H, ArH,  $J = 8.1$  Hz), 7.76 (t, 2H, ArH,  $J = 7.8$  Hz), 7.29-7.14 (m, 5H, Ph), 4.77 (br, 1H), 4.57 (ddd, 1H,  $J = 4.9, 8.4, 8.4$  Hz), 4.39 (br, 1H), 4.31 (br, 1H), 3.96 (d, 3H,  $\text{P}(\text{OMe})_2$ ,  $J = 10.6$  Hz), 3.85 (d, 4H,  $\text{P}(\text{OMe})_2$  and 1H,  $J = 10.5$  Hz), 3.65 (s, 3H,  $\text{CO}_2\text{Me}$ ), 2.71-2.59 (m, 3H), 2.16-1.98 (m, 5H), 1.89-1.78 (m, 1H), 1.43 (s, 9H, Boc), 1.32 (t, 2H,  $J = 6.8$  Hz), 0.78 (t, 6H,  $J = 8.1$  Hz);

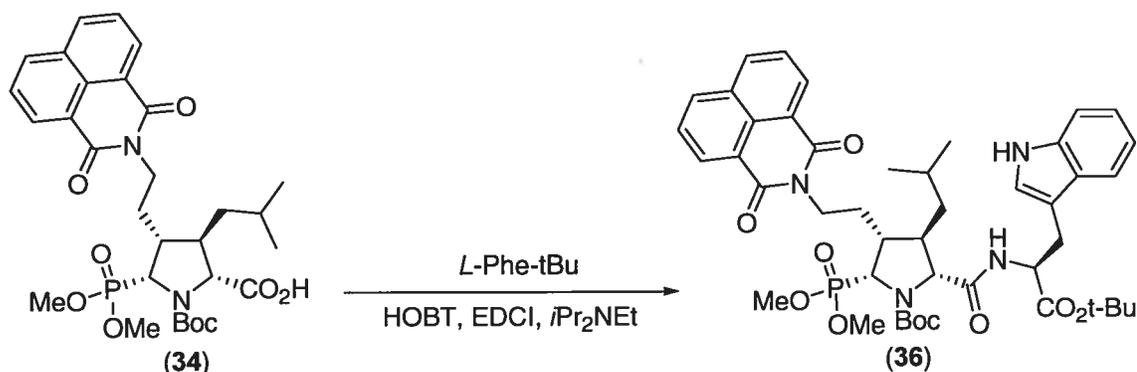
RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.9, 164.7, 162.1, 154.8, 141.4, 134.4, 132.0, 131.7, 128.9, 128.8, 128.6, 127.4, 126.4, 123.0, 81.9, 67.2, 60.8, 54.5, 53.2, 52.4, 46.6, 42.6, 39.8, 34.6, 32.5, 28.6, 27.2, 25.7, 24.4, 22.1, 21.8, 14.6;

RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  26.9;

IR (pur) 3267.5, 2955.9, 2868.4, 1747.5, 1702.2, 1662.7, 1627.0, 1591.1, 1551.3, 1497.9, 1455.4, 1366.0, 1236.2, 1173.4, 1151.2, 1034.4, 835.2, 781.3, 755.0, 701.2  $\text{cm}^{-1}$ ;

SM: (BR) 776.8;

**(2R, 3R, 4R, 5R)-2-[(1S)-tert-Butoxycarbonyl-2-(1H-indol-3-yl)-ethylcarbamoyl]-5-(dimethoxy-phosphoryl)-4-[2-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-yl)-ethyl]-3-isobutyl-pyrrolidine-1-carboxylic acid tert-butyl ester (36)**



La procédure G est utilisée. Le produit final sous forme protégée **36** (35 mg, 42%) est obtenu sous la forme d'un solide beige.

$[\alpha]_D +34.7^\circ$  ( $c = 0.97$ ,  $\text{CHCl}_3$ );

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.60 (d, 2H, ArH,  $J = 7.2$  Hz), 8.21 (dd, 2H, ArH,  $J = 0.9, 8.3$  Hz), 7.75 (t, 2H, ArH,  $J = 7.4$  Hz), 7.31 (d, 1H, indole,  $J = 6.9$  Hz), 7.19-7.03 (m, 4H, indole), 4.85 (ddd, 1H,  $J = 5.5, 5.5, 7.9$  Hz), 4.73 (br, 1H), 4.34 (br, 2H), 3.92 (br, 3H,  $\text{P}(\text{OMe})_2$ ), 3.78 (br, 3H,  $\text{P}(\text{OMe})_2$ ), 3.34-3.21 (m, 1H), 3.18 (br, 2H), 2.58 (br, 1H), 2.14 (br, 2H), 1.93 (s, 1H), 1.88-1.77 (m, 1H), 1.58 (br, 1H), 1.39 (s, 9H, Boc), 1.25 (s, 9H,  $\text{CO}_2t\text{-Bu}$ ), 0.98-0.88 (m, 1H), 0.76 (t, 6H,  $2\text{CH}_3$ ,  $J = 6.8$  Hz);

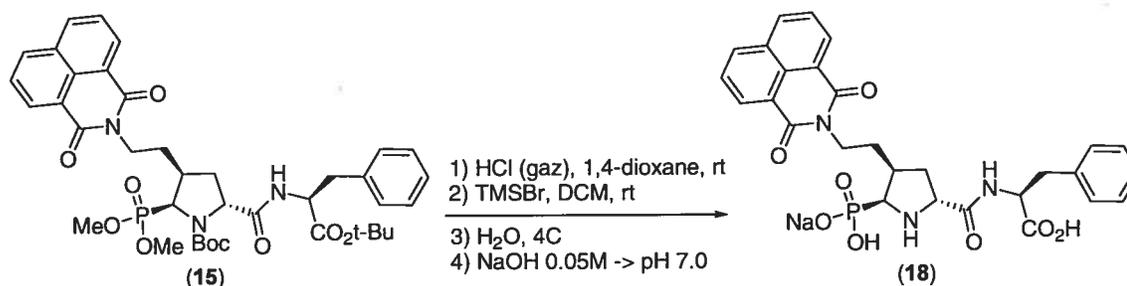
RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  185.3, 172.5, 171.1, 164.1, 135.9, 133.8, 131.4, 131.1, 128.0, 127.4, 126.8, 122.5, 121.9, 121.7, 119.1, 118.6, 111.1, 110.8, 81.1, 80.9, 70.1, 65.0, 60.2, 53.3, 52.6, 45.9, 41.7, 39.3, 28.3, 27.9, 27.6, 26.6, 25.2, 23.7, 21.7, 14.0;

RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  27.4;

IR (neat/ $\text{NaCl}$ ) 3295.3, 3060.3, 2956.9, 1733.7, 1701.8, 1662.0, 1626.5, 1590.9, 1537.2, 1458.0, 1367.8, 1235.8, 1155.6, 1035.7, 836.5, 781.5, 741.6  $\text{cm}^{-1}$ ;

SM: (BR) 845.6;

**(2S)-((4S)-[2-(1,3-Dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-yl)-ethyl]-(5S)-phosphono-pyrrolidine-(2R)-carbonyl)-amino)-3-phenyl-propionic acid (**18**)**



Procédure H :

Dans un ballon séché, le produit final sous forme protégée **15** (53 mg, 0.071 mmol) est mis en solution dans le 1,4-dioxane anhydre. Du HCl gazeux est bullé dans la solution pendant 1 h puis le mélange est porté au reflux pendant 6 h et parfois laissé encore plusieurs heures à température ambiante jusqu'à complétion par spectrométrie de masse du mélange réactionnel brut. Le solvant est alors évaporé et le résidu obtenu est mis en suspension dans du DCM. Les ultrasons permettent d'avoir une dispersion plus homogène. La solution sous argon est refroidie à 0°C et du TMSBr (40 µL, 0.30 mmol) est additionné lentement. La solution devient alors orange et limpide. Le tout est agité pendant 1 à 2 jours à température ambiante. Le solvant est évaporé et l'ajout de H<sub>2</sub>O déionisée (2mL) fait apparaître un précipité blanc. Le mélange est alors laissé sous agitation dans la chambre froide (4°C) pendant 16 h puis la suspension est reprise dans un vial et centrifugée pendant 10 min à 4 °C. La liqueur surnageante est enlevée, le culot est suspendu encore une fois dans de l'eau déionisée (2mL) et est centrifugé de nouveau. La liqueur surnageante est enlevée. Le culot beige est mis en suspension dans 2 mL d'eau déionisée et le pH est ajusté à 7.0 avec une solution de NaOH 0.05 M (environ 0.071 mmol) dans de l'eau déionisée. Les ultrasons peuvent être utilisés pour accélérer la solubilisation dans certains cas. Après filtration sur micropores et lyophilisation de la solution, le produit final **18** (36 mg, 90%) est obtenue sous la forme d'une mousse blanche.

$[\alpha]_D -47.8^\circ$  (c = 0.09, H<sub>2</sub>O);

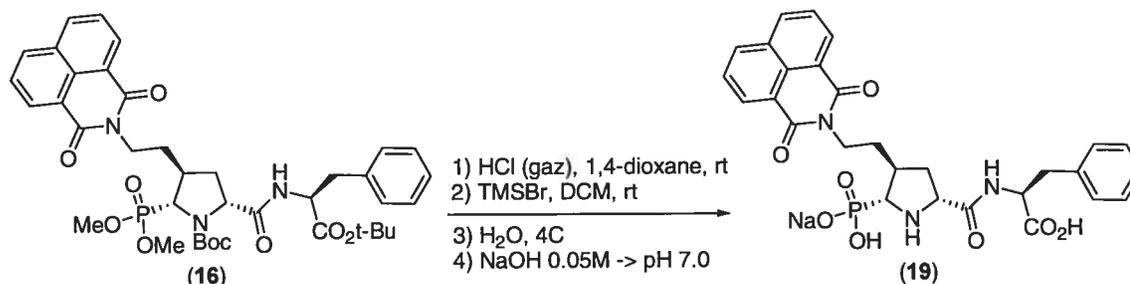
RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 7.76 (br, 3H, ArH); 7.56 (br, 1H, ArH); 7.28-7.07 (m, 4H, ArH); 6.93 (br, 1H, ArH); 6.85 (br, 1H, ArH); 6.71 (br, 1H, ArH); 4.31 (br, 2H); 3.70 (br, 1H); 3.57 (br, 1H); 3.49 (br, 1H); 3.00 (br, 1H); 2.60 (t, 1H, *J* = 0.8 Hz); 2.24 (br, 1H); 1.98 (br, 1H); 1.87 (br, 1H); 1.48 (br, 1H); 1.25 (br, 1H);

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 178.1, 169.7, 165.4, 138.0, 135.4, 131.7, 130.4, 129.4, 129.2, 128.6, 127.3, 126.7, 120.6, 60.8, 58.8, 56.5, 39.7, 38.3, 35.1, 30.1, 27.2;

RMN <sup>31</sup>P (CDCl<sub>3</sub>) δ 13.7, 9.0;

SM : (BR) 565.9 ;

**(2S)-((4S)-[2-(1,3-Dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-yl)-ethyl]-(5R)-phosphono-pyrrolidine-(2R)-carbonyl}-amino)-3-phenyl-propionic acid (19)**



La procédure H est utilisée. Le produit final **19** (31 mg, 84%) est obtenu sous la forme d'une mousse blanche.

$[\alpha]_D +14.3^\circ$  (c = 0.05, H<sub>2</sub>O);

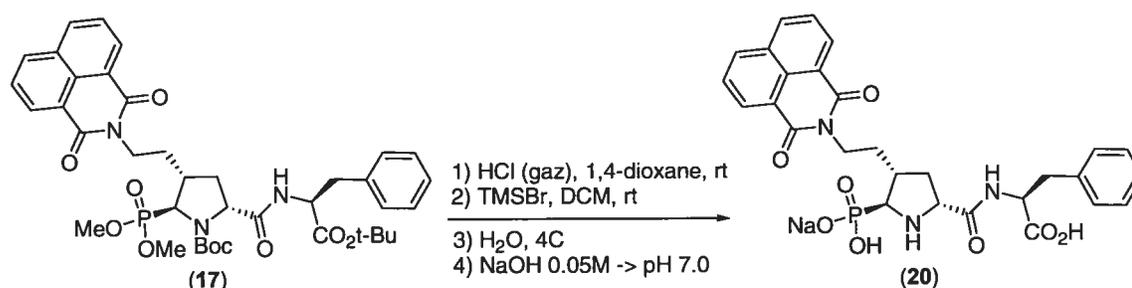
RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 7.82 (br, 4H, ArH); 7.47-7.01 (m, 7H, ArH); 4.59 (br, 1H); 4.31 (br, 1H); 3.69 (br, 1H); 3.60 (br, 1H); 3.24 (br, 1H); 3.05 (br, 1H); 2.84 (br, 1H); 2.06 (br, 3H); 1.75 (br, 1H); 1.35 (br, 1H);

