

Université de Montréal

*Développement d'un nouvel acide aminé indolizidinone
et applications en mimétique peptidique*

par

Henry-Georges Lombart

Département de chimie
Faculté des arts et des sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en chimie

septembre 1997

© Henry-Georges Lombart, 1997



QD

3

U54

1998

v.013

Université de Montréal

Développement d'un nouveau acide aminé indolyle
et applications en nutrition pédiatrique

par

Henry-Georges Lombard

Département de chimie
Faculté des arts et des sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
l'habilitation Doctor (Ph.D.)
en chimie

septembre 1997

© Henry-Georges Lombard 1997



IDENTIFICATION DU JURY

Université de Montréal
Faculté des arts et des sciences

Cette thèse intitulée :
*Développement d'un nouvel acide aminé indolizidinone
et applications en mimétique peptidique*

Présentée par :
Henry-Georges Lombart
a été évaluée par le jury composé
des personnes suivantes :

Président-rapporteur :	James D. Wuest
Directeur de recherche :	William Lubell
Membre du jury :	Denis Gravel
Examineur externe :	Gilles Lajoie
Représentant du doyen :	Stephen Michnik

Thèse acceptée le : 23 mars 1998

Pour mes parents et ma soeur.

Sommaire

Cet ouvrage, sous forme d'article, présente les développements réalisés dans le domaine des acides aminés indolizidinones et de leurs applications en mimétique peptidique.

Dans un premier temps, l'élaboration d'une synthèse énantiosélective a donné accès aux peptidomimétiques azabicycloalcanes tel que l'acide aminé indolizidinone. La synthèse énantiosélective du (3*S*, 6*S*, 9*S*)-2-oxo-3-*N*-(Boc)-amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate (Boc-AAI-OH) est décrite. Cette synthèse est basée sur trois réactions clés: une condensation de Claisen, suivie d'une amination réductrice puis d'une cyclisation au lactame. L'ensemble des études d'optimisation de chacune des étapes a mené à une synthèse efficace de ce nouveau peptidomimétique.

Dans un second temps, pour déterminer la conformation que peut induire cet acide aminé indolizidinone, il a été incorporé dans une bibliothèque de peptides modèles. Les analyses conformationnelles par modélisation moléculaire ont prédit qu'il pourrait fonctionner comme un peptidomimétique des résidus $i+1$ et $i+2$ dans une conformation de repliement β de type II'. Les études sur le (3*S*, 6*S*, 9*S*)-*N*'-méthyl 2-oxo-3-*N*-acétamido-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide ont montré que ce peptide induisait une conformation présentant une liaison hydrogène

stabilisée dans un solvant non polaire. Les études de dichroïsme circulaire sur un peptide ayant des chromophores nitrophényles ont démontré que ce peptide présent un spectre caractéristique d'une conformation de repliement β de type II'.

Finalement, l'acide aminé indolizidinone a été incorporé dans deux dérivés pour analyser ses diverses utilités. Afin d'étudier sa capacité à induire un repliement β de type II', deux résidus acide aminé indolizidinone ont été incorporés dans la synthèse d'un analogue de la gramicidine S, un antibiotique naturel possédant deux repliements β de type II'. En phase liquide et par synthèse convergente, l'analogue [AAI^{4-5,4'-5'}]-GS a été obtenu. Les analyses biologiques ont montré que cet analogue possède une activité biologique similaire à celle de la gramicidine S. Ainsi, le peptidomimétique est capable de stabiliser la conformation de repliement bioactive. Le choix du second analogue s'est porté sur la synthèse d'inhibiteurs des deux métallopeptidases ACE et NEP. En effet, l'acide aminé indolizidinone étant un mimétique du peptide Ala-Pro, le remplacement de ce dipeptide par une structure rigide a été exploré avec les synthèses de deux analogues incorporant des acides aminés indolizidinones.

MOTS-CLÉS:

- Acide aminé indolizidinone
- Peptidomimétique
- Repliement β
- Synthèse asymétrique
- Analyse conformationnelle
- Gramicidine S

Table des matières

Sommaire	iv
Table des matières	vi
Liste des figures	xxiv
Liste des tableaux	xxix
Liste des schémas	xxxii
Liste des cartes	xxxv
Liste des abréviations	xxxvi
Remerciements	xxxviii

Chapitre 1:

Introduction et présentation du sujet de recherche:

<i>"Développement d'un nouvel acide aminé indolizidinone et applications en mimétique peptidique"</i>	1
1.1 Introduction	1
1.2 Peptides et conformations	2
1.3 Les structures secondaires dans les peptides	3
1.3.1 Définition des angles de torsion dans les chaînes peptidiques	3
1.3.2 Les repliements β	5
1.3.2.1 Définition	5
1.3.2.2 Représentation des repliements β de type II et II'	8
1.3.2.3 Importance des repliements	9
1.4 Conception de peptidomimétiques	10
1.4.1 Définition	10
1.4.2 Importance	11
1.4.3 Exemples et applications.	12

1.4.3.1	La détermination d'une conformation bioactive: l'exemple de Robinson	12
1.4.3.2	La synthèse d'un inhibiteur: l'exemple de Kahn	14
1.5	Peptidomimétiques et proline	17
1.5.1	Conformation	17
1.5.2	Système envisagé: les acides aminés azabicyclo[X.Y.0]alcanes	20
1.5.3	Restriction au système indolizidinone	21
1.6	Synthèses précédentes des systèmes indolizidinones	24
1.6.1	La synthèse de Nagai et Sato	24
1.6.2	La synthèse de Mueller et Revesz	26
1.6.3	Conclusion	27
1.7	Références	28

Chapitre 2:

Design and Synthesis of Conformationally Constrained Amino Acids as Versatile Scaffolds and Peptide Mimetics

Stephen Hanessian,* Grant McNaughton-Smith, Henry-Georges

Lombart and William D. Lubell*, *Tetrahedron*, report number 426,

1997, 53, 12789-12854

Contents

2.1 Introduction

2.2 Azabicycloalkane Amino Acids

1. 5,6-Fused 1-Aza-2-oxobicycloalkane Amino Acids
(Indolizidone type)

2. Substituted 5,6-Fused 1-Aza-2-oxobicycloalkane Amino
Acids

3. 5,7- and 5,8-Fused 1-Aza-2-oxobicycloalkane Amino
Acids

4. 6,7-Fused 1-Aza-2-oxobicycloalkane Amino Acids

5.	5,7- and 6,7-Fused 1-Aza-2-oxobicycloalkane Amino Acids with Appended Aromatic Units	58
6.	5,6- and 6,7-Fused 1-Aza-2-oxobicycloalkane Amino Acids with Appended Heteroaromatic Units	60
7.	5,5-Fused 1-Aza-2-oxobicycloalkane Amino Acids (Pyrrolizidinone type)	61
8.	5,5-Fused 1-Aza-2-oxobicycloalkene Amino Acids	63
9.	4,5-Fused 1-Aza-2-oxobicycloalkane and 1-Aza-2-oxobicycloalkene Amino Acids	67
2.3	Thiazabicycloalkane Amino Acids	69
1.	5,5-, 5,6-, 5,7- and 6,7-Fused 1-Azaoxobicycloalkane Amino Acids Encompassing Sulfur	69
2.	Substituted 5,5- and 5,6-Fused 1-Azaoxobicycloalkane Amino Acids Encompassing Sulfur	73
3.	Epimerization of Thiazabicycloalkane Amino Acids	75
2.4	Oxazabicycloalkane Amino Acids	77
1.	5,5-Fused 1-Aza-8-oxobicycloalkane Amino Acids Encompassing Oxygen	77
2.	5,6-Fused 1-Aza-2-oxobicycloalkane Amino Acids Encompassing Oxygen	78
3.	Substituted 5,6-Fused 1-Aza-2-oxobicycloalkane Amino Acids Encompassing Oxygen	80
4.	5,7-Fused 1-Aza-2-oxobicycloalkane Amino Acids Encompassing Oxygen	81
5.	6,7-Fused 1-Aza-2-oxobicycloalkane Amino Acids Encompassing Oxygen with Appended Aromatic Units	83
2.5	Diazabicycloalkane Amino Acids	84
1.	Substituted 5,5- and 5,6-Fused 1,5-Diazaoxobicycloalkene Amino Acids (Fused Pyrazolidinones and Pyridazinones)	84

2.	Substituted 5,6-Fused 1,6-Diaza-9-oxobicycloalkene Amino Acids (5,6-Fused Pyrazolidinones)	90
3.	6,6-, 6,7- and 6,8-Fused 1,6-Diazaoxobicycloalkane Amino Acids (6,6-, 6,7- and 6,8-Pyridazino Based Structures)	91
2.6	Miscellaneous Examples	93
2.7	Perspectives	94
2.8	Abbreviations	96
2.9	Tabular Summary of Azabicycloalkane Amino Acids and Derivatives	97
2.10	Acknowledgement	117
2.11	References and Notes	117

Chapitre 3:

	<i>Stratégie de synthèse et résultats préliminaires en vue d'obtenir le système acide aminé indolizidinone, l'acide (3S, 6S, 9S)-méthyl 2- oxo-3-N-(tert-butoxyoxycarbonyl)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9- carboxylique</i>	137
3.1	Stratégie générale	137
3.2	Réactions régiosélectives des énolates des dérivés de l'acide glutamique: précédents	140
3.3	Amination réductrice: précédents	143
3.4	Stratégie considérée	144
3.5	Préparation des acides α -aminés dicarboxyliques "nucléophiles"	146
3.5.1	Protection de l'amine	146
3.5.2	Protection de l'acide carboxylique par un groupe <i>tert</i> -butyle et synthèse du <i>N</i> -(9-(9-phényl- fluorényle)) <i>L</i> -glutamate d' α - <i>tert</i> -butyle et de γ -méthyle (7)	148

3.5.3	Préparation des autres synthons nucléophiles, dérivés protégés de l'acide <i>L</i> -glutamique	151
3.6	Préparation des acides α -aminés dicarboxyliques "électrophiles"	154
3.6.1	Les chlorures d'acides comme synthon électrophile	154
3.6.2	Les anhydrides comme synthon électrophile	155
3.6.3	Les imidazolides comme synthon électrophile	156
3.6.4	Les esters comme synthon électrophile	156
3.7	La condensation des dérivés "nucléophiles" et "électrophiles"	157
3.7.1	Approche modèle	157
3.7.2	Condensation mixte	158
3.7.3	Interprétations	160
3.7.4	Modification	162
3.8	Conclusion	163
3.9	Partie expérimentale	164
	Notes générales	164
	Bromure du 9-(9-phénylfluorényle) (22)	167
	Acide <i>L</i> -glutamate de γ -méthyle ((2S)- 24)	167
	Acide <i>N</i> -(9-(9-phénylfluorényle)) <i>L</i> -glutamate de γ -méthyle ((2S)- 25)	168
	<i>N</i> -(9-(9-phénylfluorényle)) <i>L</i> -glutamate d' α -tert-butyle et de γ -méthyle ((2S)- 7)	168
	Trichloroacétimide de <i>tert</i> -butyle (26)	168
	Chlorhydrate du <i>L</i> -glutamate de diméthyle ((2S)- 53)	170
	<i>N</i> -(9-(9-phénylfluorényle)) <i>L</i> -glutamate de diméthyle ((2S)- 9)	171
	Acide <i>N</i> -(9-(9-phénylfluorényle)) <i>L</i> -glutamate d' α -méthyle ((2S)- 27)	172

<i>N</i> -(9-(9-phénylfluorényle)) <i>L</i> -glutamate de γ - <i>tert</i> -butyle et d' α -méthyle ((2S)-29)	173
(4S) 4-(Propionate de methyl-3') 3- <i>N</i> -(9-(9-phénylfluorényle)) 5-oxo oxazolidine ((4S)-30)	174
Acide <i>N</i> -(9-(9-phénylfluorényle)) <i>L</i> -glutamique ((2S)-28)	175
(4S) 4-(Acide propanoïque-3') 3- <i>N</i> -(9-(9-phénylfluorényle)) 5-oxo oxazolidine ((4S)-32)	176
<i>N</i> -(9-(9-phénylfluorényle)) <i>L</i> -glutamate de di- <i>tert</i> -butyle ((2S)-31)	177
Acide <i>N</i> -benzyloxycarbonyle <i>L</i> -glutamique ((2S)-34a)	178
(4S) 4-(Acide propanoïque-3') 3- <i>N</i> -benzyloxycarbonyle 5-oxo oxazolidine ((4S)-35a)	178
(4S) 4-(Chlorure de propanoyl-3') 3- <i>N</i> -benzyloxycarbonyle 5-oxo oxazolidine ((4S)-36)	179
Glutarate de monométhyle (38)	179
4-(Chloroformyle) butanoate de méthyle (39)	180
Acide <i>N,N</i> -phtalimido <i>L</i> -glutamique ((2S)-40)	181
Anhydride <i>N,N</i> -phtalimido <i>L</i> -glutamique ((2S)-41)	181
Acide <i>N-tert</i> -butoxycarbonyle <i>L</i> -glutamique ((2S)-34b) ..	182
(4S) 4-(Acide propanoïque-3') 3- <i>N-tert</i> -butyloxycarbonyle 5-oxo oxazolidine ((4S)-35b)	183
(4S) 4-(Imidazolide de l'acide propanoïque-3') 3- <i>N-tert</i> -butyloxycarbonyle 5-oxo oxazolidine ((4S)-42b)	183
<i>N</i> -(9-(9-phénylfluorényle)) <i>L</i> -glutamyle de γ -méthyl - <i>L</i> -glutamate de diméthyle (54)	184
3.10 Références	186

Chapitre 4-1:***Synthesis of Enantiopure α,ω -Diamino Dicarboxylates and Azabicycloalkane Amino Acids by Claisen Condensation of α -N-(Phenylfluorenyl)amino Dicarboxylates***

Henry-Georges Lombart and William D. Lubell*, <i>Journal of Organic Chemistry</i> , 1994 , 59, 6147-6149.....	190
4.1.1 Abstract	190
4.1.2 Summary	191
4.1.3 Results and Discussion	192
4.1.4 References	199
4.1.5 Experimental	202
General	202
β -Keto Esters 6	203
(2 <i>S</i> , 8 <i>S</i>)-Di- <i>tert</i> -butyl 5-Oxo 2,8-Di- <i>N</i> -(PhFl)amino Azelate (8)	204
(3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)- and (3 <i>S</i> , 6 <i>R</i> , 9 <i>S</i>)-Methyl 2-Oxo-3- <i>N</i> -(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylates (9)	204
(3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)- and (3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>R</i>)-2-Oxo-3- <i>N</i> -(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic Acid ((3<i>S</i>, 6<i>S</i>, 9<i>S</i>)-1 and (3<i>S</i>, 6<i>S</i>, 9<i>R</i>)-1)	205
(3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-2-Oxo-3- <i>N</i> -(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic Acid ((3<i>S</i>, 6<i>S</i>, 9<i>S</i>)-1)	206
Determination of Enantiomeric Purity of (3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-Methyl 2-Oxo-3- <i>N</i> -(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate ((6<i>S</i>)-9)	207

Chapitre 4-2:***Rigid Dipeptide Mimetics. Efficient Synthesis of Enantiopure Indolizidinone Amino Acids***

Henry-Georges Lombart and William D. Lubell*, <i>Journal of Organic Chemistry</i> , 1996 , 61, 9437-9446	208
4.2.1 Abstract	208

4.2.2	Introduction	209
4.2.3	Results and Discussion	214
4.2.3.1	Synthesis of α,ω -Diaminodicarboxylate via Claisen Condensation of <i>N</i> -(PhF)Glutamates	214
4.2.3.2	Synthesis of Indolizidinone Amino Acid 1	220
4.2.3.3	Assignment of Stereochemistry and Enantiomeric Purity of Indolizidinone Amino Acid 1	227
4.2.4	Conclusion	229
4.2.5	Experimental	231
	General	231
	(<i>2S</i>)- α - <i>tert</i> -Butyl γ -Methyl <i>N</i> -(PhF)Glutamate ((2S)-2a)	232
	(<i>2R</i>)- α - <i>tert</i> -Butyl γ -Methyl <i>N</i> -(PhF)Glutamate ((2R)-2a)	232
	(<i>2S, 8S</i>)-Di- <i>tert</i> -butyl 5-Oxo-2,8-di-[<i>N</i> -(PhF)amino]azelate ((2S, 8S)-5a)	232
	(<i>2S, 4RS, 8S</i>)-di- <i>tert</i> -butyl 4-carbomethoxy-5-oxo-2,8-di-[<i>N</i> - (PhF)amino]azelate ((2S, 4RS, 8S)-3a)	233
	(<i>2S</i>)- <i>tert</i> -butyl <i>N</i> -(PhF)pyroglutamate ((2S)-4a)	233
	(<i>2S, 8S</i>)-Dimethyl 5-Oxo-2,8-di-[<i>N</i> -(PhF)amino]azelate ((2S, 8S)-5b)	234
	(<i>2S, 8S</i>)-5-oxo-2,8-di-[<i>N</i> -(PhF)amino]azelate (6)	235
	(<i>3S, 6S, 9S</i>)- and (<i>3S, 6R, 9S</i>)-Methyl 2-Oxo-3- <i>N</i> -(BOC)amino-1- -azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylates ((3S, 6S, 9S)- and ((3S, 6R, 9S)-12)	236
	(<i>2S, 5RS, 3'S</i>)-methyl 5-(3'- <i>N</i> -(BOC)amino-3'- methyloxycarbonylpropyl)- <i>N</i> -(BOC)prolinate	237
	(<i>3S, 6S, 9S</i>)-methyl 2-oxo-3- <i>N</i> -(BOC)amino-1- azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate	238
	(<i>3R, 6R, 9R</i>)- and (<i>3R, 6S, 9R</i>)-Methyl 2-Oxo-3- <i>N</i> -(BOC)amino- 1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylates ((3R, 6R, 9R)- and ((3R, 6S, 9R)-12)	238