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 178.1, 169.3, 164.8, 138.1, 135.1, 131.3, 130.6, 129.5, 128.9, 127.1, 126.3, 121.2, 120.3, 63.6, 61.9, 58.9, 56.5, 39.4, 38.2, 36.6, 30.5;

RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10.3;

SM : (BR) 566.0 ;

**(2S)-({(4R)-[2-(1,3-Dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-yl)-ethyl]-(5S)-phosphono-pyrrolidine-(2R)-carbonyl}-amino)-3-phenyl-propionic acid (20)**



La procédure H est utilisée. Le produit final **20** (11 mg, 36%) est obtenu sous la forme d'une mousse blanche.

$[\alpha]_{\text{D}} +28.6^\circ$  ( $c = 0.05$ , H<sub>2</sub>O);

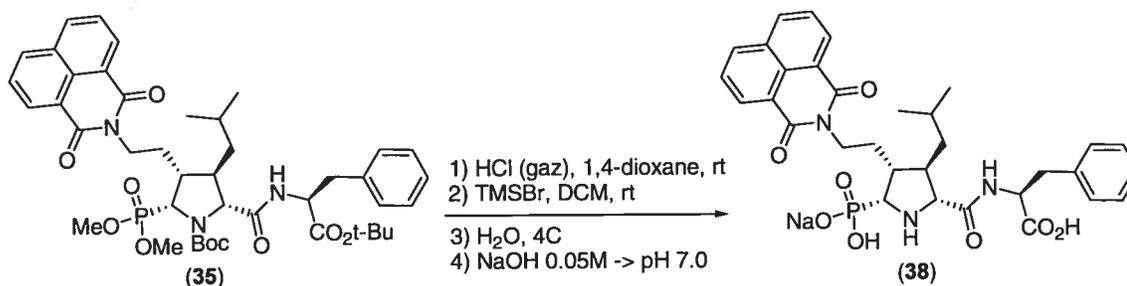
RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.87 (br, 4H, ArH); 7.37 (br, 2H, ArH et 1H); 7.25-7.07 (m, 6H, ArH); 4.42 (dd, 1H,  $J = 5.5, 8.4$  Hz); 4.12-4.06 (m, 1H); 3.52 (br, 2H); 3.25 (dd, 1H,  $J = 6.0, 11.1$  Hz); 3.05 (dd, 1H,  $J = 5.0, 13.7$  Hz); 2.79 (dd, 1H,  $J = 8.5, 13.2$  Hz); 2.25 (br, 2H); 2.04-1.95 (m, 1H); 1.65-1.59 (m, 1H); 1.33-1.25 (m, 1H);

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  178.2, 169.7, 165.5, 137.9, 135.3, 131.6, 131.0, 129.6, 128.9, 127.2, 127.0, 121.2, 120.8, 62.7, 59.5, 56.9, 39.2, 38.3, 38.1, 35.1, 27.5;

RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.2;

SM : (BR) 566.2 ;

**(2S)-({(4R)-[2-(1,3-Dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-yl)-ethyl]-(3R)-isobutyl-(5R)-phosphono-pyrrolidine-(2R)-carbonyl}-amino)-3-phenyl-propionic acid (38)**



La procédure H est utilisée. Le produit final **38** (40 mg, 82%) est obtenu sous la forme d'une mousse blanche.

$[\alpha]_D +7.1^\circ$  (c = 0.22, H<sub>2</sub>O);

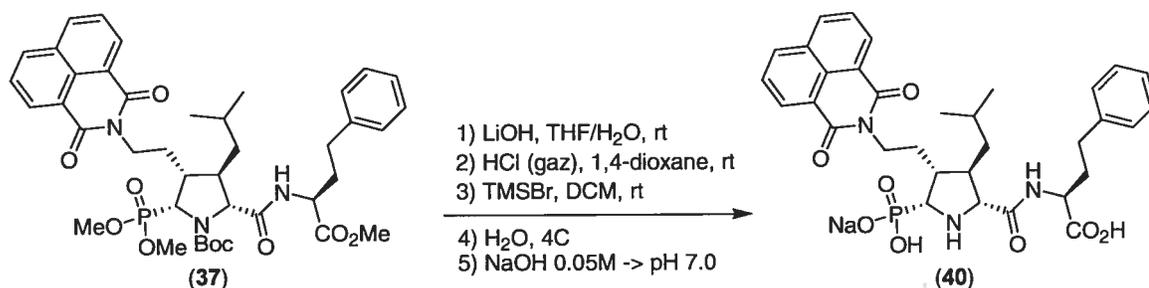
RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 7.72 (d, 2H, ArH, *J* = 6.9 Hz); 7.63 (d, 2H, ArH, *J* = 6.6 Hz); 7.20-7.02 (m, 8H, ArH); 4.43 (t, 1H, *J* = 6.2 Hz); 3.73 (br, 1H); 3.42 (br, 3H); 3.03 (d, 1H, *J* = 10.1 Hz); 2.89-2.81 (m, 1H); 2.08 (br, 3H); 1.38-1.23 (m, 4H); 0.69 (dd, 6H, 2CH<sub>3</sub>, *J* = 4.5, 15.5 Hz);

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 178.1, 169.8, 164.5, 137.9, 134.9, 131.3, 130.8, 129.4, 129.0, 127.2, 127.0, 126.7, 120.6, 66.1, 61.4, 57.0, 48.3, 47.1, 44.2, 39.3, 37.7, 27.4, 26.0, 22.9, 22.1;

RMN <sup>31</sup>P (CDCl<sub>3</sub>) δ 8.9;

SM : (BR) 624.0 ;

**(2R, 3R, 4R, 5R)-(2S)-({4-[2-(1,3-Dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-yl)-ethyl]-3-isobutyl-5-phosphono-pyrrolidine-2-carbonyl}-amino)-4-phenyl-butyric acid (40)**



Les procédures F, puis H sont utilisées. Le produit final **40** (7 mg, 18%) est obtenu sous la forme d'une mousse beige.