(3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-Methyl 2-Oxo-3- <i>N</i> -(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate ((3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-12) from Dimethyl Azelate (2 <i>S</i> , 8 <i>S</i>)-5b	239
(3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>R</i>)-Methyl 2-Oxo-3- <i>N</i> -(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate ((3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>R</i>)-12) Via Epimerization of (3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-12	240
(3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-2-Oxo-3- <i>N</i> -(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic Acid ((3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-1)	240
(3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>R</i>)-2-oxo-3- <i>N</i> -(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic acid ((3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>R</i>)-1)	241
(3 <i>S</i> , 6 <i>R</i> , 9 <i>S</i>)-2-Oxo-3- <i>N</i> -(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic Acid ((3 <i>S</i> , 6 <i>R</i> , 9 <i>S</i>)-1)	241
(3 <i>S</i> , 6 <i>R</i> , 9 <i>R</i>)-2-Oxo-3- <i>N</i> -(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic Acid ((3 <i>S</i> , 6 <i>R</i> , 9 <i>R</i>)-1)	241
(3 <i>R</i> , 6 <i>R</i> , 9 <i>R</i>)-2-Oxo-3- <i>N</i> -(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic Acid ((3 <i>R</i> , 6 <i>R</i> , 9 <i>R</i>)-1)	242
(3 <i>R</i> , 6 <i>R</i> , 9 <i>S</i>)-2-Oxo-3- <i>N</i> -(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic Acid ((3 <i>R</i> , 6 <i>R</i> , 9 <i>S</i>)-1)	242
(3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-Methyl 2-Oxo-3-amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate Hydrochloride ((3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-11)	242
Recycle of (2 <i>S</i> , 5 <i>RS</i> , 3' <i>S</i>)-Methyl 5-(3'- <i>N</i> -(BOC)Amino-3'-methyloxycarbonylpropyl)- <i>N</i> -(BOC)prolinate ((2 <i>S</i> , 5 <i>RS</i> , 3' <i>S</i>)-14) into (3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)- and (3 <i>S</i> , 6 <i>R</i> , 9 <i>S</i>)-12	242
(2 <i>S</i> , 8 <i>S</i>)-Di- <i>tert</i> -butyl 5-Hydroxy-2,8-di-[<i>N</i> -(PhF)amino]azelate ((2 <i>S</i> , 8 <i>S</i>)-7a)	243
(2 <i>S</i> , 5 <i>S</i> , 3' <i>S</i>)- <i>tert</i> -Butyl 5-(3'- <i>N</i> -(PhF)amino-3'- <i>tert</i> -butyloxy carbonylpropyl)- <i>N</i> -(PhF)prolinate ((2 <i>S</i> , 5 <i>S</i> , 3' <i>S</i>)-15) ..	244
(3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-Methyl 2-Oxo-3- <i>N</i> -(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate ((3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-12) from (2 <i>S</i> , 5 <i>S</i> , 3' <i>S</i>)-15	244

Enantiomeric Purity of (3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-Methyl 2-Oxo-3- <i>N</i> - (BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate (3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-12)	245
4.2.6 References	247

Chapitre 5:

Synthèse et analyse conformationnelle de peptides modèles

<i>incorporant l'acide aminé indolizidinone</i>	254
5.1 Introduction	254
5.2 Analyses conformationnelles des systèmes indolizidinones: précédents	256
5.3 Article:	
A Claisen Condensation Approach To Prepare Azabicycloalkane Amino Acid β-Turn Mimetics H.-G. Lombart and W. D. Lubell, <i>In Peptides 1994 (Proceedings of the 23rd European Peptide Symposium)</i> , H. L. S. Maia, Editor; ESCOM, Leiden, The Netherlands, 1995, p.696	260
5.4 Les amides modèles Ac-AAI-NHMe	264
5.4.1 Synthèse	265
5.4.2 Modélisation moléculaire	269
5.4.3 Études RMN	276
5.4.4 Études IR	288
5.4.5 Dichroïsme circulaire	290
5.5 Le peptide modèle DNP-Gly-AAI-Gly- <i>p</i> NA	293
5.5.1 Synthèse	293
5.5.2 Dichroïsme circulaire	295
5.6 Le peptide modèle Ac-Val-AAI-Val-N(Me) ₂	298
5.6.1 Synthèse	298
5.6.2 Modélisation moléculaire	301
5.6.3 Études RMN	303
5.6.4 Études IR	307

5.6.5	Dichroïsme circulaire	308
5.7	Conclusion partielle	309
5.8	Partie expérimentale	310
	General	310
	General procedure A: TBTU coupling	310
	General procedure B: TFA deprotection	311
	General procedure C: HCl deprotection	311
	General procedure D: Acetamide formation	311
	Synthesis of <i>N'</i> -Methyl 2-Oxo-3-acetamido-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide ((3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-Ac-IAA-NHMe, 12)	313
	(3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)- <i>N'</i> -Methyl 2-Oxo-3- <i>N</i> -(Boc)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide ((3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-Boc-IAA-NHMe, 13), by general procedure A	313
	(3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)- <i>N'</i> -Methyl 2-Oxo-3- <i>N</i> -(Boc)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide ((3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-Boc-IAA-NHMe, 13), via methyl ester 14	314
	(3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)- <i>N'</i> -Methyl 2-Oxo-3-amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide Hydrochloride ((3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-HCl•IAA-NHMe, 13a)	314
	(3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)- <i>N'</i> -Methyl 2-oxo-3-amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide Trifluoroacetate ((3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-CF ₃ CO ₂ H•IAA-NHMe, 13b)	315
	(3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)- <i>N'</i> -Methyl 2-Oxo-3-acetamido-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide ((3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-Ac-IAA-NHMe, 12)	316
	(3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)- <i>N'</i> -Methyl 2-Oxo-3-acetamido-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide ((3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-Ac-IAA-NHMe, 12) and (3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)- <i>N'</i> -Methyl 2-Oxo-3-trifluoroacetamido-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide ((3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-CF ₃ CO-IAA-NHMe, 15)	317

Synthesis of diastereoisomers of <i>N</i> '-Methyl 2-Oxo-3-acetamido-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide	317
(3 <i>R</i> , 6 <i>R</i> , 9 <i>R</i>)- <i>N</i> '-Methyl 2-Oxo-3- <i>N</i> -(Boc)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide ((3 <i>R</i> , 6 <i>R</i> , 9 <i>R</i>)-Boc-IAA-NHMe, 17)	318
(3 <i>R</i> , 6 <i>R</i> , 9 <i>R</i>)- <i>N</i> '-Methyl 2-Oxo-3-amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide Hydrochloride ((3 <i>R</i> , 6 <i>R</i> , 9 <i>R</i>)-HCl•IAA-NHMe, 17a)	318
(3 <i>R</i> , 6 <i>R</i> , 9 <i>R</i>)- <i>N</i> '-Methyl 2-Oxo-3-acetamido-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide ((3 <i>R</i> , 6 <i>R</i> , 9 <i>R</i>)-Ac-IAA-NHMe, 18)	318
(3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>R</i>)- <i>N</i> '-Methyl 2-Oxo-3- <i>N</i> -(Boc)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide ((3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>R</i>)-Boc-IAA-NHMe, 20)	319
(3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>R</i>)- <i>N</i> '-Methyl 2-Oxo-3-amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide Hydrochloride ((3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>R</i>)-HCl•IAA-NHMe, 20a)	320
(3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>R</i>)- <i>N</i> '-Methyl 2-Oxo-3-acetamido-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide ((3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>R</i>)-Ac-IAA-NHMe, 21)	320
(3 <i>S</i> , 6 <i>R</i> , 9 <i>S</i>)- <i>N</i> '-Methyl 2-Oxo-3- <i>N</i> -(Boc)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide ((3 <i>S</i> , 6 <i>R</i> , 9 <i>S</i>)-Boc-IAA-NHMe, 23)	321
(3 <i>S</i> , 6 <i>R</i> , 9 <i>S</i>)- <i>N</i> '-Methyl 2-Oxo-3-amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide Hydrochloride ((3 <i>S</i> , 6 <i>R</i> , 9 <i>S</i>)-HCl•IAA-NHMe, 23a)	321
(3 <i>S</i> , 6 <i>R</i> , 9 <i>S</i>)- <i>N</i> '-Methyl 2-Oxo-3-acetamido-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide ((3 <i>S</i> , 6 <i>R</i> , 9 <i>S</i>)-Ac-IAA-NHMe, 24)	322

Synthesis of (3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)- <i>N'</i> - <i>p</i> -Nitrophenyl 2-Oxo-3-(<i>N</i> -2,4-dinitrophenylglycinamido)-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carbonylglycinamide ((3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-DNP-Gly-IAA-Gly- <i>p</i> NA, 26)	323
<i>N'</i> - <i>p</i> -Nitrophenyl <i>N</i> -(Boc)glycinamide (Boc-Gly- <i>p</i> NA, 27)	323
<i>N'</i> - <i>p</i> -Nitrophenyl glycinamide Hydrochloride (HCl•Gly- <i>p</i> NA, 28)	324
(3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)- <i>N'</i> - <i>p</i> -nitrophenyl 2-Oxo-3- <i>N</i> -(Boc)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carbonylglycinamide ((3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-Boc-IAA-Gly- <i>p</i> NA, 29)	324
(3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)- <i>N'</i> - <i>p</i> -nitrophenyl 2-Oxo-3-amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carbonylglycinamide Trifluoroacetate ((3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-CF ₃ CO ₂ H•IAA-Gly- <i>p</i> NA, 29a)	325
(3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)- <i>N'</i> - <i>p</i> -nitrophenyl 2-Oxo-3- <i>N</i> -(Boc)glycinamido-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carbonylglycinamide ((3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-Boc-Gly-IAA-Gly- <i>p</i> NA, 30)	325
(3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)- <i>N'</i> - <i>p</i> -nitrophenyl 2-Oxo-3-glycinamido-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carbonylglycinamide Hydrochloride ((3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-HCl•Gly-IAA-Gly- <i>p</i> NA, 30a)	326
(3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)- <i>N'</i> - <i>p</i> -Nitrophenyl 2-Oxo-3-(<i>N</i> -2,4-dinitrophenylglycinamido)-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carbonylglycinamide ((3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-DNP-Gly-IAA-Gly- <i>p</i> NA, 26)	327
Synthesis of (3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)- <i>N',N'</i> -Dimethyl 2-Oxo-3-(<i>N</i> -acetyl-L-valinamido)-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carbonyl-L-valinamide ((3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-Ac-Val-IAA-Val-N(Me) ₂ , 25)	329
<i>N',N'</i> -Dimethyl (Boc)-L-valinamide (Boc-Val-N(Me) ₂ , 32)	329
<i>N',N'</i> -Dimethyl L-valinamide Trifluoroacetate (CF ₃ CO ₂ H•Val-N(Me) ₂ , 33)	330

(3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)- <i>N</i> ', <i>N</i> '-Dimethyl 2-Oxo-3- <i>N</i> -(Boc)amido-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carbonyl-L-valinamide ((3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-Boc-IAA-Val-N(Me) ₂ , 34)	330
(3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)- <i>N</i> ', <i>N</i> '-Dimethyl 2-Oxo-3-amido-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carbonyl-L-valinamide Trifluoroacetate ((3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-CF ₃ CO ₂ H•IAA-Val-N(Me) ₂ , 34a)	331
(3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)- <i>N</i> ', <i>N</i> '-Dimethyl 2-Oxo-3-(<i>N</i> -(Boc)-L-valinamido)-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carbonyl-L-valinamide ((3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-Boc-Val-IAA-Val-N(Me) ₂ , 35)	331
(3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)- <i>N</i> ', <i>N</i> '-Dimethyl 2-Oxo-3-(<i>N</i> -L-valinamido)-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carbonyl-L-valinamide Hydrochloride ((3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-HCl•Val-IAA-Val-N(Me) ₂ , 35a)	332
(3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)- <i>N</i> ', <i>N</i> '-Dimethyl 2-Oxo-3-(<i>N</i> -L-valinamido)-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carbonyl-L-valinamide Trifluoroacetate ((3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-CF ₃ CO ₂ H•Val-IAA-Val-N(Me) ₂ , 35b)	333
(3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)- <i>N</i> ', <i>N</i> '-Dimethyl 2-Oxo-3-(<i>N</i> -acetyl-L-valinamido)-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carbonyl-L-valinamide ((3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-Ac-Val-IAA-Val-N(Me) ₂ , 25)	334
Conformational Analysis	336
Molecular Modeling Calculations	336
FT-IR Experiments	337
Circular Dichroism Experiments	337
5.9 Références	338

Chapitre 6:

<i>Synthèse et évaluation d'un analogue de la Gramicidine S incorporant l'acide aminé indolizidinone</i>	345
6.1 Introduction	345

6.2	Article:	
		Use of Azabicycloalkane Amino Acids to Stabilize β-Turn Conformations in Model Peptides and Gramicidin S
		H.-G. Lombart and W. D. Lubell, <i>In Peptides: Chemistry, Structure and Biology</i> , P. T. P. Kaumaya and R. S. Hodges, Editors; ESCOM Sci. Pub. B.V.: Leiden, The Netherlands, 1996, p.695
		347
6.3	Article:	
		Exploring Relationships Between Peptide Conformation and Biological Activity Using Indolizidinone Amino Acids. Synthesis of a Potent Gramicidin S Analog Having Reduced Hemolytic Activity,
		Henry-Georges Lombart and William D. Lubell
		351
6.3.1	Abstract	351
6.3.2	Introduction	352
6.3.3	Synthesis of [IAA ^{4-5,4'-5'}]-GS (1)	356
6.3.4	Circular Dichroism Spectral Analysis	359
6.3.5	Antimicrobial and Hemolytic Activities	361
6.3.6	Discussion and Conclusion	363
6.3.7	Experimental Section	366
	General	366
	BOC-(Cbz)Orn-Leu-OAllyl Ester	367
	BOC-Val-(Cbz)Orn-Leu-OAllyl Ester	367
	Val-(Cbz)Orn-Leu-OAllyl Ester Trifluoroacetate (3) .	368
	BOC-IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu-OAllyl Ester (4)	369
	BOC-IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu (5)	369
	IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu-OAllyl Ester	
	Trifluoroacetate (6)	370
	BOC-IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu-IAA-Val-(Cbz)Orn-	
	Leu-Oallyl Ester (7)	371

IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu-IAA-Val-(Cbz)Orn-	
Leu Trifluoroacetate (8)	372
<i>Cyclo</i> -(IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu) ₂ (9)	373
<i>Cyclo</i> -(IAA-Val-Orn-Leu) ₂ ([IAA ^{4-5,4'-5'}]-GS, 1)	374
6.3.8	References
6.3.9	Chemical Assignment of NMR Spectra
	General
	BOC-(Cbz)Orn-Leu-OAllyl Ester
	BOC-Val-(Cbz)Orn-Leu-OAllyl Ester
	Val-(Cbz)Orn-Leu-OAllyl Ester Trifluoroacetate (3) .
	BOC-IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu-OAllyl Ester (4)
	BOC-IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu (5)
	IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu-OAllyl Ester
	Trifluoroacetate (6)
	BOC-IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu-IAA-Val-(Cbz)Orn-
	Leu-Oallyl Ester (7)
	<i>N</i> -BOC-IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu-IAA-Val-(Cbz)Orn-
	Leu-OH
	IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu-IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu
	Trifluoroacetate (8)
	<i>Cyclo</i> -(IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu) ₂ (9)
	<i>Cyclo</i> -(IAA-Val-Orn-Leu) ₂ ([IAA ^{4-5,4'-5'}]-GS, 1)

Chapitre 7:

Synthèse de composés pseudodipeptidiques mercapto-acétyles incorporant l'acide aminé indolizidinone: application pour

<i>l'inhibition double de l'ACE et de la NEP</i>	388
7.1	Introduction
7.2	Le rôle des enzymes ACE et NEP
7.3	Le mécanisme d'action des enzymes ACE et NEP .
7.4	La conception d'inhibiteur des enzymes ACE et

	NEP	395
7.5	Les peptidomimétiques utilisés comme inhibiteurs des enzymes ACE et NEP	400
7.5.1	Inhibiteurs de l'ACE	401
7.5.2	Inhibiteurs de la NEP	403
7.5.3	Inhibiteurs mixtes ACE/NEP	403
7.6	Stratégie et synthèse des analogues incorporant l'AAI	411
7.6.1	Stratégie	411
7.6.2	Synthèse	412
7.7	Résultats et commentaires	414
7.8	Partie expérimentale	
	General	415
	(S)-2-Bromo-3-phenylpropanoic acid (32)	415
	(R)-2-(Benzoylthio)-3-phenylpropanoic acid (33)	415
	(3S, 6S, 9S)- and (3S, 6R, 9S)-Methyl 2-Oxo-3- amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate hydrochloride ((3S, 6S, 9S)-34 and (3S, 6R, 9S)-34)	416
	(2'R, 3S, 6S, 9S)-Methyl 2-Oxo-3-[2'-(benzoylthio)-1'- oxo-3'-phenylpropanoyl]amino-1- azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate ((2'R, 3S, 6S, 9S)-35)	417
	(2'R, 3S, 6R, 9S)-Methyl 2-Oxo-3-[2'-(benzoylthio)-1'- oxo-3'-phenylpropanoyl]amino-1- azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate ((2'R, 3S, 6R, 9S)-35)	419
	(2'R, 3S, 6S, 9S)- 2-Oxo-3-[2'-mercapto-1'-oxo-3'- phenylpropanoyl]amino-1- azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate ((2'R, 3S, 6S, 9S)-2)	419

	(2'R, 3S, 6R, 9S)- 2-Oxo-3-[2'-mercapto-1'-oxo-3'-phenylpropanoyl]amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate ((2'R, 3S, 6R, 9S)-2)	421
7.9	Références	422
Chapitre 8:		
	<i>Travaux futurs</i>	434
8.1	Stratégie et synthèse	434
8.2	Analyse conformationnelle	437
8.3	Applications	439
Chapitre 9:		
	<i>Conclusion</i>	441
Annexes:		
	<i>Compléments aux chapitre 2</i>	445
	<i>Spectres RMN choisis</i>	449
	<i>Courbes d'inhibition de l'ACE et de la NEP pour les analogues ((2'R, 3S, 6R, 9S)-2 et (2'R, 3S, 6R, 9S)-2</i>	469

Liste des figures

Chapitre 1:

Figure 1.	Peptides et conformations	2
Figure 2.	Définition des angles de torsion dans les chaînes peptidiques	4
Figure 3.	Structure générale d'un repliement β	6
Figure 4.	Structure générale et valeurs des angles de torsion (deg.) des repliements γ	8
Figure 5.	Représentation des repliements β de type II et II' ..	9
Figure 6.	Lactames de Freidinger	11
Figure 7.	Équilibre conformationnel du peptide NAcP9	13
Figure 8.	Peptidomimétique et incorporation dans un analogue 3 du peptide natif NAcP9.	14
Figure 9.	Équilibre conformationnel dans le peptide fibrinopeptide A	15
Figure 10.	Peptidomimétique et incorporation dans un inhibiteur 6 de la thrombine	16
Figure 11.	Équilibre <i>cis-trans</i> des prolines	18
Figure 12.	Équilibre en faveur du rotamère <i>cis</i> dans les prolines	18
Figure 13.	Conformation privilégiée du rotamère <i>trans</i> dans les prolines	19
Figure 14.	Représentation des conformations d'énergie minimale des deux diastéréoisomères (6 <i>S</i>)-9 et (6 <i>R</i>)-9	23
Figure 15.	BTD et conformation	23