$[\alpha]_D +9.3^\circ$  ( $c = 0.06$ , H<sub>2</sub>O);

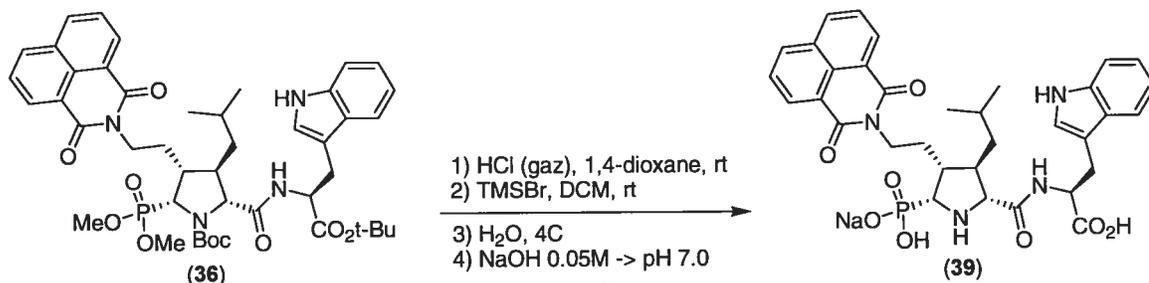
RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 7.89 (d, 2H, ArH,  $J = 7.9$  Hz), 7.83 (d, 2H, ArH,  $J = 7.0$  Hz), 7.36 (t, 1H, ArH,  $J = 7.3$  Hz), 7.26 (t, 2H, ArH,  $J = 6.9$  Hz), 7.19 (d, 2H, ArH,  $J = 6.3$  Hz), 7.12 (d, 2H, ArH,  $J = 7.3$  Hz), 4.14 (dd, 1H,  $J = 4.0, 9.0$  Hz), 3.80 (br, 1H), 3.73-3.68 (m, 1H), 3.66-3.61 (m, 1H), 3.49 (dd, 1H,  $J = 5.5, 12.7$  Hz), 2.53-2.38 (m, 2H), 2.28 (br, 2H), 2.18-2.14 (m, 1H), 1.96-1.87 (m, 1H), 1.86-1.81 (m, 1H), 1.78-1.62 (m, 1H), 1.47 (t, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 1.40-1.31 (m, 1H), 1.16-1.11 (m, 1H), 0.97 (d, 3H, CH<sub>3</sub>,  $J = 6.5$  Hz), 0.77 (d, 3H, CH<sub>3</sub>,  $J = 6.7$  Hz);

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 178.8, 165.0, 160.8, 141.9, 135.2, 131.7, 130.9, 129.1, 128.9, 127.3, 126.6, 126.4, 120.9, 66.2, 61.2, 55.6, 45.3, 44.6, 41.2, 39.5, 34.4, 32.4, 27.2, 25.9, 22.6, 22.3;

RMN <sup>31</sup>P (CDCl<sub>3</sub>) δ 8.9;

SM : (BR) 636.5 ;

**(2R, 3R, 4R, 5R)-(2S)-({4-[2-(1,3-Dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-yl)-ethyl]-3-isobutyl-5-phosphono-pyrrolidine-2-carbonyl}-amino)-3-(1H-indol-3-yl)-propionic acid (39)**



La procédure H est utilisée. Le produit final **39** (1.8 mg, 7%) est obtenu sous la forme d'une mousse beige.

$[\alpha]_D +11.1^\circ$  ( $c = 0.09$ , H<sub>2</sub>O);

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.31 (d, 2H, ArH,  $J = 7.4$  Hz), 8.27 (d, 2H, ArH,  $J = 8.2$  Hz), 7.71 (t, 2H, ArH,  $J = 7.6$  Hz), 7.53 (d, 1H, indole,  $J = 8.0$  Hz), 7.19 (s, 1H, indole), 7.10 (d, 1H, indole,  $J = 8.7$  Hz), 6.61 (t, 1H, indole,  $J = 6.5$  Hz), 6.52 (t, 1H, indole,  $J = 7.3$  Hz), 4.56 (dd, 1H,  $J = 4.1, 9.6$  Hz), 3.92 (d, 1H,  $J = 1.7$  Hz), 3.56-3.48 (m, 1H), 3.30 (dd, 1H,  $J = 4.2, 14.8$  Hz), 2.99 (dd, 1H,  $J = 10.5, 15.2$  Hz), 2.28-2.23 (m, 1H), 2.17-2.12 (m, 1H), 1.89-1.83 (m, 1H), 1.58-1.49 (m, 2H), 1.45-1.28 (m, 2H), 1.25 (d, 2H, CH<sub>2</sub>-indole,  $J = 6.9$  Hz), 0.81 (d, 3H, CH<sub>3</sub>,  $J = 6.3$  Hz), 0.71 (d, 3H, CH<sub>3</sub>,  $J = 6.4$  Hz);

RMN <sup>31</sup>P (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.5;

SM : (BR) 683.1 ;

## Références

---

- <sup>1</sup> Holden, W. E.; McCall, E. "Hypoxia-induced contractions of porcine pulmonary artery strips depend on intact endothelium" *Expl. Lung Res.* **1983**, 7, 101-12.
- <sup>2</sup> Yanagisawa, M.; Kurihara, H.; Kimura, S.; Tomobe, Y.; Kobayashi, M.; Mitsui, Y.; Yazaki, Y.; Goto, K.; Masaki, T. "A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells" *Nature* **1988**, 332, 411-15.
- <sup>3</sup> Inoue, A.; Yanagisawa, M.; Kimura, S.; Kasuya, Y.; Miyauchi, T.; Goto, K.; Masaki, T. "The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1989**, 86, 2863-67.
- <sup>4</sup> Arai, H.; Hori, S.; Aramori, I.; Ohkubo, H.; Nakanishi, S. "Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor" *Nature* **1990**, 348, 730-2.
- <sup>5</sup> Sakurai, T.; Yanagisawa, M.; Takuwa, Y.; Miyazaki, H.; Kimura, S.; Goto, K.; Masaki, T. "Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor" *Nature* **1990**, 348, 732-5.
- <sup>6</sup> Masaki, T.; Vane, J. R.; Vanhoutte, P. M. "International union of pharmacology nomenclature of endothelin receptor" *Pharmacol. Rev.* **1994**, 46, 137-42.
- <sup>7</sup> Levin, E. R. "Mechanisms of disease: Endothelin" *New Engl. J. Med.* **1995**, 333, 356-63.
- <sup>8</sup> Warner, T. D.; Mitchell, J. A.; De Nucci, G.; Vane, J. R. "Endothelin-1 and endothelin-3 release EDRF from isolated perfused arterial vessels of the rat and rabbit" *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1989**, 13(Suppl. 5), S85-8.