Chapitre 2:

Figure 1.	40
Figure 2.	43
Figure 3.	60
Figure 4.	62
Figure 5.	74
Figure 6.	93

Chapitre 4-1:

Figure 1. 1-Azabicyclo[X.3.0]alkane Amino Acid Analogues .	193
---	-----

Chapitre 4-2:

Figure 1. Representative Examples of Indolizidinone Amino Acid Analogues	210
Figure 2. ORTEP view of Indolizidinone Methyl Ester 12 . Ellipsoids drawn at 40% probability level. Hydrogens represented by spheres of arbitrary size	228

Chapitre 5:

Figure 1. Peptides modèles et conformations	257
Figure 2. Peptides bio-actifs et conformations	259
Figure 3. Conformations possibles de l'amide modèle (3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)- 12	264
Figure 4. Représentation des minima des conformations de repliements γ et β pour chaque amide (avec le chloroforme comme modèle de solvation)	271
Figure 5. Représentation des minima des conformations de repliements γ et β pour chaque amide (avec l'eau comme modèle de solvation)	273
Figure 6. Effets de la température sur les déplacements chimiques des protons amides du (3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-Ac-AAI-NHMe (12) dans le dichlorométhane	278

Figure 7. Effets de la concentration sur les déplacements chimiques des protons amides du (3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-Ac-AAI-NHMe (12) dans le dichlorométhane	278
Figure 8. Effets de l'addition de DMSO sur les déplacements chimiques des protons amides du (3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-Ac-AAI-NHMe (12) dans le dichlorométhane	281
Figure 9.	281
Figure 10. Variation de la constante de couplage $^3J_{H-H}$ en fonction de la température pour l'amide (3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-Ac-AAI-NHMe (12)	284
Figure 11. Effets de la température sur les déplacements chimiques des protons amides du (3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>R</i>)-Ac-AAI-NHMe (21) dans le dichlorométhane	286
Figure 12. Variation de la constante de couplage $^3J_{H-H}$ en fonction de la température pour l'amide (3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>R</i>)-Ac-AAI-NHMe (21)	287
Figure 13. Effets de la concentration sur la fréquence d'absorption des bandes des liaisons N-H amides en IR-TF de l'amide (3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-Ac-AAI-NHMe (12) dans le dichlorométhane	289
Figure 14. Effets de la température sur la fréquence d'absorption des bandes des liaisons N-H amides en IR-TF du (3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-Ac-AAI-NHMe (12) dans le dichlorométhane	289
Figure 15. Spectres de dichroïsme circulaire des peptides modèles (3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-Ac-AAI-NHMe (12), (3 <i>R</i> , 6 <i>R</i> , 9 <i>R</i>)-Ac-AAI-NHMe (18) et (3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-Ac-Val-AAI-Val-N(Me) ₂ (25) dans différents solvants	292
Figure 16. Spectres de dichroïsme circulaire des peptides de référence dans le méthanol	296

Figure 17. Spectres de dichroïsme circulaire du peptide (3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-DNP-Gly-AAI-Gly- <i>p</i> -NA (26) dans le méthanol	296
Figure 18.	297
Figure 19. Représentation des minima des conformations de repliements γ et β pour le peptide modèle (3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-Ac-Val-AAI-Val-N(Me) ₂ (25) (avec le chloroforme comme modèle de solvation et OPLS/AMBER comme champs de force)	302
Figure 20. Effets de la température sur les déplacements chimiques des protons amides du peptide (3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-Ac-Val-AAI-Val-N(Me) ₂ (25) dans le dichlorométhane	304
Figure 21. Effets de la concentration sur les déplacements chimiques des protons amides du peptide (3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-Ac-Val-AAI-Val-N(Me) ₂ 25 dans le dichlorométhane	304
Figure 22. Effets de la température sur la fréquence d'absorption des bandes des liaisons N-H amides en IR-TF du peptide (3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-Ac-Val-AAI-Val-N(Me) ₂ (25) dans le dichlorométhane	307

Chapitre 6:

Figure 1. Gramicidin S, Peptide 1 and IAAs 2	353
Figure 2. Circular Dichroism Spectra of [IAA ^{4-5,4'-5}]-GS (- - -) and GS (—) in a) MeOH and b) H ₂ O	360

Chapitre 7:

Figure 1. Schéma des principaux systèmes peptidiques intervenant dans la régulation de la pression sanguine	390
Figure 2.	392

Figure 3. Schéma du site actif de la thermolysine	394
Figure 4. Modèle du site actif de la NEP, déduit des expériences de mutagenèse dirigée	395
Figure 5. Interactions proposées des inhibiteurs de l'ACE et de la NEP avec les sites actifs des deux enzymes et leurs pouvoirs inhibiteurs.	396
Figure 6. Restriction conformationnelle du résidu Ala-Pro dans la conception d'inhibiteurs mixtes de l'ACE et de la NEP	400
Figure 7. Modes de liaisons proposés pour les analogues de type 11 dans les sites actifs de l'ACE et de la NEP par rapport à ceux du captopril et du thiorphan	404
Figure 8. Pharmacophores thiol utilisés dans les inhibiteurs de l'ACE et de la NEP	409
Figure 9. Analogues considérés incorporant l'AAI	411

Chapitre 8:

Figure 1. Dérivés azabicycloalcanes amides <i>N</i> -acétyl <i>N</i> -méthyle	434
Figure 2. Représentation des conformations de repliement β pour les deux diastéréoisomères (6 <i>S</i>)-3 et (6 <i>R</i>)-3	436

Liste des tableaux

Chapitre 1:

Tableau 1. Valeurs des angles de torsion (deg.) des différents repliements β	7
Tableau 2. Comparaison des valeurs des angles de torsion (deg.) des systèmes indolizidinones avec le repliement β de type II'	22

Chapitre 2:

Table 1. Influence of H ₂ Pressure on Reductive Amination of 14	46
Table 2. Synthesis of Thiazabicycloalkane Amino Acid Analogues	70
Table 3. Synthesis of Oxoazabicycloalkane Amino Acid Esters 165	79
Table 4.	85
Table 5.	87
Table 6.	89

Chapitre 3:

Tableau 1. Hydrolyse du <i>N</i> -(9-(9-phénylfluorényle)) L-glutamate de diméthyle (9)	152
--	-----

Chapitre 4-2:

Table 1. Claisen Condensation of <i>N</i> -(PhF)Glutamates	215
Table 2. Hydrolysis and Decarboxylation of Ester 3a	218
Table 3. Influence of H ₂ Pressure on Reductive Amination of 5a	222
Table 4. Synthesis of 1 Via Hydrolysis of Methyl Ester 12	227

Chapitre 5:

Tableau 1. Analyses conformationnelles des amides modèles Ac-AAI-NHMe, en utilisant le chloroforme comme modèle de solvation et le champs de force AMBER	270
Tableau 2. Analyses conformationnelles des amides modèles Ac-AAI-NHMe, en utilisant l'eau comme modèle de solvation et le champs de force AMBER	272
Tableau 3. Variation des coefficients de température des protons amides du (3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-Ac-AAI-NHMe (12) en fonction de la concentration	279
Tableau 4. Variation des coefficients de température des protons amides du (3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>R</i>)-Ac-AAI-NHMe (21) en fonction du pourcentage de DMSO	286
Tableau 5. Analyses conformationnelles du peptide Ac-Val-AAI-Val-N(Me) ₂ (25), en utilisant le chloroforme comme modèle de solvation et le champs de force OPLS/AMBER	301
Tableau 6. Variation des coefficients de température des protons amides du peptide Ac-Val-AAI-Val-N(Me) ₂ (25) en fonction de la concentration	305

Chapitre 6:

Table 1. Antimicrobial Activity (MIC: µg/mL) of Gramicidin S (GS) and [IAA ^{4-5,4'-5'}]-GS (1)	362
Table 2. Hemolytic Activity (µg / mL)	362

Chapitre 7:

Tableau 1a. Pouvoirs inhibiteurs sur l'ACE et la NEP de composés pseudotripeptidiques mercaptoacétyles représentatifs	398
--	-----

Tableau 1b. Pouvoirs inhibiteurs sur l'ACE et la NEP de composés pseudotripeptidiques mercaptoacétyles représentatifs	399
Tableau 2. Pouvoirs inhibiteurs sur l'ACE de composés pseudodipeptidiques représentatifs	402
Tableau 3a. Pouvoirs inhibiteurs sur l'ACE et la NEP d'analogues azabicycliques	406
Tableau 3b. Pouvoirs inhibiteurs sur l'ACE et la NEP d'analogues azabicycliques	410

Chapitre 8:

Tableau 1. Comparaison des valeurs des angles de torsion (deg.) des systèmes azabicyclo[4.4.0]décanes avec le repliement β de type II' et avec les AAI	435
---	-----

Liste des schémas

Chapitre 1:

Schéma 1. Synthèse du "Beta Turn Dipeptide" 10	25
Schéma 2. Synthèse de l'acide aminé indolizidinone 11	26

Chapitre 2:

Schema 1.	44
Schema 2.	46
Schema 3.	47
Schema 4.	48
Schema 5.	50
Schema 6.	52
Schema 7.	53
Schema 8.	54
Schema 9.	55
Schema 10.	56
Schema 11.	58
Schema 12.	59
Schema 13.	63
Schema 14.	65
Schema 15.	65
Schema 16.	66
Schema 17.	68
Schema 18.	75
Schema 19.	76
Schema 20.	78
Schema 21.	80
Schema 22.	81
Schema 23.	82

Schema 24.	83
Schema 25.	85
Schema 26.	87
Schema 27.	87
Schema 28.	88
Schema 29.	89
Schema 30.	90
Schema 31.	92

Chapitre 3:

Schéma 1. Stratégie générale pour la synthèse d'acides aminés azabicyclo[X.Y.0]alcanes	138
Schéma 2. Réactions régiosélectives des énolates de lithium du glutamate	141
Schéma 3. Mécanisme de l'amination réductrice	144
Schéma 4. Stratégie considérée	145

Chapitre 4-1:

Scheme 1. Synthesis of <i>N</i> -(BOC)Amino Indolizidinone Esters 9	194
Scheme 2. Synthesis and Enantiomeric Purity of (3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)- 1	197

Chapitre 4-2:

Scheme 1. General Approach for Synthesizing Azabicyclo[X.Y.0]alkane Amino Acid	211
Scheme 2. Synthesis of 5-Oxo-2,8-Di-[<i>N</i> -(PhF)amino]azelates 5 Via Claisen Condensations of <i>N</i> -(PhF)Glutamates 2	214
Scheme 3. Synthesis of <i>N</i> -(BOC)Amino Indolizidinone Methyl Ester 12 Via Reductive Amination With Azelate 5	220
Scheme 4. Synthesis of 12 Via Reductive Amination of 5a ...	221

Scheme 5. Synthesis of <i>N</i> -(BOC)Amino Indolizidinone Methyl Ester 12 via Alcohol 7a	224
Scheme 6. Synthesis and Enantiomeric Purity of Indolizidinone Amino Acid 1	226

Chapitre 5:

Schéma 1. Synthèse du (3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)- <i>N'</i> -méthyl 2-oxo-3- <i>N</i> -acétamido-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide ((3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-Ac-AAI-NHMe, 12)	266
Schéma 2. Synthèse des <i>N'</i> -méthyl 2-oxo-3-acetamido-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamides ((3 <i>R</i> , 6 <i>R</i> , 9 <i>R</i>)-Ac-AAI-NHMe, 18), ((3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>R</i>)-Ac-AAI-NHMe, 21) et ((3 <i>S</i> , 6 <i>R</i> , 9 <i>S</i>)-Ac-AAI-NHMe, 24)	268
Schéma 3. Synthèse du (3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)- <i>N'</i> - <i>p</i> -nitrophényl 2-oxo-3-(<i>N</i> -2,4-dinitrophénylglycinamido)-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylglycinamide ((3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-DNP-Gly-AAI-Gly- <i>p</i> NA, 26)	294
Schéma 4. Synthèse du (3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)- <i>N',N'</i> -diméthyl 2-oxo-3-(<i>N</i> -acétyl-L-valinamido)-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxyl-L-valinamide ((3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)-Ac-Val-IAA-Val-N(Me) ₂ , 25)	298

Chapitre 6:

Scheme 1. Synthesis of Peptide 1	357
--	-----

Chapitre 7:

Schéma 1. Synthèse des deux analogues (2' <i>R</i> , 3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)- 2 et (2' <i>R</i> , 3 <i>S</i> , 6 <i>R</i> , 9 <i>S</i>)- 2	413
---	-----

Liste des cartes

Chapitre 5:

- Carte 1.** Surface énergétique de l'amide modèle
(3*S*, 6*S*, 9*S*)-Ac-AAI-NHMe (12) 275
- Carte 2.** Surface énergétique de l'amide modèle
(3*S*, 6*S*, 9*R*)-Ac-AAI-NHMe (21) 275
- Carte 3.** Surface énergétique de l'amide modèle
(3*S*, 6*R*, 9*S*)-Ac-AAI-NHMe (24) 275

Liste des abréviations

°C	degré celcius
AAI	acide aminé indolizidinone
Ac	acétyle
ACE	angiotensin-converting-enzyme
APTS	acide <i>p</i> -toluènesulfonique
Boc	<i>tertiary</i> -butyloxycarbonyle
Bn	benzyle
Bz	benzoyle
<i>c</i>	concentration
Cbz	benzyloxycarbonyle
CDI	carbonyle diimidazole
COSY	correlated spectroscopy
<i>d</i>	distance interatomique
D	configuration basée sur la D-glycéraldéhyde
DC	dichroïsme circulaire
DCC	dicyclohexylcarbodiimide
DEAD	diéthylazodicarboxylate
deg	degré
DMAP	4-diméthylaminopyridine
DMF	N,N-diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
E	énergie
ee	excès énantiomérique
Et	éthyle
g	gazeux
GS	gramicidine S
HObt	1-hydroxy-benzotriazole
HMQC	heteronuclear multiple quantum correlation
IAA	voir AAI
Im	imidazolide
IR-TF	infra-rouge à transformée de Fourier

J	constante de couplage
K	degré Kelvin
Kcal	kilocalorie
KHMDS	hexaméthylidisilazamidure de potassium
KJ	kilojoule
L	configuration basée sur la L-glycéraldéhyde
LDA	diisopropylamidure de lithium
LICA	isopropyl cyclohexylamidure de lithium
LiHMDS	hexaméthylidisilazamidure de lithium
Me	méthyle
mmol	millimole
mp	melting point
NaHMDS	hexaméthylidisilazamidure de sodium
NEP	neutral endopeptidase
nOe	nuclearoverhauser effect
pf	point de fusion
Ph	phényle
PhFl	phénylfluorényle
Pht	phtalimido
RMN	résonance magnétique nucléaire
Su	succinimide
t-Bu	<i>tertiary</i> -butyle
TBTU	tétrafluoroborate de benzotriazol-1-yl-1,1,3,3- tétraméthyluronium
TFA	trifluoroacetic acid

Pour les abréviations spécifiques du chapitre 2, voir les pages 96 et 97.

Remerciements

En premier lieu, je voudrais exprimer toute ma reconnaissance à mes parents et à ma famille qui m'ont toujours accordé leur confiance et leur appui tout au long de ces quatre années passées loin d'eux. Merci de m'avoir permis de poursuivre mes études là où je l'ai désiré.

Je tiens à remercier le Dr. Jean-François Marcoux pour son travail de relecture minutieuse de cet ouvrage, ainsi que Benoît Larouche pour son aide. Je voudrais remercier les membres du groupe pour leur collaboration et l'ambiance de recherche qu'ils ont su créer, et en particulier Eric Beausoleil pour son aide et discussions lors des études de modélisation.

Je tiens à remercier l'ensemble du personnel d'encadrement du département de chimie pour leur disponibilité, leur gentillesse et leur collaboration, et en particulier le Dr. Tan Phan-Viet, Sylvie Bilodeau et Robert Mayer du laboratoire de résonance magnétique nucléaire pour leur aide précieuse lors de toutes les expériences RMN.

Finalement, je voudrais remercier le professeur William Lubell pour m'avoir accueilli dans son groupe de recherche et donné l'opportunité d'effectuer ces recherches doctorales.

CHAPITRE 1

Introduction et présentation du sujet de recherche: "Développement d'un nouvel acide aminé indolizidinone et applications en mimétique peptidique."

1.1 Introduction.

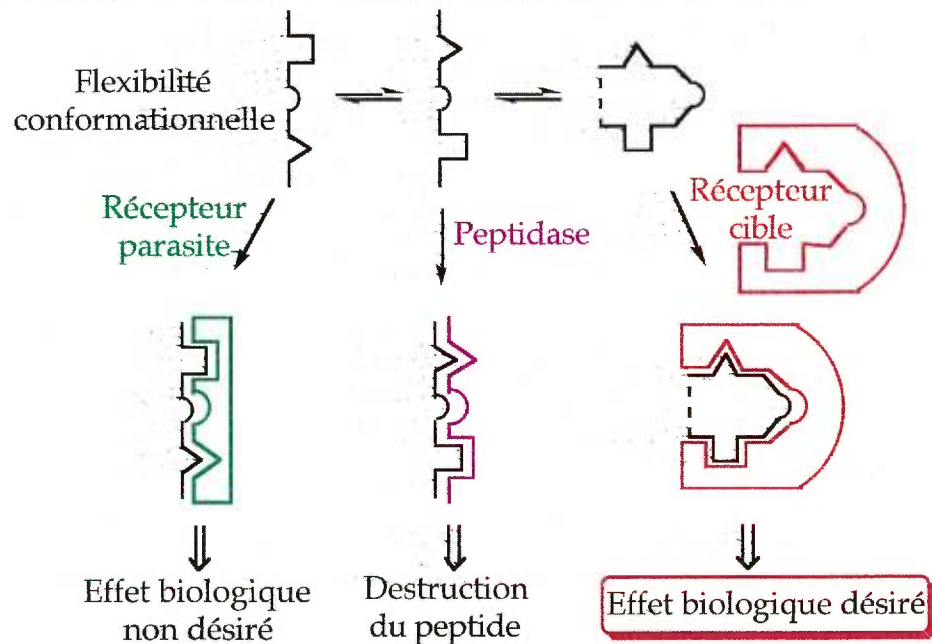
Le développement de médicaments basés sur des structures peptidiques est actuellement l'un des grands défis qui s'offre à la chimie médicinale. La conception et la synthèse d'analogues, agonistes ou antagonistes, de peptides biologiquement actifs présentent des potentiels importants lorsque l'on considère les rôles centraux joués par les peptides et les protéines dans la communication, la régulation et la réplication des systèmes biologiques. Pour cela, la connaissance de la conformation bioactive récepteur-ligand est essentielle pour concevoir rationnellement ces analogues. L'application de ces types de médicaments demeure cependant limitée due aux problèmes associés à la flexibilité conformationnelle et à l'instabilité métabolique, qui résultent d'une faible absorption, d'une dégradation rapide ou d'une élimination de ces structures peptidiques. Une nouvelle famille d'analogues, appelés des mimétiques de peptides ou encore peptidomimétiques, a été conçue et synthétisée. A travers quelques principes, le concept de peptidomimétique

ainsi que l'approche entreprise dans nos travaux de recherches seront exposés dans ce chapitre.