---

<sup>9</sup> Ishikawa, K.; Ihara, M.; Noguchi, K.; Mase, T.; Mino, N.; Saeki, T.; Fukuroda, T.; Fukami, T.; Ozaki, S.; Nagase, T.; Nishikibe, M.; Yano, M. "Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 4892-6.

<sup>10</sup> a) Resink, T. J.; Scott-Burden, T.; Buhler, F. R. "Endothelin stimulates phospholipase C in cultured vascular smooth muscle cells" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *157*, 1360-8. b) Van Renterghem, C.; Vigne, P.; Barhanin, J.; Schmid-Alliana, A.; Frelin, C.; Lazdunski, M. "Molecular mechanism of action of the vasoconstrictor peptide endothelin" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *157*, 977-85.

<sup>11</sup> Lee, T.-S.; Chao, T.; Hu, K.-Q.; King, G. L. "Endothelin stimulates a sustained 1,2-diacylglycerol increase and protein kinase C activation in bovine smooth muscle cells" *Biochem. biophys. Res. Commun.* **1989**, *162*, 381-6.

<sup>12</sup> a) Adam, L. P.; Milio, L.; Brengle, B.; Hathaway, D. R. "Myosin light chain and caldesmon phosphorylation in arterial muscle stimulated with endothelin-1" *J. Molec. Cell Cardiol.* **1990**, *22*, 1017-23. b) Blackshear, P. J.; Wen, L.; Glynn, B. P.; Witters, L. A. "Protein kinase C-stimulated phosphorylation *in vitro* of a M<sub>r</sub> 80,000 protein phosphorylated in response to phorbol esters and growth factors in intact fibroblasts. Distinction from protein kinase C and prominence in the brain" *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 1459-69.

<sup>13</sup> a) Ashley, C. C.; Simpson, A. W. M. "Endothelin evoked Ca<sup>2+</sup> transients and oscillations in cultured rat A10 vascular smooth muscle cells" *J. Physiol.* **1989**, *417*, 73P. b) Simonson, M. S.; Osanai, T.; Dunn, M. J. "Endothelin isopeptide evoke Ca<sup>2+</sup> signaling and oscillations of the cytosolic free [Ca<sup>2+</sup>] in human mesangial cells" *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1055*, 63-8.

---

<sup>14</sup> Reiser, G. "Endothelin and a Ca<sup>2+</sup> ionophore raise cyclic GMP levels in a neuronal cell line via formation of nitric oxide" *Br. J. Pharmac.* **1990**, *101*, 722-6.

<sup>15</sup> Marin, P.; Delumeau, J. C.; Durieu-Trautmann, O.; Le Nguyen, D.; Prémont, J.; Strosberg, A. D.; Couraud, P. O. "Are several G-proteins involved in the different effects of endothelin-1 in mouse striatal astrocytes" *J. Neurochem.* **1991**, *56*, 1270-5.

<sup>16</sup> a) Kester, M.; Simonson, M. S.; McDermott, R. G.; Baldi, E.; Dunn, M. J. "Endothelin stimulates phosphatidic acid formation in cultured rat mesangial cells : role of a protein kinase C-regulated phospholipase-D" *J. Cell Physiol.* **1992**, *150*, 578-85. b) Liu, Y.; Geisbuhler, B.; Jones, A. W. "Activation of multiple mechanisms including phospholipase D by endothelin-1 in rat aorta" *Am. J. Physiol.* **1992**, *262*, C941-9.

<sup>17</sup> a) Kozuka, M.; Ito, T.; Hirose, S.; Eguchi, S.; Hagiwara, H. "Endothelin action on rat uterus is inhibited by an inhibitor of protein kinase C and by inhibitors of the phospholipase A<sub>2</sub>-arachidonic acid-lipoxygenase pathway" *Biomed. Res.* **1990**, *11*, 287-9. b) Reynolds, E. E.; Mok, L. L. S.; Kurokawa, S. "Phorbol ester dissociates endothelin-stimulated phosphoinositide hydrolysis and arachidonic acid release in vascular smooth muscle cells" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *160*, 868-73.

<sup>18</sup> a) Ladoux, A.; Frelin, C.; "Endothelins inhibit adenylate cyclase in brain capillary cells" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *180*, 169-73. b) Hilal-Dandan, R.; Urasawa, K.; Brunton, L. L. "Endothelin inhibits adenylate cyclase and stimulates phosphoinositide hydrolysis in adult cardiac myocytes" *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 10620-4. c) Simonson, M. S.; Dunn, M. J. "Endothelin-1 stimulates contraction of rat glomerular mesangial cells and potentiates  $\beta$ -adrenergic-mediated cyclic adenosine monophosphate accumulation" *J. Clin. Invest.* **1990**, *85*, 790-7.

<sup>19</sup> a) Ishii, K.; Nunoki, K.; Murakoshi, H.; Taira, N. "Cloning and modulation by endothelin-1 of rat cardiac K channel" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *184*,

---

1484-9. b) Kim, D. "Endothelin activation of an inwardly rectifying K<sup>+</sup>-current in atrial cells" *Circulation Res.* **1991**, *69*, 250-5.

<sup>20</sup> Garthwaite, J.; Charles, S. L.; Chess-Williams, R. "Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests a role as intercellular messenger in the brain" *Nature* **1988**, *336*, 385-8.

<sup>21</sup> Ohno, A.; Naruse, M.; Kato, S.; Hosaka, M.; Naruse, K.; Demura, H.; Sugino, N. "Endothelin-specific antibodies decrease blood pressure and increase glomerular filtration rate and renal plasma flow in spontaneously hypertensive rats" *J. Hypertens.* **1992**, *10*, 781-5.

<sup>22</sup> Watanabe, T.; Suzuki, N.; Shimamoto, N.; Fujino, M.; Imada, A. "Endothelin in myocardial infarction" *Nature* **1990**, *344*, 114.

<sup>23</sup> Hoffman, A.; Keiser, H. R.; Grossman, E.; Goldstein, D. S.; Gold, P. W.; Kling, M. "Endothelin concentrations in cerebrospinal fluid in depressive patients" *Lancet* **1989**, *ii*, 1519.

<sup>24</sup> Suzuki, H.; Sato, S.; Suzuki, Y.; Takekoshi, K.; Ishihara, N.; Shimoda, S. "Increased endothelin concentration in CSF from patients with subarachnoid hemorrhage" *Acta Neurol. Scand.* **1990**, *81*, 553-4.

<sup>25</sup> Morales, R. E.; Johnson, B. R.; Szabo, S. "Endothelin induces vascular and mucosal lesions, enhances the injury by HCl/ethanol and the antibody exerts gastroprotection" *FASEB J.* **1992**, *6*, 2354-60.

<sup>26</sup> Chandler, C. L.; Moore, A. R.; Desa, F. M.; Howat, D.; Willoughby, D. A. "The local modulation of vascular permeability by endothelial cell derived products" *J. Pharm. Pharmac.* **1988**, *40*, 745-6.

- 
- <sup>27</sup> Mattoli, S.; Soloperto, M.; Marini, M.; Fasoli, A. "Levels of endothelin in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with symptomatic asthma and reversible airflow obstruction" *J. Allergy Clin. Immun.* **1991**, *88*, 376-84.
- <sup>28</sup> Yamashita, J.; Ogawa, M.; Inada, K.; Yamashita, S.; Matsuo, S.; Takano, S. "A large amount of endothelin-1 is present in human breast cancer tissues" *Res. Commun. Chem. Path. Pharmac.* **1991**, *74*, 363-9.
- <sup>29</sup> Nambi, P.; Pullen, M.; Contino, L. C.; Brooks, D. P. "Upregulation of renal endothelin receptors in rats with cyclosporine A-Induced nephrotoxicity" *Eur. J. Pharmac.* **1990**, *187*, 113-6.
- <sup>30</sup> Telemaque, S.; Emoto, N.; Dewit, D.; Yanagisawa, M. "In vivo role of endothelin-converting enzyme-1 as examined by adenovirus-mediated overexpression in rats" *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1998**, *31(Suppl. 1, Endothelin V)*, S548-50.
- <sup>31</sup> a) Shimada, K.; Takahashi, M.; Tanzawa, K. "Cloning and functional expression of endothelin-converting enzyme from rat endothelial cells" *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 18275-8. b) Xu, D.; Emoto, N.; Giaid, A.; Slaughter, C.; Kaw, S.; deWit, D.; Yanagisawa, M. "ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1" *Cell* **1994**, *78*, 473-85. c) Schmidt, M.; Kröger, B.; Jacob, E.; Seulberger, H.; Subkowski, T.; Otter, R.; Meyer, T.; Schmalzing, G.; Hillen, H. "Molecular characterization of human and bovine endothelin converting enzyme (ECE-1)" *FEBS Lett.* **1994**, *356*, 238-43.
- <sup>32</sup> Battistini, B.; Jeng, A. Y. "Endothelin-converting enzyme inhibitors and their effects" *Endothelin and Its Inhibitors* **2001**, Warner, T. D., Springer, pp. 155-208.

- 
- <sup>33</sup> Coder, R. "Identity of endothelin-converting enzyme and other targets for the therapeutic regulation of endothelin biosynthesis" *Endothelin and Its Inhibitors* **2001**, Warner, T. D., Springer, pp. 35-67.
- <sup>34</sup> Yanagisawa, H.; Yanagisawa, M.; Kapur, R. P.; Richardson, J. A.; Williams, S. C.; Clouthier, D. E.; de Wit, D.; Emoto, N.; Hammer, R. E. "Dual genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signaling revealed by targeted disruption of endothelin converting enzyme-1 gene" *Development* **1998**, *125*, 825-36.
- <sup>35</sup> Emoto, N.; Yanagisawa, M. "Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum" *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 15262-8.
- <sup>36</sup> Yanagisawa, H.; Hammer, R. E.; Richardson, J. A.; Emoto, N.; Williams, S. C.; Takeda, S.; Cloutier, D. E.; Yanagisawa, M. "Disruption of ECE-1 and ECE-2 reveals a role for endothelin-converting enzyme-2 in murine cardiac development" *J. Clin. Invest.* **2000**, *105*, 1373-82.
- <sup>37</sup> Hasegawa, H.; Hiki, K.; Sawamura, T.; Aoyama, T.; Okamoto, Y.; Miwa, S.; Shimohama, S.; Kimura, J.; Masaki, T. "Purification of a novel endothelin-converting enzyme specific for big endothelin-3" *FEBS Lett.* **1998**, *428*, 304-8.
- <sup>38</sup> Nakahara, S.; Emoto, N.; Matsuo, M. "Isolation of an alternative spliced variant of bovine ECE-2" *Sixth International Conference on Endothelin* **1999**, McGill University Press, Montréal, Abstr. O3.
- <sup>39</sup> a) Turner, A. J.; Murphy, L. J. "Molecular pharmacology of endothelin converting enzymes" *Biochem. Pharmacol.* **1996**, *51*, 91-102. b) Turner, A. J.; Tanzawa, K. "Mammalian membrane metalloproteases: NEP, ECE, KELL, and PEX" *FASEB J* **1997**, *11*, 355-64.

---

<sup>40</sup> Sonnenberg, J. L.; Sakane, Y.; Jeng, A. Y.; Koehn, J. A.; Ansell, J. A.; Wennogle, L. P.; Ghai, R. D. "Identification of protease 3.4.24.11 as the major atrial natriuretic factor degrading enzyme in the rat kidney" *Peptides* **1988**, *9*, 173-80.

<sup>41</sup> Nadel, J. A.; Borson, D. B. "Modulation of tachykinins and bradykinin by enkephalinase" *Prog. Clin. Biol. Res.* **1988**, *263*, 123-30.

<sup>42</sup> Jeng, A. Y.; De Lombaert, S. "Endothelin converting enzyme inhibitors" *Curr. Pharm. Des.* **1997**, *3*, 597-614.