1.2 Peptides et conformations.

L'observation des structures peptidiques au niveau moléculaire permet de mieux comprendre diverses activités biologiques telles l'action récepteur-site, la destruction ou encore les effets parasites des peptides (figure 1).¹ Cependant cette tâche devient difficile due à la flexibilité conformationnelle et à l'instabilité métabolique des chaînes peptidiques. En solution, les peptides existent dans une variété de conformations qui sont en équilibre dynamique entre elles.

Figure 1. Peptides et conformations (adaptée de la référence 1).



Ainsi l'étude de la relation structure-activité est à la fois importante et complexe. La grande difficulté d'accès à la conformation bioactive rend cette recherche difficile. Les contraintes conformationnelles (comme la ligne pointillée, figure 1) restent donc, grâce aux peptidomimétiques, l'une des approches les plus intéressantes afin de résoudre le problème des conformations ligand-récepteur.²

1.3 Les structures secondaires dans les peptides.

Les peptides sont des composés importants dans la nature car ils interviennent dans une multitude de procédés physiologiques. Leurs propriétés biologiques sont directement en relation avec leurs structures et leurs conformations.

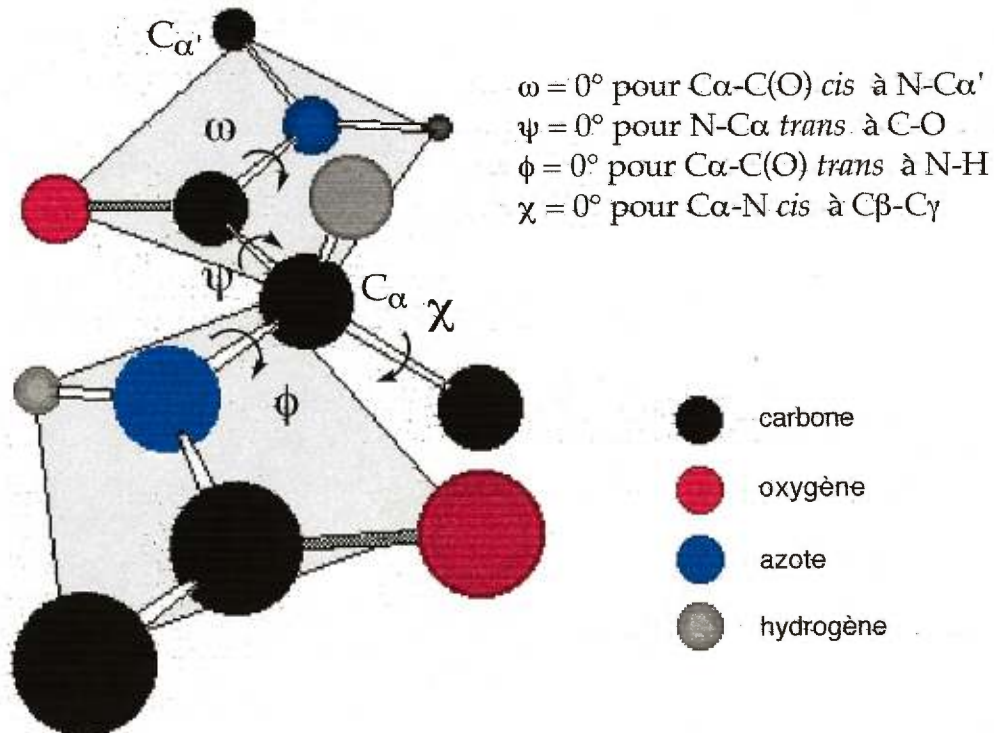
1.3.1 Définition des angles de torsion dans les chaînes peptidiques.

Le carbone α est un pivot à partir duquel s'articulent deux plans amides adjacents, chacun possédant un degré de liberté de rotation autour de la liaison avec le carbone α , comme indiqué sur la figure 2.

Quatre angles de torsion ou angles dièdres (ω , ψ , ϕ pour le squelette et χ pour les chaînes latérales) définissent la géométrie d'un peptide (figure 2).³ Pour une chaîne peptidique en pleine extension (telle que représentée sur la figure 2), tous les angles ont une valeur de 180° .

La liaison peptidique (liaison RCO-NHR'), de par son caractère partiellement double, est fortement stabilisée par résonance et susceptible à l'isomérisation (énergie d'isomérisation 25 kcal/mol⁴). Étant polaire et plane avec deux conformations possibles (avec l'exclusion de toute liberté de rotation), elle est le premier contrôle sur la géométrie que peut adopter un peptide.

Figure 2. Définition des angles de torsion dans les chaînes peptidiques.



La restriction des degrés de liberté d'un peptide, grâce au contrôle de ses angles de torsion, est l'un des principes de base du concept de peptidomimétique.

1.3.2 Les repliements β .

Les structures secondaires des peptides définissent le rapport dans l'espace entre les acides aminés à courte distance, par opposition aux structures tertiaires où il s'agit du rapport à longue distance entre les acides aminés. Trois types de structures secondaires sont connues. Les deux premières, les hélices et les feuillets plissés, définissent une conformation du squelette peptidique qui se répète régulièrement dans l'espace.

En 1968 est paru un article écrit par Vankatachalam⁵ faisant mention pour la première fois d'un troisième type de structure secondaire: les repliements β (ou β -turns).⁶

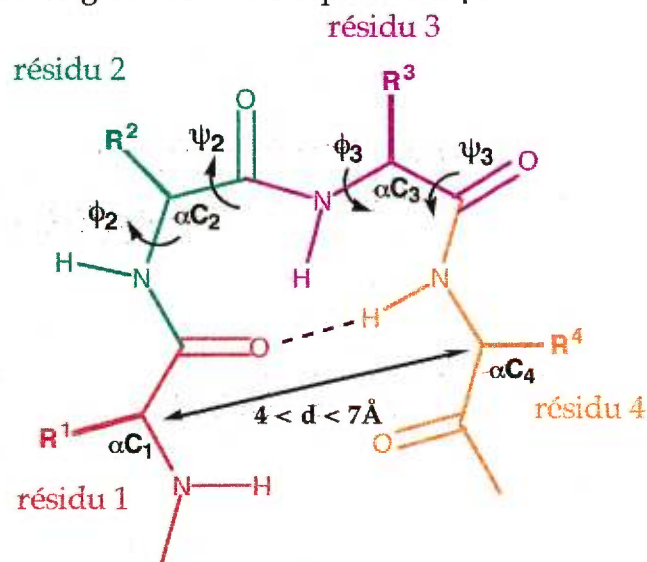
1.3.2.1 Définition.

Dans les hélices ou les feuillets, la chaîne peptidique est en extension. Cependant cette chaîne peptidique est capable de changer sa direction de 180° , c'est-à-dire d'effectuer un repliement sur elle-même pour induire un pont hydrogène intramoléculaire formant un cycle à 10 chaînons.^{7,8} Un repliement de type β est donc composé de quatre résidus acides aminés formant une boucle et possède les propriétés suivantes (figure 3):

- les carbones α des résidus 1 et 4 sont à une distance interatomique inférieure à 7\AA ;

- une liaison hydrogène entre les liaisons amides opposées des résidus 1 (C=O) et 4 (N-H) à une distance interatomique inférieure à 3.5Å;
- le repliement ne fait pas partie d'une région hélicoïdale.

Figure 3. Structure générale d'un repliement β .⁸



Huit types de repliements ont été répertoriés.⁸ Ils sont classés suivant les valeurs des angles de torsion ϕ et ψ des résidus 2 et 3. Le tableau 1 présente les valeurs des angles de torsion de ces différents types. Les plus importants, en nombre, sont les repliements β de type I, I', II, II' et VI. Une représentation des repliements β de type II et II' est présentée dans la section 1.3.2.2.

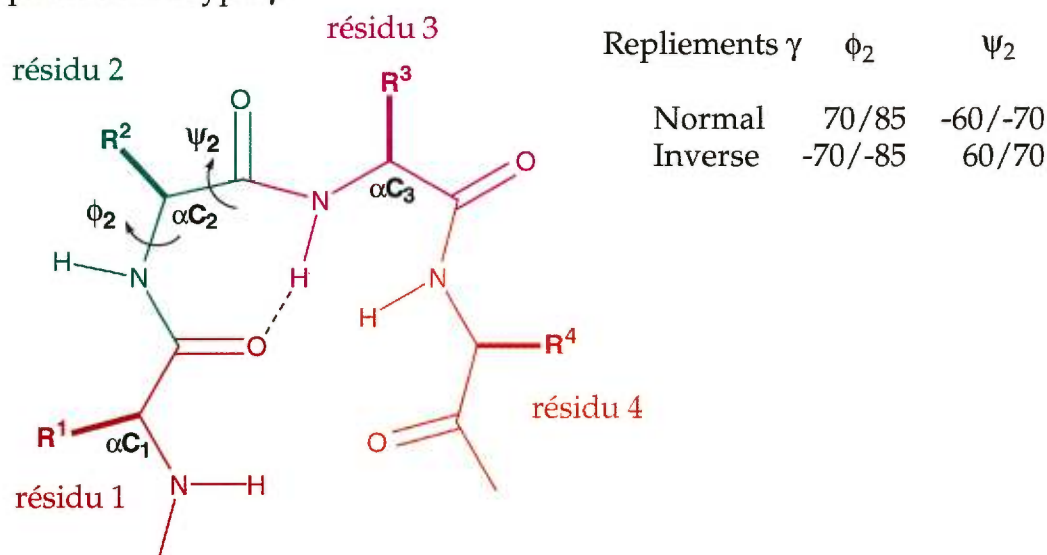
Les repliements β peuvent ainsi induire des conformations de feuillets plissés β (β -sheets), d'épingle à cheveux β (β -hairpins) ou d'hélices β (β -helices).

Tableau 1. Valeurs des angles de torsion (deg.) des différents repliements β .⁸

Type de repliement	ϕ_2	ψ_2	ϕ_3	ψ_3
I	-60	-30	-90	0
I'	60	30	90	0
II	-60	120	80	0
II'	60	-120	-80	0
III	-60	-30	-60	-30
III'	60	30	60	30
IV	un repliement avec 2 angles ou plus qui diffèrent d'au moins 40° de ceux donnés ci-dessus			
V	-80	80	80	-80
V'	80	-80	-80	80
VIa	-60	120	-90	0
VIb	-120	120	-60	0
	une liaison <i>cis</i> Pro à la position 3			
VII	-60	-30	-120	120
VIII	une discontinuité dans la chaîne protéinique créée par $\psi_2 \sim 180^\circ$ et $\phi_3 < 60^\circ$ ou $\psi_2 < 60^\circ$ et $\phi_3 \sim 180^\circ$			

Par ailleurs, la chaîne peptidique est en mesure d'effectuer un repliement sur elle-même pour induire un pont hydrogène intramoléculaire formant un cycle à 7 chaînons.⁸ Un repliement de type γ est donc composé de trois résidus acides aminés formant une boucle (figure 4). Il existe deux types de repliements γ , qui sont classés d'après les valeurs des angles de torsion ϕ et ψ des résidus 2. La figure 4 présente les valeurs de ces angles de torsion.⁹

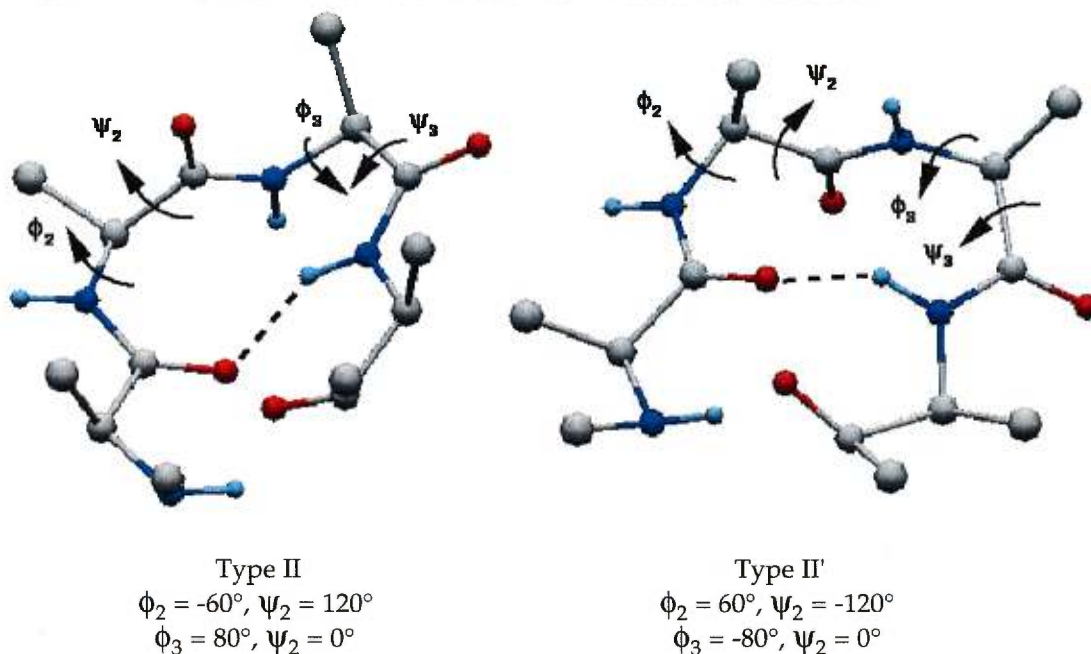
Figure 4. Structure générale et valeurs des angles de torsion (deg.) d'un repliement de type γ .



1.3.2.2 Représentation des repliements β de type II et II'.

Les représentations schématiques des repliements β de type II et II' sont décrites sur la figure 5. Il est à noter que la liaison peptidique entre les résidus 2 et 3 se positionne perpendiculairement à la surface du repliement avec une rotation de 180° entre les deux types II et II'. Les repliements β de type II' sont présents dans de nombreux composés naturels ou dans leurs analogues tels que dans la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone), la LHRH (Luteinizing Hormone-Releasing Hormone), la hGH (human Growth Hormone-Releasing Factor), la bradykinine et la cyclosporine.¹⁰

Figure 5. Représentation des repliements β de type II et II'.



1.3.2.3 Importance des repliements.

Les repliements ont une grande importance en chimie médicinale et biologique. De par leur conformation, les repliements β et γ exposent les chaînes latérales de leurs résidus à l'environnement externe avec une grande surface de contact. Il peut donc y avoir création d'interactions avec des macromolécules qui sont propices aux reconnaissances peptidiques. Situés sur les surfaces protéiques, les repliements peptidiques sont importants car ils fonctionnent comme sites pour la reconnaissance antigène,¹¹ la phosphorylation,¹² la glycosylation¹³ ou le transport membranaire.¹⁴

Ainsi la connaissance de ces phénomènes physiologiques passe par la détermination de la conformation bioactive des structures peptidiques et cette connaissance devrait donc permettre la conception rationnelle d'analogues.

1.4 Conception de peptidomimétiques.

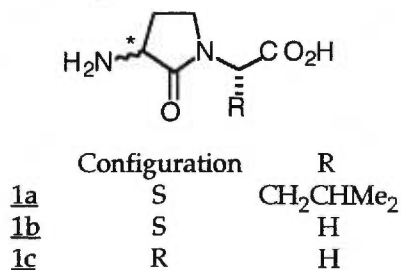
1.4.1 Définition.

Un peptidomimétique est un composé qui, comme ligand d'un récepteur, peut imiter ou bloquer les effets biologiques d'un peptide au niveau de son récepteur.¹ Les peptidomimétiques sont souvent des analogues conformationnellement rigides. Ils sont conçus rationnellement de peptides naturels afin de surmonter les problèmes associés aux structures peptidiques et de posséder des propriétés pharmacologiques. Ainsi, ils émergent comme des outils importants pour construire des structures tridimensionnelles bioactives complémentaires aux récepteurs peptidiques.¹⁵ Un peptidomimétique peut accroître la stabilité et le contrôle conformationnel ainsi que la biodisponibilité d'un peptide dans lequel il est incorporé. En effet, les peptidomimétiques peuvent avoir une plus grande absorption, une plus grande stabilité à la dégradation ou une plus grande affinité pour leurs récepteurs.

Le premier exemple d'un peptidomimétique, un mimétique de repliement β dérivé d'un 3-amino γ -lactame **1** (figure 6), a été conçu par

Freidinger dès 1980.¹⁶ Pour limiter la liberté conformationnelle autour de l'angle dièdre ψ , Freidinger a eu l'idée d'utiliser des lactames cycliques. Dépendant de la chiralité du lactame, la valeur de l'angle de torsion ψ est compatible avec celle d'un repliement β de type II ou II'. Il a été intégré dans un analogue de l'hormone LHRH avec un certain succès (analogue actif et sélectif), dans l'idée de geler la conformation bioactive présumée ayant un repliement β de type II'.

Figure 6. Lactames de Freidinger.



1.4.2 Importance.

Les peptidomimétiques de conformation de repliements β ou γ sont le jeu d'un intérêt particulier. Ces analogues conformationnellement rigides des peptides naturels sont ainsi apparus comme des outils importants pour les études structure-activité dans les systèmes biologiques.^{8,16,17} Ils ont donc donné à la chimie médicinale des capacités à étudier les conformations bioactives tout en débouchant sur des applications concrètes. Ces mimétiques de peptides des protéines originales ont été utilisés pour concevoir des analogues puissants,¹⁸

empêcher les dégradations enzymatiques,¹⁹ provoquer les réponses d'anticorps,²⁰ augmenter les biodisponibilités²¹ et faciliter les plissements peptidiques.²² Ces intérêts existent dans les synthèses peptidiques en vue d'obtenir des vaccins, des inhibiteurs d'enzymes, des antigènes d'anticorps, et des analogues optimaux des peptides biologiquement actifs.