<sup>43</sup> a) Tsurumi, Y.; Ohhata, N.; Iwamoto, T.; Shigematsu, N.; Sakamoto, K.; Nishikawa, M.; Kiyoto, S.; Okuhara, M. "WS79089 A, B and C, new endothelin converting enzyme inhibitors isolated from *Streptosporangium roseum*. No. 79089. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activities" *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 619-30. b) Tsurumi, Y.; Ueda, H.; Hayashi, K.; Takase, S.; Nishikawa, M.; Kiyoto, S.; Okuhara, M. "WS75624 A and B, new endothelin converting enzyme inhibitors isolated from *Saccharothrix* sp. No. 75624. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activities" *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 1066-72. c) Sato, R.; Iijima, Y.; Matsushita, H.; Negishi, A.; Takamatsu, Y.; Haruyama, H.; Kinoshita, T.; Kodama, K.; Ishii, A. "Compound B90063 as endothelin converting enzyme inhibitor" *Jpn. Patent* **1996**, JP 8208646.

<sup>44</sup> a) Umekawa, K.; Hasegawa, H.; Tsutsumi, Y.; Sato, K.; Matsumura, Y.; Ohashi, N. "Pharmacological characterization of a novel sulfonylureid-pyrazole derivative, SM-19712, a potent nonpeptidic inhibitor of endothelin converting enzyme" *Jpn. J. Pharmacol.* **2000**, *84*, 7-15. b) Ahn, K.; Sisneros, A. M.; Herman, S. B.; Pan, S. M.; Hupe, D.; Lee, C.; Nikam, S.; Cheng, X.-M.; Doherty, A. M.; Schroeder, R. L.; Haleen, S. J.; Kaw, S.; Emoto, N.; Yanagisawa, M. "Novel selective quinazoline inhibitors of endothelin converting enzyme-1" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *243*, 184-90.

---

<sup>45</sup> Bur, D.; Dale, G. E.; Oefner, C. "A three-dimensional model of endothelin-converting enzyme (ECE) based on the X-ray structure of neutral endopeptidase 24.11 (NEP)" *Protein Eng.* **2001**, *14*, 337-41.

<sup>46</sup> Schechter, I.; Berger, A. "On the size of the active site in proteases, I Papain" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, *27*, 157-162.

<sup>47</sup> Bertenshaw, S. R.; Rogers, R. S.; Stern, M. K.; Norman, B. H.; Moore, W. M.; Jerome, G. M.; Branson, L. M.; McDonald, J. F.; McMahon, E. G.; Palomo, M. A. "Phosphorus-containing inhibitors of endothelin converting enzyme: effects of the electronic nature of phosphorus on inhibitor potency" *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 173-6.

<sup>48</sup> Jeng, A. Y.; De Lombaert, S. "Endothelin converting enzyme inhibitors" *Curr. Pharm. Des.* **1997**, *3*, 597-614.

<sup>49</sup> Ikeda, S.; Ashley, J. A.; Wirsching, P.; Janda, K. D. " $\psi$ [PO<sub>2</sub><sup>-</sup>CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>], a new amide bond replacement: potent, slow-binding inhibition of the HIV protease" *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7604-6.

<sup>50</sup> a) Hunter, D. J.; Bird, J.; Cassidy, F.; De Mello, R. C.; Harper, G. P.; Karran, E. H.; Markwell, R. E.; Miles-Williams, A. J.; Ward, R. W. "Aminophosphonic acid containing inhibitors of human collagenase: modification of the P<sub>1</sub> residue" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 2833-6. b) De Lombaert, S.; Tan, J.; Stamford, L. J.; Sakane, Y.; Berry, C.; Ghai, R. D. "Dual inhibition of neutral endopeptidase and angiotensin-converting enzyme by *N*-phosphonomethyl and *N*-carboxyalkyl dipeptides" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 2715-20. c) De Lombaert, S.; Erion, M. D.; Tan, J.; Blanchard, L.; El Chehabi, L.; Ghai, R. D.; Sakane, Y.; Berry, C.; Trapani, A. J. "N-Phosphonomethyl Dipeptides and Their Phosphonate Prodrugs, a New Generation of

---

Neutral Endopeptidase (NEP, EC 3.4.24.11) Inhibitors" *J. Med.Chem.* **1994**, *37*, 498-511.

<sup>51</sup> De Lombaert, S.; Ghai, R. D.; Jeng, A. Y.; Trapani, A. J.; Webb, R. L. "Pharmacological Profile of a Non-peptidic Dual Inhibitor of Neutral Endopeptidase 24.11 and Endothelin-Converting Enzyme" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *204*, 407-12.

<sup>52</sup> Trapani, A. J.; De Lombaert, S.; Beil, M. E.; Bruseo, C. W.; Savage, P.; Chou, M.; Jeng, A. Y. "CGS 34043: a non-peptidic, potent and long-acting dual inhibitor of endothelin converting enzyme-1 and neutral endopeptidase 24.11" *Life Sci.* **2000**, *67*, 1025-33.

<sup>53</sup> Jeng, A. Y.; De Lombaert, S.; Beil, M. E.; Bruseo, C. W.; Savage, P.; Chou, M.; Trapani, A. J. "Design and synthesis of a potent and selective endothelin-converting enzyme inhibitor, CGS 35066" *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2000**, *36(Suppl. 1)*, S36-9.

<sup>54</sup> Wallace, E. M.; Moliterni, J. A.; Moskal, M. A.; Neubert, A. D.; Marcopulos, N.; Stamford, L. B.; Trapani, A. J.; Savage, P.; Chou, M.; Jeng, A. Y. "Design and Synthesis of Potent, Selective Inhibitors of Endothelin-Converting Enzyme" *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1513-23.

<sup>55</sup> De Lombaert, S.; Stamford, L. B.; Blanchard, L.; Tan, J.; Hoyer, D.; Diefenbacher, C. G.; Wei, D.; Wallace, E. M.; Moskal, M. A.; Savage, P.; Jeng, A. Y. "Potent non-peptidic dual inhibitors of endothelin-converting enzyme and neutral endopeptidase 24.11" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1059-1064.

<sup>56</sup> Fukami, T.; Hayama, T.; Amano, Y.; Nakamura, Y.; Arai, Y.; Matsuyama, K.; Yano, M.; Ishikawa, K. "Aminophosphonate endothelin converting enzyme inhibitors:

---

potency-enhancing and selectivity-improving modifications of phosphoramidon” *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 1257-62.