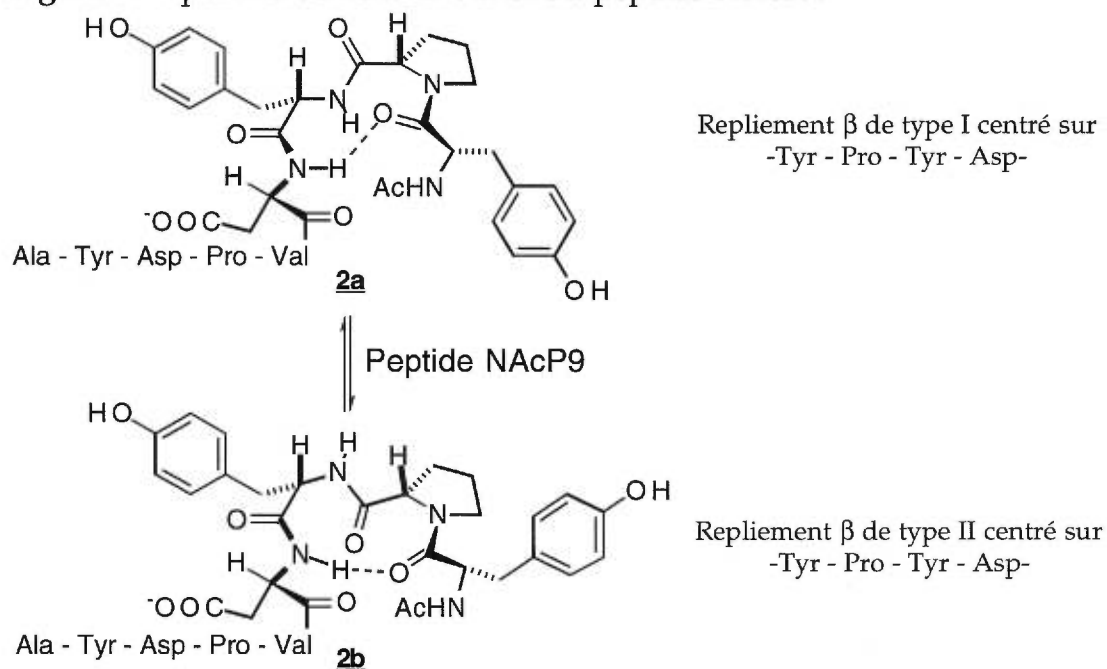
1.4.3 Exemples et Applications.

Le rôle joué par les peptidomimétiques comme outils pour la détermination de conformation bioactive ou pour la synthèse d'analogue est mis en évidence à travers les deux exemples qui suivent.

1.4.3.1 La détermination d'une conformation bioactive: l'exemple de Robinson.²³

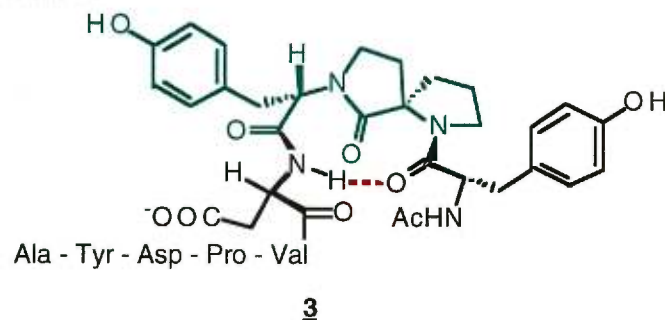
NACp9 est un peptide immunogène dont la conformation bioactive peut se présenter sous la forme d'un équilibre conformationnel entre un repliement β de type I, **2a**, ou un repliement β de type II, **2b** (figure 7). La conception d'un peptidomimétique, qui va privilégier une conformation par rapport à l'autre, a donc été réalisée par la synthèse d'un analogue **3** du peptide NACp9. Il incorpore un γ -lactame spirocyclique (en vert sur la figure 8), un peptidomimétique favorisant une conformation de repliement β de type II.^{23a}

Figure 7. Équilibre conformationnel du peptide NAcP9.



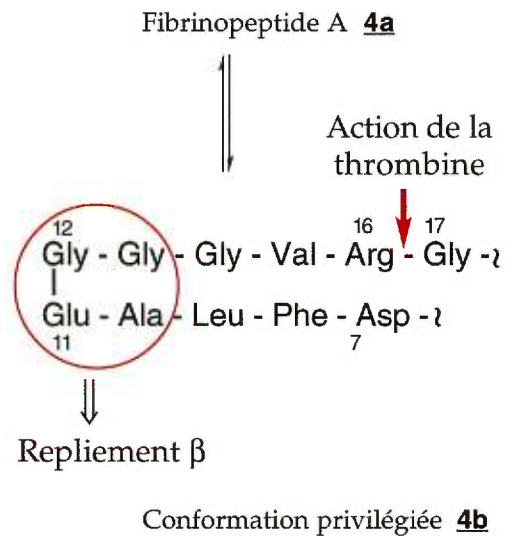
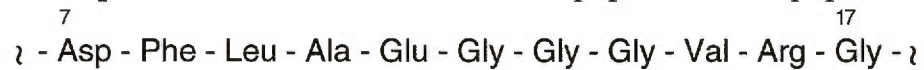
Les études de RMN de l'analogue **3**, associées à des modélisations moléculaires, ont démontré la prédominance d'un conformère, lequel possède effectivement un repliement β de type II. Cependant les études biologiques ont montré que l'analogue **3** a moins d'affinité envers les anticorps concernés que le peptide natif. Ainsi, les auteurs proposent que la conformation privilégiant le repliement β de type I soit plus important pour la reconnaissance avec les anticorps que celle de type II.

Figure 8. Peptidomimétique et incorporation dans un analogue **3** du peptide natif NAcP9.



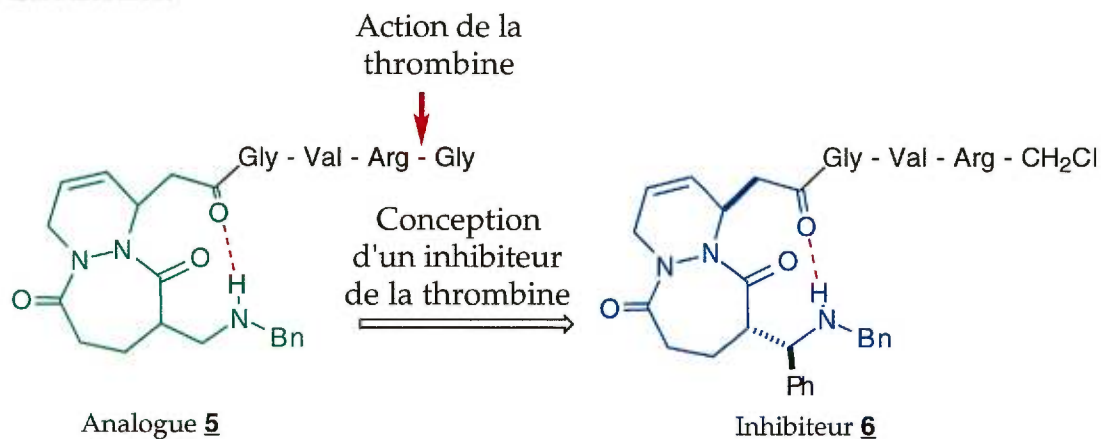
1.4.3.2 La synthèse d'un inhibiteur: l'exemple de Kahn.²⁴

La thrombine est une protéase de type sérine qui permet l'élimination des fibrinopeptides A et B du fibrinogène, en coupant la liaison amide au niveau des acides aminés arginine (Arg 16) et glycine (Gly 17) dans le cas du fibrinogène humain. Il semblerait que la conformation active, **4b**, du fibrinopeptide A nécessite un repliement β centré sur les résidus 10 à 13 (figure 9).

Figure 9. Équilibre conformationnel dans le peptide fibrinopeptide A.

Afin d'examiner le rôle que peut jouer ce repliement β , un peptidomimétique (en vert sur la figure 10) a été conçu, synthétisé et incorporé dans un analogue 5.²⁴ Par comparaison avec les peptides antécédents, ce peptide 5 a une action similaire au niveau de la coupure de la liaison amide 16-17 par la thrombine. Ce résultat positif a conduit à la conception d'un inhibiteur de la thrombine 6 incorporant un peptidomimétique (en bleu sur la figure 10).

Figure 10. Peptidomimétique et incorporation dans un inhibiteur **6** de la thrombine.



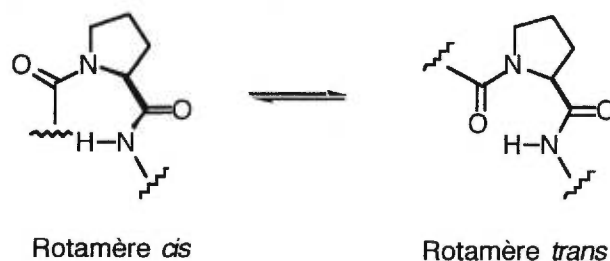
A travers ces deux exemples de peptidomimétiques et de leurs applications ainsi que d'autres décrits dans les chapitres suivants, le concept de peptidomimétique prend une place de plus en plus importante en chimie médicinale. Leurs utilisations pourraient donc être anticipées pour fournir une nouvelle génération d'inhibiteurs enzymatiques, de vaccins ou d'analogues optimaux des peptides biologiquement actifs. Il est donc important de développer une stratégie efficace pour synthétiser des peptidomimétiques. Basées autour d'un concept d'interaction et centrées sur des prolines non naturelles, mes recherches ont porté sur la synthèse d'un nouveau type de peptidomimétique de repliement β de type II'.

1.5 Peptidomimétiques et proline.

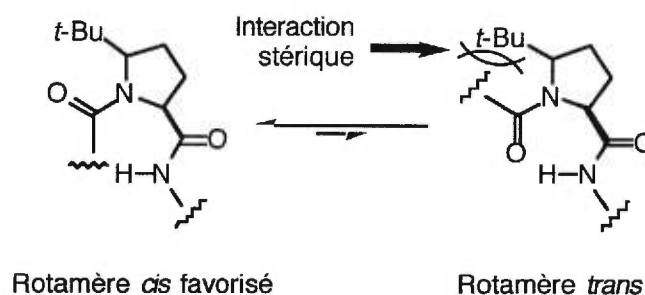
L'acide aminé proline est conformationnellement rigide, ayant sa chaîne latérale accrochée sur l'amine. Il est donc une structure très intéressante pour la conception des peptidomimétiques car il est disponible sous forme chirale et induit des géométries particulières (l'angle de torsion ϕ est fixé, tandis que l'angle ω ne peut adopter que deux valeurs, 0 ou 180°). L'examen des angles dièdres ϕ et ψ des résidus centraux de repliements peptidiques montre que la proline est particulièrement bien choisie pour les positions $i+1$ ou $i+2$ (ou les positions 2 et 3 respectivement) des repliements β et pour la position $i+1$ des repliements γ .²⁵

1.5.1 Conformation.

L'accent a été mis sur le développement de peptidomimétiques utilisant la proline comme base. Une étude générale a donc été envisagée sur la relation entre la conformation amide X-Pro et la bioactivité peptidique à travers les 5-alkylprolines, lesquels fonctionnent comme un motif qui fixe les conformations des rotamères *cis* et *trans* (figure 11). L'incorporation dans des peptides de prolines substituées sur le cycle permet de contrôler l'angle de rotation ψ de la proline, et ainsi modifier l'équilibre *cis-trans* de la liaison amide.

Figure 11. Équilibre *cis-trans* des prolines.

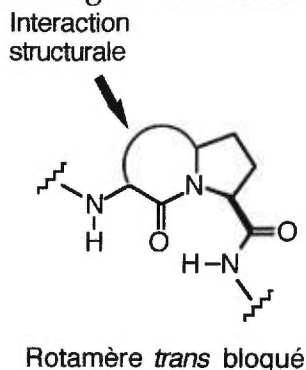
Dans le but d'augmenter les *cis*-isomères de l'amide *N*-terminale de la proline, une méthodologie a été développée au laboratoire afin d'obtenir des prolines non-naturelles possédant des substituants stériquement encombrés en position 5 (en particulier un groupe *tert*-butyle).²⁶ Ces prolines, incorporées dans des peptides, servent à contrôler l'angle de rotation ψ et à modifier l'équilibre *cis-trans* de la liaison amide *N*-terminale de prolines peptidiques (figure 12). En effet les interactions stériques entre le substituant en position 5 et le résidu *N*-terminal défavorisent le rotamère *trans* au profit du rotamère *cis*.

Figure 12. Équilibre en faveur du rotamère *cis* dans les prolines.

Par contre, une liaison amide peut être bloquée dans une conformation de *trans*-isomère grâce à une liaison covalente entre la

position 5 de la proline et l'acide aminé en position *N*-terminale de la proline, telle que dans un lactame (figure 13).

Figure 13. Conformation privilégiée du rotamère *trans* dans les prolines.

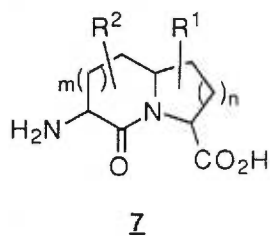


Ces composés asymétriques, ainsi incorporés dans des structures peptidiques, peuvent imposer des contraintes de mouvement sur la structure amide produisant ainsi des conformères particuliers avec des hautes barrières d'interconversion. Ces peptidomimétiques sont donc d'excellents outils pour l'étude des reconnaissances récepteur-site, la détermination des conformations biologiquement actives ou la conception d'analogues potentiels de peptides naturels.^{8,15i,15l,17a}

1.5.2 Système envisagé: Les acides aminés azabicyclo[X.Y.0]alcanes.

Les acides aminés azabicyclo[X.Y.0]alcanes sont des cibles particulièrement attrayantes dans le concept rationnel et la synthèse des peptidomimétiques, car ils possèdent les capacités de servir de substitués conformationnellement restreints des structures secondaires des peptides.

Le choix s'est porté sur la synthèse du système bicyclique de type 7.

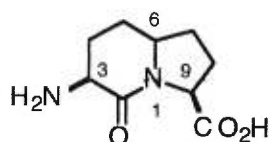


Ce système fut considéré avec attention pour les raisons suivantes:

- conformationnellement rigide, avec les restrictions de mouvement des angles dièdres ψ_{i+1} et ϕ_{i+2} ;
- capacité à explorer la relation entre la taille des cycles et la conformation;
- capacité à explorer la relation entre la géométrie des centres stéréogènes et la conformation;
- capacité à incorporer des chaînes latérales;
- possibilité d'intégration dans des peptides par synthèse en phase solide;
- défi synthétique pour produire des systèmes énantiopures.

1.5.3 Restriction au système indolizidinone.

Les systèmes génériques de type 7 présentant de vastes possibilités, le choix s'est porté sur l'acide aminé **8** comme première cible de synthèse, c'est-à-dire la restriction au système azabicyclo[4.3.0]nonane ou indolizidinone.

**8**

Ce type d'acide aminé azabicyclique a une importance structurale, car de tels systèmes comportant des hétéroatomes incorporés dans les cycles (soufre ou oxygène²⁷) ont déjà été étudiés et ont conduit à des analogues bio-actifs (voir chapitre 2). Par contre, à la différence des analogues soufrés ou oxygénés, un analogue au squelette carboné intégrant une proline substituée présente deux avantages. D'une part, il y a une augmentation de la rigidité par des interactions gauches additionnelles avec l'apport des protons méthyléniques. D'autre part, il y a une augmentation de la stabilité car les analogues comportant un soufre ou un oxygène sont plus susceptibles à la dégradation *via* un processus d'hydrolyse des aldéhydes masqués, à la fois *in vivo* que lors de la synthèse peptidique.

La modélisation moléculaire²⁸ des composés indolizidinones **9**, de configuration 6S ou 6R (figure 14), prédissent qu'ils peuvent agir dans un

peptide comme un mimétique de repliement β de type II'. En effet les valeurs des angles de torsion des résidus deux et trois (ψ_2 et ϕ_3) sont similaires à celles idéales d'un repliement β de type II' (tableau 2). Ces résultats sont à rapprocher avec ceux décrits par Nagai et Sato avec le système thiaindolizidinone BTD (Beta Turn Dipeptide, **10**, tableau 2).^{29b} Incorporé dans des peptides, ce peptidomimétique se substitue aux résidus $i + 1$ and $i + 2$ d'un repliement β pour induire une conformation de type II' (figure 15).

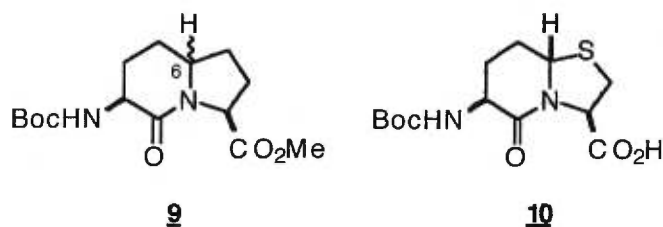


Tableau 2. Comparaison des valeurs des angles de torsion (deg.) des systèmes indolizidinones avec le repliement β de type II'.

	ψ_2	ϕ_3
Type II' idéal	-120°	-80°
Conformère minimum <u>(6S)-9</u>	-111°	-52°
Conformère minimum <u>(6R)-9</u>	-138°	-61°
BTB <u>10</u>	-161°	-69°

Figure 14. Représentation des conformations d'énergie minimale des deux diastéréoisomères (6*S*)-**9** et (6*R*)-**9**.