<sup>57</sup> Keller, P. M.; Lee, C.-P.; Fenwick, A. E.; Atkinson, S. T.; Elliott, J. D.; DeWolf, W. E. Jr “Endothelin-converting enzyme: substrate specificity and inhibition by novel analogs of phosphoramidon” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *223*, 372-8.

<sup>58</sup> Norcini, G.; Santangelo, F. “N-heteroaryl substituted derivatives of propanamide useful in the treatment of cardiovascular diseases” *Eur. Patent Appl.* **1995**, EP 0636630A1.

<sup>59</sup> McKittrick, B. A.; Stamford, A. W.; Weng, X.; Ma, K.; Chackalamannil, S.; Czarniecki, M.; Cleven, R. M.; Fawzi, A. B. “Design and synthesis of phosphinic acids that triply inhibit endothelin converting enzyme, angiotensin converting enzyme and neutral endopeptidase 24.11” *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1629-34.

<sup>60</sup> Kukkola, P. J.; Savage, P.; Sakane, Y.; Berry, J. C.; Bilci, N. A.; Ghai, R. D. Jeng, A. Y. “Differential structure-activity relationships of phosphoramidon analogs for inhibition of three metalloproteases: endothelin-converting enzyme, neutral endopeptidase, and angiotensin-converting enzyme” *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1995**, *26*(Suppl. 3), S65-8.

<sup>61</sup> Bertenshaw, S. R.; Rogers, R. S.; Stern, M. K.; Norman, B. H.; Moore, W. M.; Jerome, G. M.; Branson, L. M.; McDonald, J. F.; McMahon, E. G.; Palomo, M. A. “Phosphorus-containing inhibitors of endothelin converting enzyme: effects of the electronic nature of phosphorus on inhibitor potency” *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 173-6.

<sup>62</sup> Fujita, Y.; Satoh, C.; Tsukahara, Y.; Miyawaki, N. *Jap. Pharmacol. Soc.* **1997**, Abstract P-28.

- 
- <sup>63</sup> Ksander, G. M.; Savage, P.; Trapani, A. J.; Balwierczak, J. L.; Jeng, A. Y. "Benzofused macrocyclic lactams as triple inhibitors of endothelin-converting enzyme, neutral endopeptidase 24.11, and angiotensin-converting enzyme" *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1998, 31(Suppl. 1, Endothelin V), S71-3.
- <sup>64</sup> Gauchet, C. « Conception et synthèse d'inhibiteurs de métalloprotéases » *Thèse de doctorat 2004*, Université de Montréal.
- <sup>65</sup> Ackermann, J.; Matthes, M.; Tamm, C. "Approaches to the synthesis of cytochalasans, Part 9, A versatile concept leading to all structural types of cytochalasans" *Helv. Chim. Acta* 1990, 73(1), 122-32.
- <sup>66</sup> Ezquerra, J.; Pedregal, C.; Rubio, A.; Yruretagoyena, B.; Escribano, A.; Sanchez-Ferrando, F. "Stereoselective reactions of lithium enolates derived from N-BOC protected pyroglutamic esters" *Tetrahedron* 1993, 49(38), 8665-78.
- <sup>67</sup> Ezquerra, J.; Pedregal, C.; Yruretagoyena, B.; Rubio, A.; Carreno, M. C.; Escribano, A.; Ruano, J. L. G. "Synthesis of Enantiomerically Pure 4-Substituted Glutamic Acids and Prolines: General Aldol Reaction of Pyroglutamate Lactam Lithium Enolate Mediated by Et<sub>2</sub>O·BF<sub>3</sub>" *J. Org. Chem.* 1995, 60(9), 2925-30.
- <sup>68</sup> Blackburn, G. M.; Ingleson, D. "Specific Dealkylation of Phosphonate Esters using Iodotrimethylsilane" *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 1978, 20, 870.
- <sup>69</sup> Evans, D. A.; Lundy, K. M. "Synthesis of diphthamide: the target of diphtheria toxin catalyzed ADP-ribosylation in protein synthesis elongation factor 2" *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 1495-6.
- <sup>70</sup> Woo, K. C.; Jones, K. "Asymmetric synthesis from  $\alpha$ -amino acids; some reactions of (S)-pyroglutamate" *Tetrahedron Lett.* 1991, 32, 6949-52.
-

- 
- <sup>71</sup> Notes de cahier de laboratoire. Travaux non publiés.
- <sup>72</sup> Coldham, I.; Price, K. N.; Rathmell, R. E. "Intramolecular carbolithiation reactions for the preparation of 3-alkenylpyrrolidines" *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 2111-2119.
- <sup>73</sup> Otsuka, M.; Masuda, T.; Haupt, A.; Ohno, M.; Shiraki, T.; Sugiura, Y.; Maeda, K. "Man-designed bleomycin with altered sequence specificity in DNA cleavage", *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 838-845.
- <sup>74</sup> Valasinas, A.; Frydman, B.; Friedmann, H. C. "Synthesis of (*R*)- and (*S*)-4,5-diaminovaleric acids" *J. Org. Chem.* **1992**, *57*(7), 2158-60.
- <sup>75</sup> Hashimoto, M.; Matsumoto, M.; Terashima, S. "Synthetic studies of carzinophilin. Part 1: Synthesis of 2-methylidene-1-azabicyclo[3.1.0]hexane systems related to carzinophilin" *Tetrahedron* **2003**, *59*(17), 3019-3040.
- <sup>76</sup> Skof, M.; Svete, J.; Kmetec, M.; Golic-Grdadolnik, S.; Stanovnik, B. "Stereoselective amination of 5-substituted  $\gamma$ -lactones and  $\gamma$ -lactams – A convenient route for the preparation of 5-substituted (3*S*,5*S*)-3-Acetylamino-tetrahydrofuran-2-ones and (3*S*,5*S*)-3-Acetylamino-pyrrolidin-2-ones", *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, *7*, 1581-1584.
- <sup>77</sup> Humphrey, J. M.; Liao, Y.; Ali, A.; Rein, T.; Wong, Y.-L.; Chen, H.-J.; Courtney, A. K.; Martin, S. F. "Enantioselective Total Syntheses of Manzamine A and Related Alkaloids" *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*(29), 8584-8592.
- <sup>78</sup> Herdeis, C.; Hubmann, H. P.; "Synthesis of homochiral *R*-baclofen from *S*-glutamic acid", *Tetrahedron : Asymmetry* **1992**, *3*(9), 1213-1221.