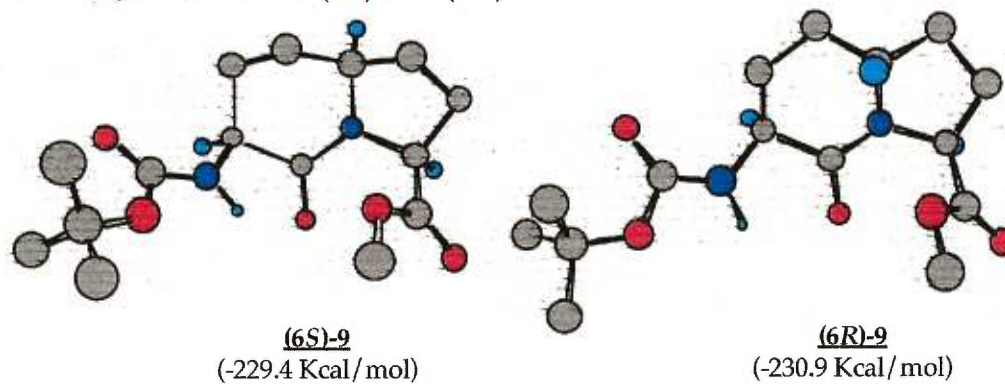
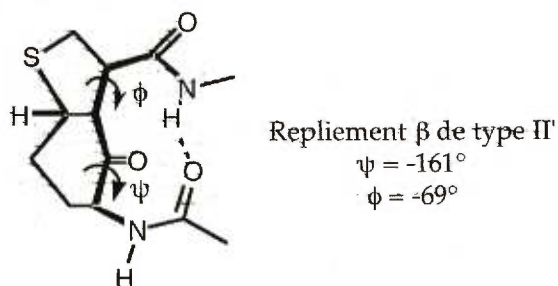
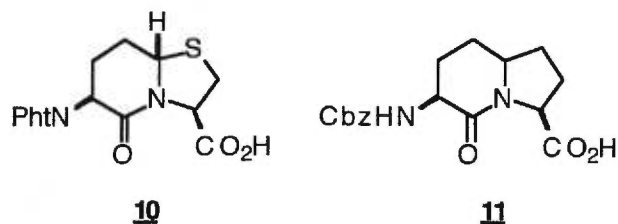


Figure 15. BTD et conformation.^{29b}



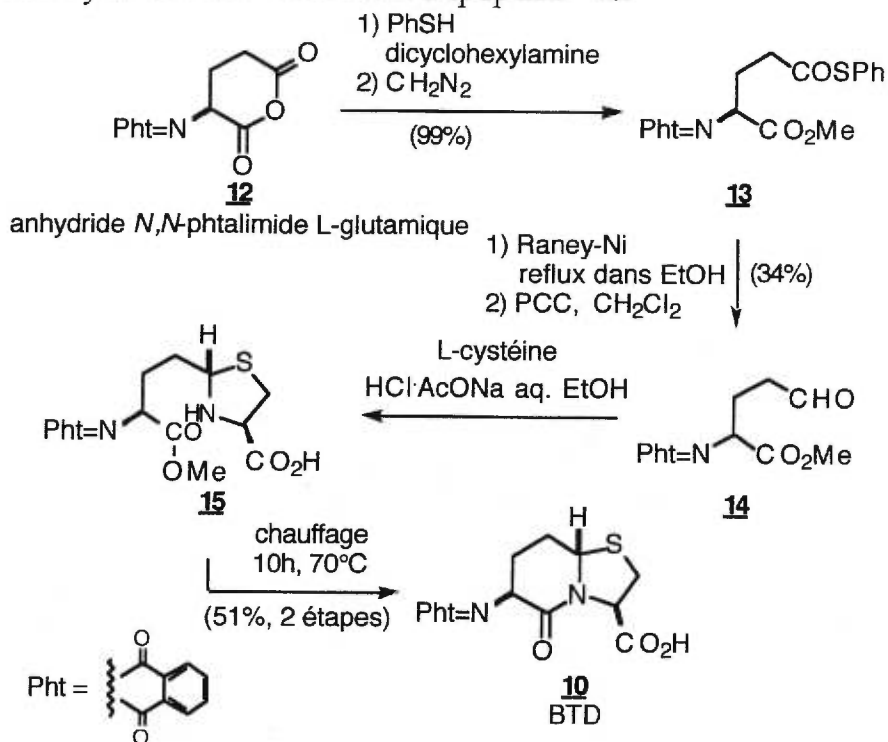
1.6 Synthèses précédentes des systèmes indolizidinones.

Les systèmes indolizidinones revêtent une grande importance pour leur capacité à induire des conformations de repliement β aussi bien que pour remplacer le dipeptide Ala-Pro. Sans décrire avec détails toutes les synthèses ou applications de ces systèmes indolizidinones (voir le chapitre 2 pour leurs synthèses et applications), deux synthèses représentatives sont présentées dans les deux paragraphes suivants: la synthèse du système thiaindolizidinone **10** et celle de l'indolizidinone **11**.



1.6.1 La synthèse de Nagai et Sato.²⁹

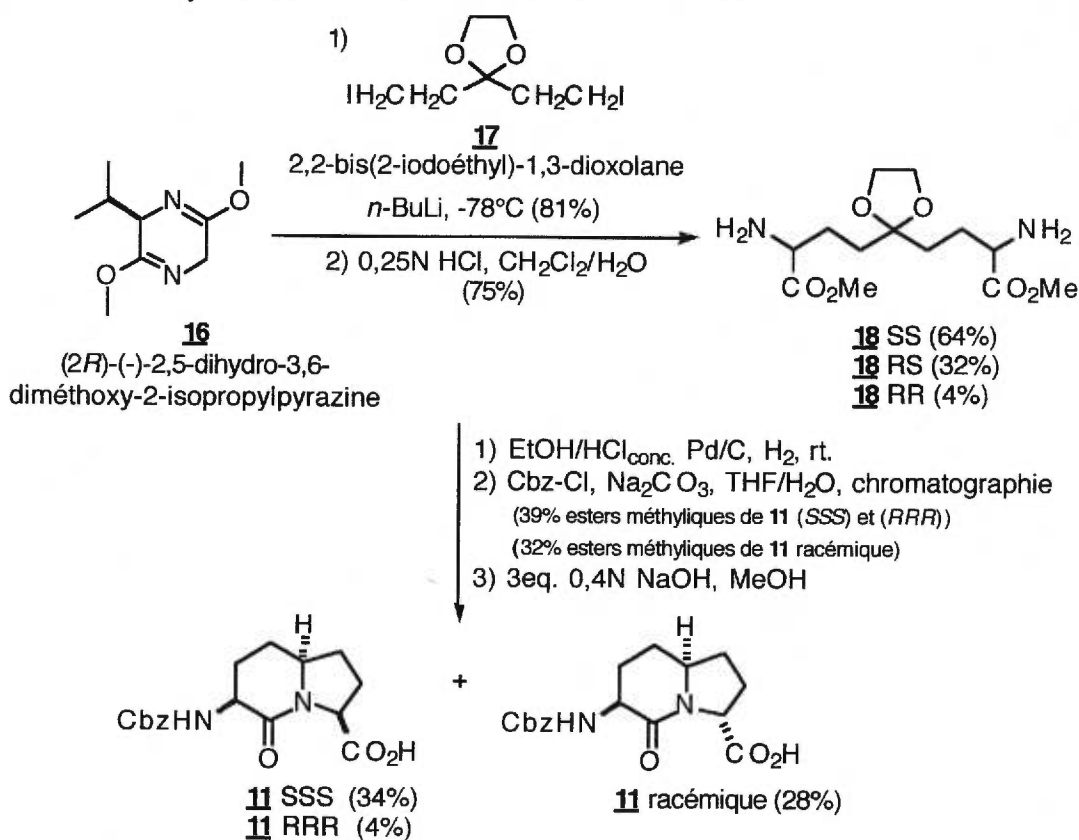
Pionniers dans le domaine des peptidomimétiques azabicycliques, Nagai et Sato ont synthétisé dès 1986 un dipeptide **10**, mimétique de repliement β de type II'. La synthèse de l'acide 2-oxo-3-phtalimido-7-thia-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylique **10** est présentée au schéma 1. Le composé **13** a été obtenu par ouverture régiosélective de l'anhydride *N,N*-phtalimide L-glutamique **12** avec le thiophénol en présence de la dicyclohexylamine comme base suivi de la conversion à l'ester méthylique avec le diazométhane.

Schéma 1. Synthèse du "Beta Turn Dipeptide" **10**.

La réduction de la fonction thioester avec le nickel de Raney puis l'oxydation avec le chlorochromate de pyridinium conduit à l'aldéhyde **14**. La réaction de **14** avec la cystéine donne la thiazolidine **15** qui, par chauffage à 70 °C pendant 10 heures, est convertie au composé thiaindolizidinone désiré **10**. Cette synthèse directe et efficace (17% de rendement de **10** depuis **12**) a été reprise et améliorée par deux autres groupes de recherche.³⁰

1.6.2 La synthèse de Mueller et Revesz.³¹

Basée sur une amination-cyclisation d'un dérivé 2,8-diamino-5-oxononane-1,9-dicarboxylate, une synthèse de la cible choisie **9** a été présentée par Mueller et Revesz. La synthèse des acides 2-oxo-3-*N*-(benzyloxycarbonyl)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxyliques est présentée sur le schéma 2. Le composé **17** est traité par le sel de lithium de **16** pour obtenir un acétal dialcoylé qui est hydrolysé à un mélange de diamino acétals **18**. L'hydrolyse de l'acétal, l'amination réductrice et la cyclisation au lactame sont accomplies à la suite pour conduire à un mélange de stéréoisomères **11**.

Schéma 2. Synthèse de l'acide aminé indolizidinone **11**.

1.6.3 Conclusion

L'utilisation avec succès du composé thiaindolizidinone **10** décrit par Nagai et Sato comme un peptidomimétique de repliement β de type II' nous a incité à entreprendre la synthèse d'un nouvel acide aminé **8**, dans lequel le soufre serait remplacé par un carbone.

Les systèmes indolizidinones comme celui considéré font partie d'une famille importante d'analogues dipeptidiques que sont les systèmes azabicycliques. Le chapitre deux se propose d'être une revue de la littérature de ce type de composés. La stratégie envisagée pour la synthèse du système indolizidinone choisi et sa réalisation sont exposées dans les chapitres trois et quatre respectivement. Le chapitre cinq détaille les résultats obtenus sur les conformations engendrées par le système indolizidinone lorsqu'il est introduit dans des peptides modèles. Les chapitres six et sept décrivent l'utilisation de l'acide aminé indolizidinone dans deux applications: la synthèse d'un analogue de la gramicidine S incorporant deux systèmes indolizidinones et les synthèses de deux peptidomimétiques, inhibiteurs potentiels de métalloprotéases.

1.7 Références

- 1 "Peptidomimetics for Receptor Ligands - Discovery, Development, and Medicinal Perspectives", Giannis, A.; Kolter, T. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1244.
- 2 "Predicting the Biologically Active Conformations of Short Polypeptides", Milner-White, E. J. *Trends. Pharmacol. Sci. (TiPS)* **1989**, *10*, 70.
- 3 (a) "IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature", *Biochemistry* **1970**, *9*, 3471; (b) "Principles of Protein Structure", Schultz, G.E.; Schirmer R. H.; Cantor, C. R. Ed., Springer, New York, 1979.
- 4 "Peptide Design Consideration", Moore, M., L. in "Synthetic Peptides: A User's Guide"; Grant, G., Freeman, W. H. and Compagny Eds., New York, 1993, p. 22.
- 5 "Stereochemical Criteria for Polypeptides and Proteins. V. Conformation of a System of Three Linked Peptide Units", Venkatachalam, C. M. *Biopolymers* **1968**, *6*, 1425.
- 6 Pour une revue détaillée sur les repliements, voir: "Turns in Peptides and Proteins", Rose, G. D.; Gierasch, L. M.; Smith, J. A. *Adv. Protein Chem.* **1985**, *37*, 1.
- 7 Pour d'autres revues sur les repliements, voir: (a) " β VI Turns in Peptides and Proteins: a Model Peptide Mimicry", Müller, G.; Gurrath, M.; Kurz, M.; Kessler, H. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **1993**, *15*, 235; (b) "Analysis and Prediction of the Different Types of β -Turn in Proteins", Wilmot, C. M.; Thornton, J. M. *J. Mol. Biol.* **1988**,

- 203, 221; (c) "Protein Anatomy- β Structure", Richardson, J. S. *Adv. Protein Chem.* **1981**, 34, 190; (d) "Reverse Turns in Peptides and Proteins", Smith, J. A.; Pease, L. G. *CRC Critical Reviews in Biochemistry* **1980**, 315; (e) " β -Turns in Proteins", Chou, P. Y.; Fasman, G. D. *J. Mol. Biol.* **1977**, 115, 135; (f) "The Reverse Turn as a Polypeptide Conformation in Globular Proteins", Crawford, J. L.; Lipscomb, W. N.; Schellman, C. G. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1973**, 70, 538; (g) "Chain Reversals in Proteins", Lewis, P. N.; Momany, F. A.; Scheraga, H. A. *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, 303, 211; (h) "Prediction of Protein Conformation", Chou, P. Y.; Fasman, G. D. *Biochemistry* **1974**, 13, 222.
- 8 (a) "Conformational Constraints: Non Peptide β -Turn Mimics", Ball, J. B.; Alewood, P. F. *J. Mol. Recognit.* **1990**, 3, 55; (b) "A One-Variable Topographical Descriptor for the β -Turns of Peptides and Proteins", Ball, J. B.; Andrews, P. F.; Alewood, P. F.; Hughes, R. A. *FEBS Lett.* **1990**, 273, 15.
- 9 (a) "One Type of γ -Turn, Rather than the Other Gives Rise to Chain-Reversal in Proteins", Milner-White, E. J.; Ross, B. M.; Ismail, R.; Belhadj-Mostefa, K.; Poet, R. *J. Mol. Biol.* **1988**, 204, 777; (b) "The Use of γ -Turn Mimetics to Define Peptide Secondary Structure", Callahan, J. F.; Newlander, K. A.; Burgess, J. L.; Eggleston, D. S.; Nichols, A.; Wong, A.; Huffman, W. F. *Tetrahedron* **1993**, 49, 3479; (c) " β -Alanine Containing Peptides: a Novel Molecular Tool for the Design of γ -Turns", Pavone, V.; Lombardi, A.; D'Auria, G.; Saviano, M.; Nastri, F.; Paolillo, L.; Di Blasio, B.; Pedone, C. *Biopolymers* **1992**, 32, 173.
- 10 Pour des exemples de repliements β de type II' dans des peptides naturels, voir: (a) "Pyrrolidine Ring Puckering in *Cis* and *Trans*-Proline

Residues in Proteins and Polypeptides", Milner-White, E. J.; Bell, L. H.; Maccallum, P. H. *J. Mol. Biol.* **1992**, *228*, 725; (b) "A Conformation-Preference Potency Correlation for GnRH Analogs - NMR Evidence", Andersen, N. H.; Hammen, P. K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1991**, *1*, 263; (c) "Conformation-Function Relationships in LHRH Analogs. I. Conformations of LHRH Peptide Backbone", Nikiforovich, G. V.; Marshall, G. A. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1993**, *41*, 171; (d) "Conformation-Function Relationships in LHRH Analogs. II. Conformations of LHRH Peptide Agonists and Antagonists", Nikiforovich, G. V.; Marshall, G. A. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1993**, *41*, 181; (e) "Solid Phase Synthesis of Human Growth Hormone-Releasing Factor Analogs Containing a Bicyclic β -Turn Dipeptide", Sato, K.; Hotta, M.; Dong, M. H.; Hu, H. Y.; Taulene, J.; Goodman, M.; Nagai, U. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, *38*, 340; (f) "NMR and Computational Evidence that High-Affinity Bradykinin Receptor Antagonists Adopt C-Terminal β -Turn", Kyle, D. J.; Blake, P. R.; Smithwick, D.; Green, L. M.; Martin, J. A.; Sinsko, J. A.; Summers, M. F. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1450; (g) "Synthesis, Conformation, and Immunosuppressive Activity of a Conformationally Restricted Cyclosporine Analogue", Aebi, J. D.; Guillaume, D.; Dunlap, B. E.; Rich, D. H. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1805; (h) "Structural Studies of a Family of High Affinity Ligands for GPIIb/IIIa", Bach, II, A. C.; Eyermann, C. J.; Gross, J. D.; Bower, M. J.; Harlow, R. L.; Weber, P. C.; DeGrado, W. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3207; (i) "Conformational-Analysis of a Highly Potent, Constrained Gonadotropin-Releasing-Hormone Antagonist. 1. Nuclear Magnetic-Resonance", Rizo, J.; Koerber, S. C.; Bienstock, R. J.; Rivier, J.; Hagler, A.

- T.; Gierasch, L. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 2852; pour d'autres exemples, voir les références 1, 7e et 7g.
- 11 (a) "Structural Evidence for Induced Fit as a Mechanism for Antibody-Antigen Recognition", Rini, J. M.; Schulze-Gahmen, U.; Wilson, I. A. *Science* **1992**, *255*, 959; (b) "Prediction of Optimal Peptide Mixtures to Induce Broadly Neutralizing Antibodies to Human Immunodeficiency Virus Type 1", Holley, L. H.; Goudmit, J.; Karplus, M. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 6800; (c) "A 500 MHz Study of Peptide T in a DMSO Solution", Picone, D.; Temussi, P. A.; Marastoni, M.; Tomatis, R.; Motta, A. *FEBS Lett.* **1988**, *231*, 159.
- 12 (a) "Occurrence of Phosphorylated Residues in Predicted β -Turns: Implications for β -Turn Participation in Control Mechanisms", Small, D.; Chou, P. Y.; Fasman, G. D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1977**, *79*, 341; (b) "Synthetic β -Turn Peptides as Substrates for a Tyrosine Protein Kinase", Tinker, D. A.; Krebs, E. A.; Feltham, I. C.; Attah-Poku, S. K.; Ananthanarayanan, V. S. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 5024.
- 13 (a) "Role of Peptide Conformation in Asparagine-Linked Glycosylation", Imperiali, B.; Shannon, K. L.; Rickert, K. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7942; (b) "A Mechanistic Proposal for Asparagine-Linked Glycosylation", Imperiali, B.; Shannon, K. L.; Rickert, K. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7944; (c) "Carbohydrate-Peptide Linkage in Glycoproteins", Aubert, J. P.; Biserte, G.; Loucheux-Lefebvre, M. H. *Arch. Biochem. Biophys.* **1976**, *175*, 410.
- 14 "Conformations of Proline Residues in Membrane Environments", Deber, C. M.; Glibowika, M.; Wooley, G. A. *Biopolymers* **1990**, *29*, 149.

- 15 Pour des revues sur les peptidomimétiques, voir: (a) "Peptidomimetics - Tailored enzyme inhibitors", Gant, J. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 1699; (b) "Case Histories of Peptidomimetics: Progression from Peptides to Drugs", Adang, A. E. P.; Hermkens, P. H. H.; Linders, J. T. M.; Ottenheijm, H. C. J.; Van Staveren, C. J. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1994**, 113, 63; (c) "Concepts and Progress in the Development of Peptide Mimetics", Olson, G. L.; Bolin, D. R.; Bonner, M. P.; Bös, M.; Cook, C. M.; Fry, D. C.; Graves, B. J.; Hatada, M.; Hill, D. E.; Kahn, M.; Madison, V. S.; Rusieck, V. K.; Sarabu, R.; Sepinwall, J.; Vincent, G. P.; Voss, M. E. *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 3039; (e) "Conformationally Restricted Amino Acids and Dipeptides (non)Peptidomimetics and Secondary Structure Mimetics", Liskamp, R. M. T. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1994**, 113, 1; (d) "Peptide Secondary Structure Mimetics", *Tetrahedron*, Symposia-in-print number 50, Kahn, M. Editor, **1993**, 49, 3433-3689; (f) Référence 1; (g) "Peptide Secondary Structure Mimetics: Recent Advances and Future Challenges", Kahn, M. *Synlett* **1993**, 821; (h) "Constrained Peptides: Models of Bioactive Peptides and Protein Substructures", Rizo, J.; Gierasch, L. M. *Ann. Rev. Biochem.* **1992**, 61, 387; (i) "Peptide Conformation Mimetics. Part 1", Höelzemann, G. *Kontakte (Darmstadt)* **1991**, 1, 3; (j) "Peptide Conformation Mimetics. Part 2", Höelzemann, G. *Kontakte (Darmstadt)* **1991**, 2, 55; (k) Référence 8a; (l) "Conformationally Restricted Peptides through Short-Range Cyclizations", Toniolo, C. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1990**, 35, 287; (m) Approach to the Discovery of non-Peptide Ligands for Peptide Receptors and Peptidases", Morgan, B. A.; Gainor, J. A. *Ann. Rep. Med. Chem.* **1989**, 24, 243.

- 16 "Bioactive Conformation of LHRH: Evidence from a Conformationally Constrained Analog", Freidinger, R. M.; Veber, D. F.; Perlow, D. S.; Brooks, J.R.; Saperstein, R. *Science* **1980**, *210*, 656.
- 17 "The Design and Synthesis of Mimetics of Peptide β -Turns", Kahn, M.; Wilke, S.; Chen, B.; Fujita, K.; Lee, Y.-H.; Johnson, M. E. *J. Mol. Recognit.* **1988**, *1*, 75.
- 18 Veber, D. F. in "New Methods in Drug Design"; Makriyannis, A. Ed.; J. R. Proust Pub.: 1985; pp 225-232.
- 19 (a) "The Design of Metabolically-stable Peptide analogs", Veber, D. F.; Freidinger, R. M. *Trends Neurosci.* **1985**, *8*, 392; (b) Hruby, V. J.; Cody, W. L.; Wilkes, B. C.; Hadley, M. E. *Peptides* **1994**, 505.
- 20 "Design and Synthesis of a Mimetic from an Antibody Complementary-Determining Region", Saragovi, H. U.; Fitzpatrick, D.; Raktabutr, A.; Nakanishi, H.; Kahn, M.; Green, M. I. *Science* **1991**, 253, 792.
- 21 "Biological Approaches to the Controlled Delivery of Drugs", Stenerson, L. A. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1987**, *507*, 19.
- 22 (a) "A Chemical Approach to Protein Design - Template-Assembled Synthetic Proteins (TASP)", Mutter, M.; Vuilleumier, S. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 535; (b) "Studies of N-Terminal Templates for α -Helix Formation. Synthesis and Conformation Analysis of (2S, 5S, 8S, 11S)-1-Acetyl-1,4-Diaza-3-Keto-5-Carboxy-10-Thia-Tricyclo-[2.8.0^{4,8}]-Tridecane (Ac-Hel₁-OH)", Kemp, D. S.; Curran, T. P.; Davis, W. M.; Boyd, J. G.; Muendel, C. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 6672.
- 23 (a) "Design and Synthesis of a Novel Peptide β -Turn Mimetic", Hinds, M. G.; Richards, N. J.; Robinson, J. A. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*

- 1988, 1447; (b) "Synthesis, Conformational Properties, and Antibody Recognition of Peptides Containing β -Turn Mimetics Based on α -Alkylproline Derivatives", Hinds, M. G.; Welsh, J. H.; Brennand, D. M.; Fisher, J.; Glennie, M. J.; Richards, N. J.; Turner, D. L.; Robinson, J. A. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1777; (c) Design and Synthesis of a Novel Peptide β -Turn Mimetic", Cane, D. E.; Prabhakaran, P. C. *Chemtracts-Organic Chemistry* **1989**, *2*, 131.
- 24 "Peptide Mimetics of the Thrombin-Bound Structure of Fibrinopeptide-A", Nakanishi, H.; Chrusciel, R. A.; Shen, S.; Bertenshaw, S.; Johnson, M. E.; Rydel, T. J.; Tulinsky, A.; Kahn, M. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 1705.
- 25 (a) "Influence of Proline Residues on Protein Conformation", McArthur, M. W.; Thornton, J. M. *J. Mol. Biol.* **1991**, *218*, 397; (b) "Prediction of Prolyl Residues in *Cis*-Conformation in Protein Structures on the Basis of the Amino Acid Sequence", Frömmel, C.; Preissner, R. *FEBS Lett.* **1990**, *277*, 159; (c) "Occurrence and Role of *cis* Peptide Bonds in Protein Structures", Stewart, D. E.; Sarkar, A.; Wampler, J. E. *J. Mol. Biol.* **1990**, *214*, 253; (d) Référence 10a.
- 26 (a) "Synthesis of Enantiopure δ -Oxo α -Amino Esters and Prolines via Acylation of *N*-(Phenylfluorenyl)glutamate Enolates", Ibrahim, H. H.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 6438; (b) "Synthesis & Application of 5-Alkylprolines Towards the Design of X-Proline *Cis*-Amide Surrogates", Ibrahim, H. H.; Beausoleil, E.; Atfani, M.; Lubell, W. D. In *Peptides: Chemistry, Structure and Biology*, Hodges, R. S. and Smith, J.A. Eds; ESCOM Science Publishers B. V.: Leiden, The Netherlands, 1994, 307; (c) "5-*tert*-Butylproline", Beausoleil, E.; L'Archevêque, B.;

- Bélec, L.; Atfani, M.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9447; (d) "Steric Effects on the Amide Rotamer Equilibrium of Prolyl Peptides: Synthesis and Conformational Analysis of *N*-Acetyl-5-*tert*-Butylproline *N'*-Methylamides", Beausoleil, E.; Lubell, W. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12902.
- 27 Pour une liste exhaustive des analogues indolizidinones comportant des hétéroatomes, voir les références du chapitre deux.
- 28 Les modélisations moléculaires ont été effectuées avec le programme MacroModel, version 4.5x en utilisant le champs de force Amber avec le chloroforme comme solvant.
- 29 (a) "Synthesis of a Bicyclic Dipeptide with the Shape of a β -Turn Central Part", Nagai, U.; Sato, K. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 647; (b) "Bicyclic Turned Dipeptide (BTD) as a β -Turn Mimetic; Its Design, Synthesis and Incorporation into Bioactive Peptides", Nagai, U.; Sato, K.; Nakamura, R.; Kato, R. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3577.
- 30 (a) "Synthesis and NMR Conformational Analysis of a β -Turn Mimic Incorporated into Gramicidin S", Bach, II, A. C.; Markwalder, J. A.; Ripka, W. C. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, *38*, 314; (b) "Cyclic Hexapeptides and Chimeric Peptides as Mimics of Tendamistat", Etzkorn, F. A.; Guo, T.; Lipton, M. A.; Goldberg, S. D.; Bartlett, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10412.
- 31 "Synthesis of 6,5-Fused Bicyclic Lactams as Potential Dipeptide β -Turn Mimetics", Mueller, R.; Revesz, L. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 4091.

CHAPITRE 2***Design and Synthesis of Conformationally Constrained Amino Acids as Versatile Scaffolds and Peptide Mimetics***

**Stephen Hanessian,* Grant McNaughton-Smith, Henry-Georges Lombart
and William D. Lubell***

Tetrahedron, report number 426, **1997**, 53, 12789-12854

Contents**2.1 Introduction****2.2 Azabicycloalkane Amino Acids**

1. 5,6-Fused 1-Aza-2-oxobicycloalkane Amino Acids
(Indolizidinone type)
2. Substituted 5,6-Fused 1-Aza-2-oxobicycloalkane Amino Acids
3. 5,7- and 5,8-Fused 1-Aza-2-oxobicycloalkane Amino Acids
4. 6,7-Fused 1-Aza-2-oxobicycloalkane Amino Acids
5. 5,7- and 6,7-Fused 1-Aza-2-oxobicycloalkane Amino Acids with
Appended Aromatic Units
6. 5,6- and 6,7-Fused 1-Aza-2-oxobicycloalkane Amino Acids with
Appended Heteroaromatic Units.

7. 5,5-Fused 1-Aza-2-oxobicycloalkane Amino Acids
(Pyrrolizidinone type)
8. 5,5-Fused 1-Aza-2-oxobicycloalkene Amino Acids
9. 4,5-Fused 1-Aza-2-oxobicycloalkane and 1-Aza-2-oxobicycloalkene Amino Acids

2.3 Thiazabicycloalkane Amino Acids

1. 5,5-, 5,6-, 5,7- and 6,7-Fused 1-Azaoxobicycloalkane Amino Acids Encompassing Sulfur
2. Substituted 5,5- and 5,6-Fused 1-Azaoxobicycloalkane Amino Acids Encompassing Sulfur
3. Epimerization of Thiazabicycloalkane Amino Acids

2.4 Oxazabicycloalkane Amino Acids

1. 5,5-Fused 1-Aza-8-oxobicycloalkane Amino Acids Encompassing Oxygen
2. 5,6-Fused 1-Aza-2-oxobicycloalkane Amino Acids Encompassing Oxygen
3. Substituted 5,6-Fused 1-Aza-2-oxobicycloalkane Amino Acids Encompassing Oxygen
4. 5,7-Fused 1-Aza-2-oxobicycloalkane Amino Acids Encompassing Oxygen
5. 6,7-Fused 1-Aza-2-oxobicycloalkane Amino Acids Encompassing Oxygen with Appended Aromatic Units.

2.5 Diazabicycloalkane Amino Acids

1. Substituted 5,5- and 5,6-fused 1,5-Diazaoxobicycloalkene Amino Acids (Fused Pyrazolidinones and Pyridazinones)

2. Substituted 5,6-Fused 1,6-Diaza-9-oxobicycloalkene Amino Acids (5,6-Fused Pyrazolidinones)
3. 6,6-, 6,7- and 6,8-Fused 1,6-Diazaoxobicycloalkane Amino Acids (6,6-, 6,7- and 6,8-Pyridazino Based Structures)

2.6 Miscellaneous Examples

2.7 Perspectives

2.8 Abbreviations

2.9 Tabular Summary of Azabicycloalkane Amino Acids and Derivatives

2.10 Acknowledgments

2.11 References & Notes

2.1. INTRODUCTION

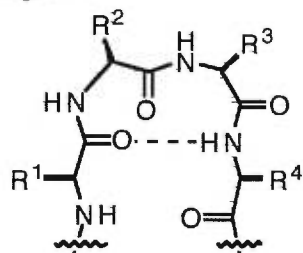
The field of amino acids has gained enormous popularity and relevance in recent years, particularly with the emergence of unnatural analogs as components of molecules with therapeutic potential.¹ The need to replace natural amino acids in peptides with non-proteinogenic counterparts in order to obtain drug-like target molecules has stimulated a great deal of innovation on several fronts.² Different areas of expertise have come together to allow a better understanding of interactions of small molecules with biological targets such as enzymes or receptors.³ These efforts have led to the design of molecules as potentially useful medicinal agents often based on intriguing biological rationales and hypotheses. A scenario in which a clinically important enzyme is co-crystallized with its natural substrate, thus providing crucial and "visual"

information for realistic drug design through synthesis of unnatural analogs, is in fact, a practice of common occurrence today.⁴ The medicinal chemist is well versed in understanding biological phenomena, and admirably served by physical tools such as X-ray crystallography, molecular modeling, NMR, and SAR data.⁵ Armed with such valuable information, in addition to other tools such as computer aided methods, and the ever-expanding arsenal of synthesis methods, it is now possible to design specific molecules for a variety of therapeutic purposes.

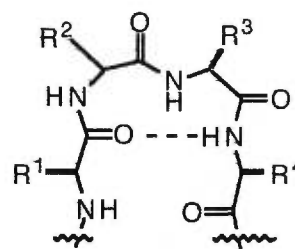
One of the more exciting areas of research in drug design has been the synthesis of so-called peptidomimetic molecules^{2,3} that are expected to have the same therapeutic effects as natural peptide counterparts, with the added advantage of metabolic stability. Of particular interest has been the replacement of a dipeptide motif in a given natural substrate with a constrained or rigidified counterpart that simulates a so-called β -turn.^{2,3,6} According to a well-accepted classification,⁶ these motifs can exist as type I and type II β -turns where the peptide backbone adopts a U-shaped conformation (Figure 1). These motifs are characterized by specific angular and torsional parameters in addition to an important 10-membered intramolecular H-bond that orient two peptide units from each end.⁷ It is therefore clear that the synthesis of constrained dipeptide motifs would nicely mimic the natural β -turn in a given target molecule, particularly if it incorporated a carboxyl and amino group in geometrically suitable positions for peptide coupling. Expression 1 in Figure 1 is a composite representation of such a constrained dipeptide mimetic which we shall categorize under the general name of a 1-azaoxobicycloalkane

skeleton. The attachment of one or more rings to the basic structure is also possible.

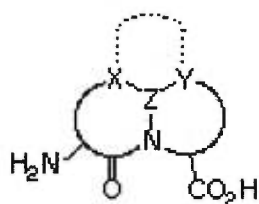
Figure 1



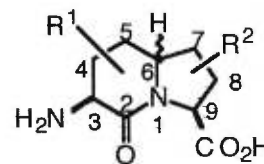
Type I- β -turn



Type II- β -turn



1



2

By its very nature, such a motif could also encompass heteroatom analogs, in which carbon is replaced by sulfur, oxygen or nitrogen, at different synthetically attainable sites. The presence of functional groups as pendant substituents on the basic ring system or its heteroatom congeners would also provide opportunities for diversification. The nature of such substituents can be modulated so as to engage them into hydrophobic, hydrophilic and related interactions with biological targets. Thus, the synthesis of dipeptide motifs such as 1 (Figure 1) with specific substituents on either ring and with amide appendages at each end, could be the ultimate objective as a drug-like molecule. Synthesis strategies for such motifs must therefore be versatile to allow the inclusion of

substituents. This will entail stereochemical problems that will only heighten the challenge of synthesis even further.

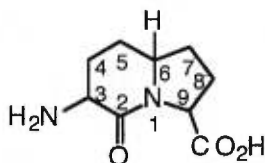
An added bonus to the availability of such strategies is that the originally intended constrained motif can also be considered as a scaffold for chemical and functional diversity. In essence, the deployment of other functional groups that can be manipulated at will, and independently of each other, can enhance the utility of the original motif by making it a spatially defined chemical platform. The application of combinatorial methods of diversification could lead to libraries of compounds based on a constrained dipeptide scaffold of the type shown in expression 2, and related heteroatom analogs or ring-size variants (Figure 1). The judicious choice of orthogonally manipulatable functional groups will provide useful scaffolds for combinatorial chemistry.⁸

The objective of this Report is to provide an up-to-date overview of molecules related to 1-azaoxobicycloalkane amino acids and analogs that incorporate a complete dipeptide unit only. The examples are thus confined to those motifs that harbor at least a six-atom subunit with one carboxyl "end", a central amide group, and an amino "end" as part of the dipeptide unit. Because of angular and torsional parameters discussed above in connection with the β -turn types, we have chosen the indolizidinone skeleton (Figure 1) as a prototype. Other ring size modifications, including heteroatom variants are presented in the same order, i.e. 5,6-fused, 5,7-fused, etc. Since this review is intended mostly for organic, medicinal, and biologically orientated chemists who are engaged

in the act of synthesis, we chose to adopt a more visual and graphical representation format. The 1-aza-oxobicycloalkane amino acids are grouped under different structural types, and the general synthesis methods for each type are briefly outlined. The tabular form of representation also includes pertinent information that the reader may find useful before going to the primary literature for molecules of special interest. Because of the expansive nature of the subject matter, coverage is not exhaustive. Nevertheless, it is hoped that the information given provides a general overview and an appreciation of the topic.

2.2. AZABICYCLOALKANE AMINO ACIDS

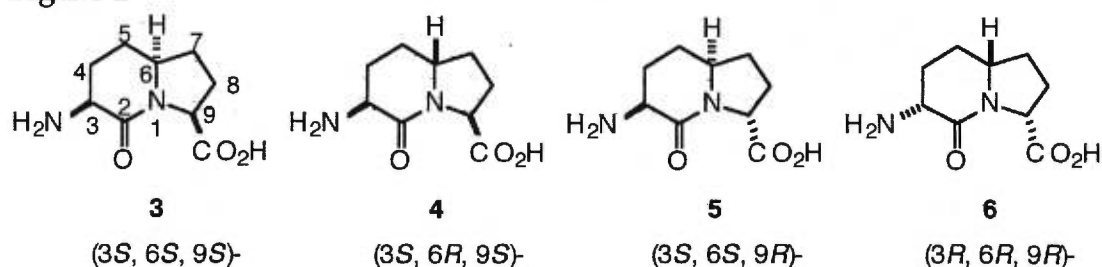
1. 5,6-Fused 1-Aza-2-oxobicycloalkane Amino Acids (Indolizidinone-type)



This section will focus on the synthesis and structural features of bicyclic lactams that encompass an Ala-Pro type dipeptide unit with an all-carbon backbone (indolizidinone). In order to simulate the proline-like motif, and to maintain the overall features of a dipeptide unit, we shall consider first the 1-aza-2-oxobicyclo[4.3.0]nonane skeleton.

Although such a 5,6-fused structure seems to be intuitively an obvious target as a constrained Ala-Pro type dipeptide, it was not the first to be synthesized in this series, as it was preceded by the corresponding 7-thia analog (see section III.1). There is a practical reason for this, since the 7-thia derivative can be synthesized from L-cysteine, thus securing one stereogenic center from the natural amino acid template at the outset. The structures and absolute stereochemistry of four representative indolizidinone amino acids are shown in Figure 2.

Figure 2

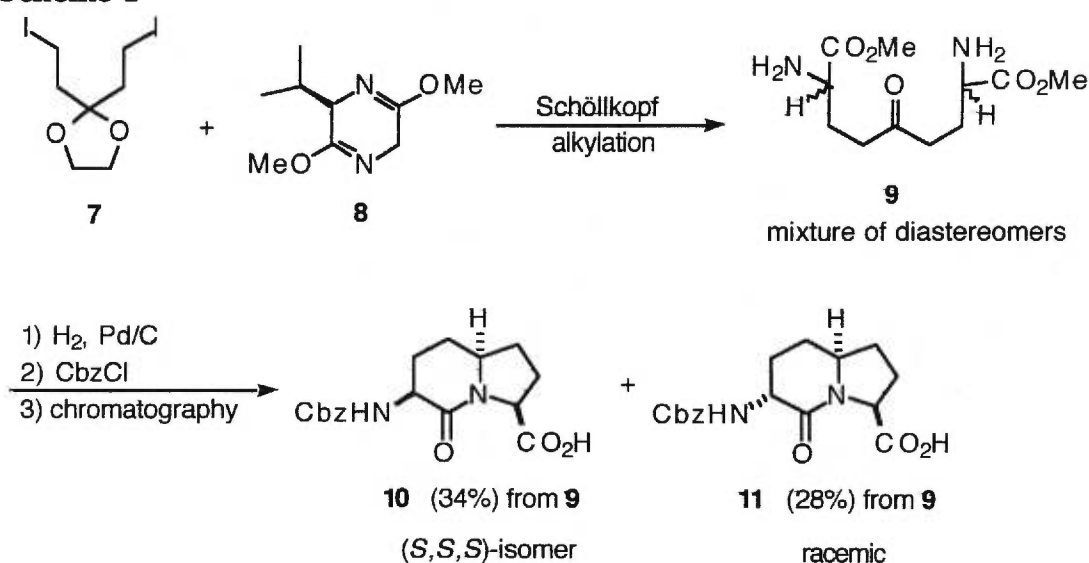


An obvious advantage of such a system compared to the 7-thia or 5-oxa analogs is their greater stability under acidic conditions. It is clear that a number of strategies can be adopted to access this general structure, and to secure the desired absolute stereochemistry. In general, these strategies have consisted in intramolecular cyclizations of cyclic iminium ions and related derivatives. The incorporation of substituents on the backbone would obviously add to the challenge of stereocontrol.

Although the obvious choice of starting material for the 5,6-fused indolizidinone amino acids is a proline or pyroglutamic acid type template, the first syntheses relied in fact on the intramolecular

cyclization of acyclic precursors. A diastereoselective synthesis of a bis-diamino acid derivative as an acyclic precursor to the target 5,6-fused indolizidinone is shown in Scheme 1.⁹ After a Schöllkopf alkylation and hydrolysis,

Scheme 1

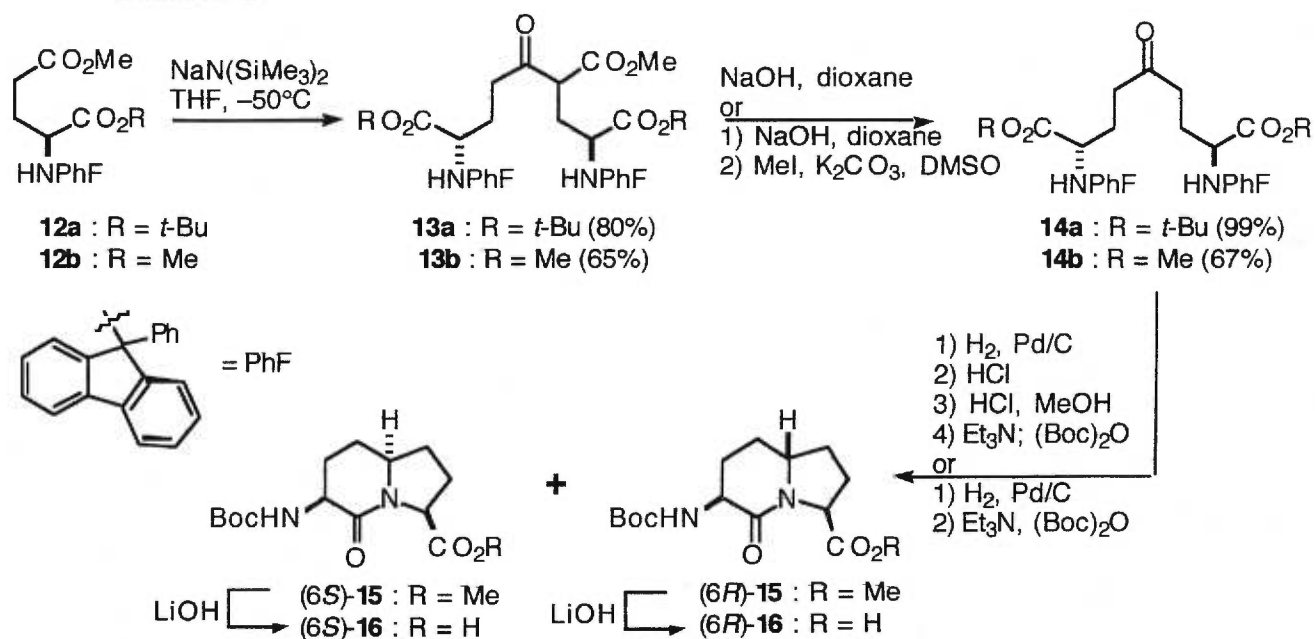


the mixture of diastereomeric 5-keto-diamino azelate diesters **9** was subjected to reductive amination. The indolizidinone amino acids could be easily separated as their Cbz derivatives to provide the (3*S*,6*S*,9*S*)-isomer in 34% yield. According to the authors,⁹ the method has allowed them to produce multigram quantities of enantiomerically pure indolizidinone **10**, in spite of the stereochemical limitations of the process.

An expedient entry into the indolizidinone amino acid structure utilizes L-glutamic acid as a chiral educt (Scheme 2, PhF = 9-(9-Phenylfluorenyl)).¹⁰ L-N-(PhF)Glutamate diesters **12a** and **12b** were

subjected to Claisen condensations to give respectively β -keto esters **13a** and **13b**, which upon hydrolysis and decarboxylation, yielded the C2 symmetrical and enantiomerically pure 5-keto-diamino azelates **14a** and **14b**. Indolizidinone amino acid **16** was synthesized from diamino azelate **14** via two different routes: one featuring reductive amination of symmetric amino ketone **14** (Scheme 2), the other involving hydride reduction of **14** followed by activation and intramolecular displacement of the resulting symmetric amino alcohol (Scheme 3). In the reductive amination sequence, simply increasing hydrogen pressure was found to augment the diastereoselectivity in the reductive amination step with (2*S*, 8*S*)-**14** such that the ratio of (6*S*)-**15** to (6*R*)-**15** could be varied from 1:2 up to 49:1 (Table 1). The Claisen condensation/reductive amination/lactam cyclization sequence provided enantiopure (3*S*, 6*S*, 9*S*)-indolizidinone amino acid **16** in 61% (7 steps), and 41% (6 steps) respective overall yields from **12a** and **12b**. Epimerization of the C-9 stereocenter of (3*S*, 6*S*, 9*S*)-*N*-(Boc)amino indolizidinone methyl ester **15** with $\text{NaN}(\text{SiMe}_3)_2$ followed by hydrolysis gave (3*S*, 6*S*, 9*R*)-indolizidinone amino acid (3*S*, 6*S*, 9*R*)-**16**. The synthesis of all stereoisomers of enantiopure indolizidinone amino acid **16** is possible by employing both L- and D-glutamate in this approach. In addition, the alkylation of ketone **14** now provides alkyl-branched diaminoazelate intermediates and thus opens the route for the synthesis of 5- and 7-alkyl substituted indolizidinone amino acids.^{10e}

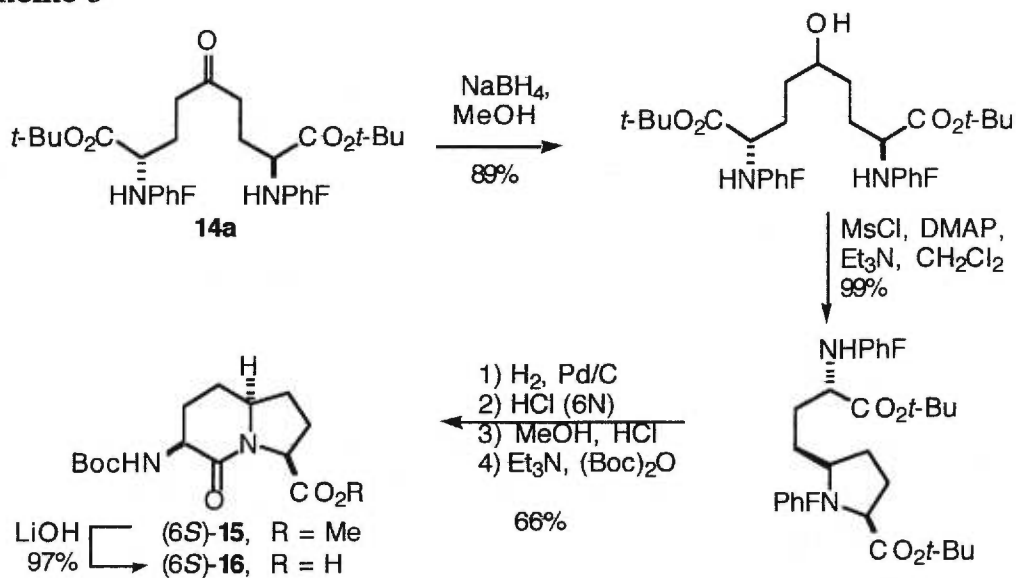
Scheme 2

Table 1. Influence of H₂ Pressure on Reductive Amination of **14**.^a

14	R	H ₂ (atm)	% (6 <i>S</i>)- 15	% (6 <i>R</i>)- 15	dr
a	<i>t</i> -Bu	1	45	22	67:33
a	<i>t</i> -Bu	11	66	3	96:4
b	Me	1	27	62	33:67
b	Me	6	81	2	98:2

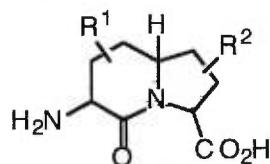
^aisolated yields

Scheme 3



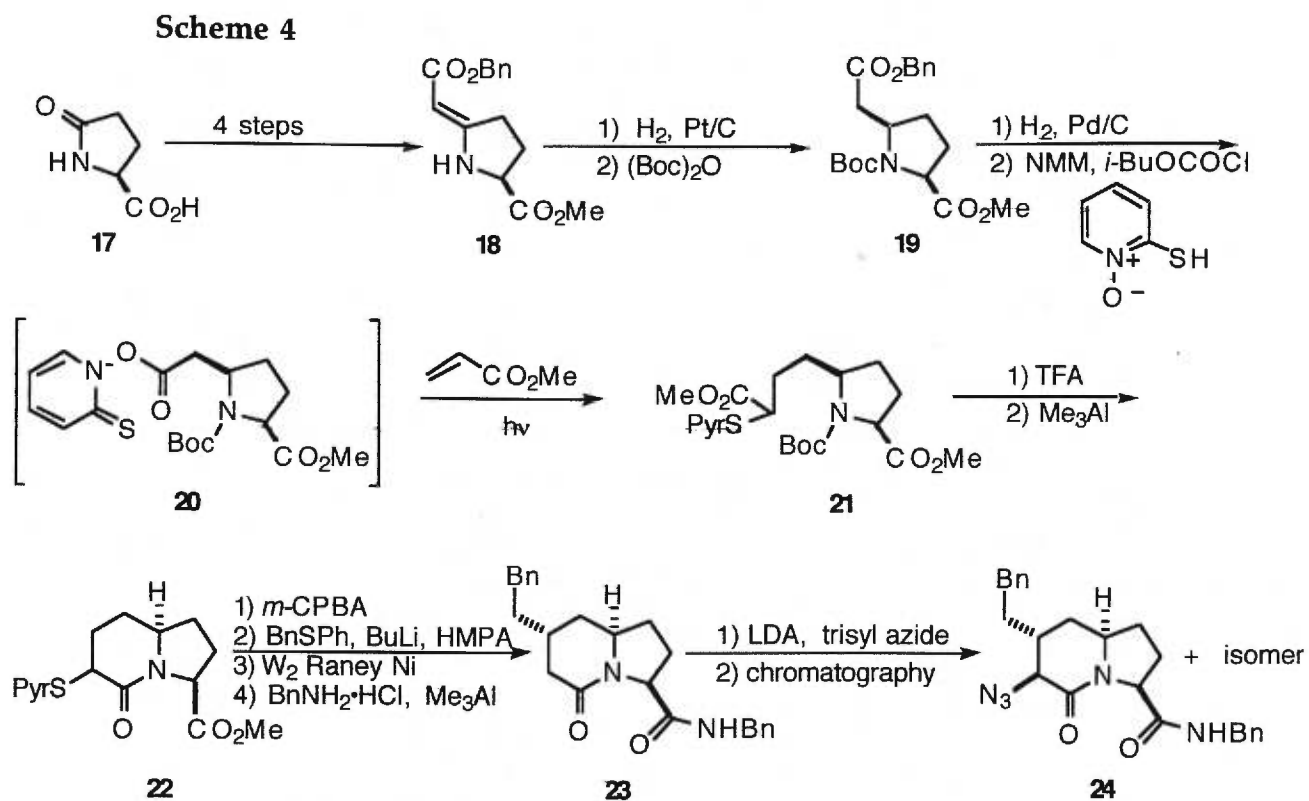
The analog [IAA^{4-5,4'-5'}]-GS, in which indolizidinone amino acid (6S)-16 replaced the D-Phe-Pro residues in the cyclic-peptide antibiotic gramicidin S (GS; cyclo-[Val^{1.1'}-Orn^{2.2'}-Leu^{3.3'}-D-Phe^{4.4'}-Pro^{5.5'}]₆) exhibited similar antibacterial activity and reduced hemolytic activity.^{10b,e}

2. Substituted 5,6-Fused 1-Aza-2-oxobicycloalkane Amino Acids



As previously mentioned, a synthesis of the constrained Ala-Pro dipeptide motif in the indolizidinone series would be much more useful if it were to incorporate substituents in the bicyclic ring system. L-Proline

or L-pyrroglutamic acid are ideal precursors to the indolizidinone ring system. The advantage of L-pyrroglutamic acid is the presence of the lactam function which can serve the dual purpose of allowing chemical manipulations in the five-membered ring, in addition to providing a reactive site at the intended C-6 carbon atom through carbonyl reactions. An example of the implementation of this strategy can be seen in Scheme 4.¹¹

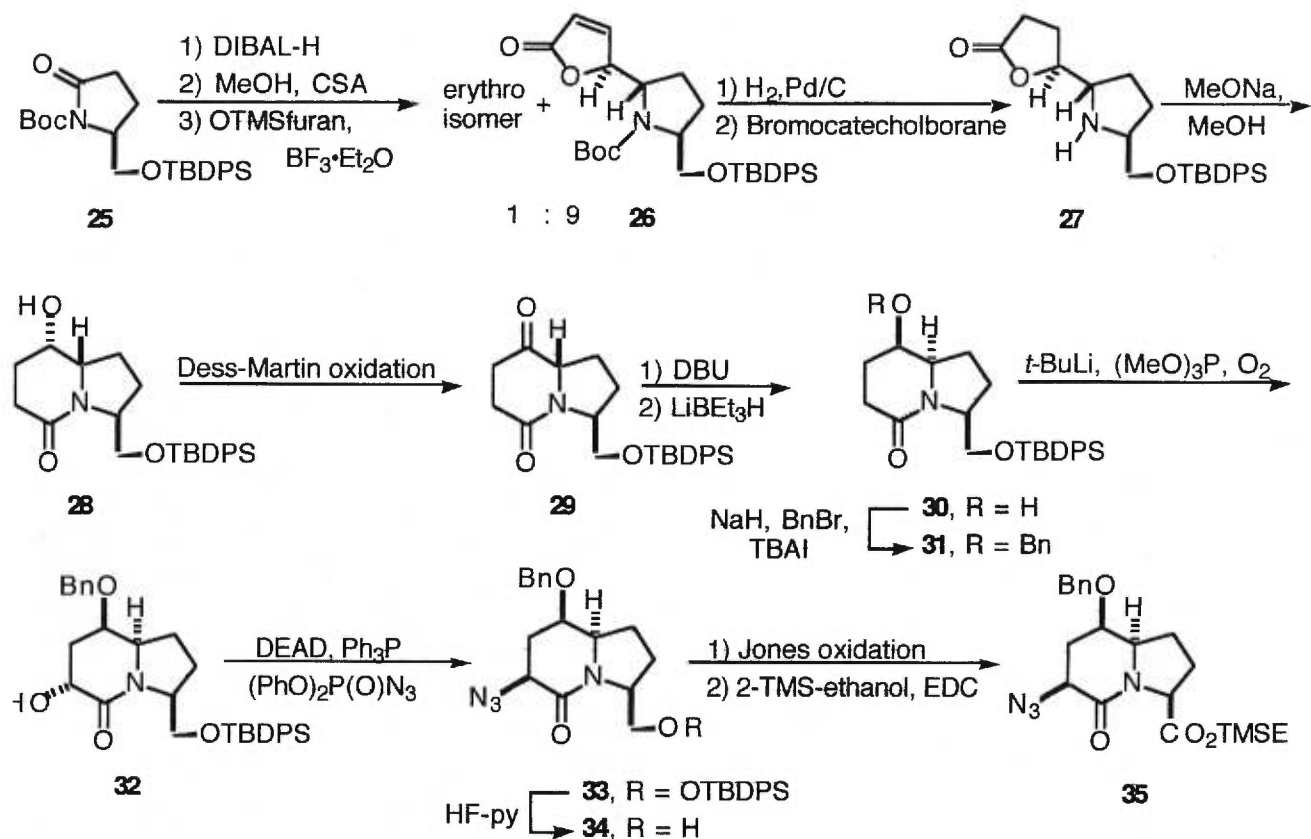


The desired *cis*-substitution pattern, which was required for a (6*S*)-stereochemistry, was obtained by a known two-carbon extension followed by a stereoselective reduction to **19**. A key step was the application of the free-radical Barton thiopyridinyl hydroxamate fragmentation¹² of the ester

20 in the presence of methyl acrylate to give **21**. Manipulation of amine and ester functionality led to the indolizidinone **22**, in which a strategically placed 2-pyridylthio group served as a site for an elimination-conjugate addition sequence leading to the amide **23**. Lactam enolate formation, and electrophilic azidation then led to a 1:1 mixture of the desired (3*S*)-azido lactams which could be separated by chromatography. The strategy is flexible to accommodate other substituents at the C-4 position by a selection of an appropriate carbon nucleophile in the conjugate addition step. Furthermore, diversification can be assured by selecting different amide functions from the carboxyl and azide (amine) ends. For example, the 3-indole 3-acetamide derivative was prepared and found to have a low (3 μM) but selective binding affinity to the NK-2 receptor.¹¹

A versatile method for the stereocontrolled synthesis of 5,6-fused 1-aza-2-oxobicycloalkane amino acids is shown in Scheme 5.¹³

Scheme 5



Condensation of the readily available lactam **25** with OTMS-furan gave a 9:1 *threo-erythro* mixture of butenolides which was manipulated by standard methods to give the crystalline indolizidinone **28**. The stereochemical outcome at C-6 could be exploited further to provide the (6*R*)-isomers of the intended structures. However, the (6*S*)-configuration could be easily obtained by an oxidation epimerization-reduction sequence proceeding from **28** to **29** to **30**. Protection as a benzyl ether allowed a stereocontrolled hydroxylation of the lactam enolate en route to a single C-3 hydroxy isomer **32**. The azide group was introduced via a Mitsunobu reaction to produce **33**, the structure of which was definitively assigned by X-ray crystal analysis on the alcohol **34**. Finally, oxidation to the acid and

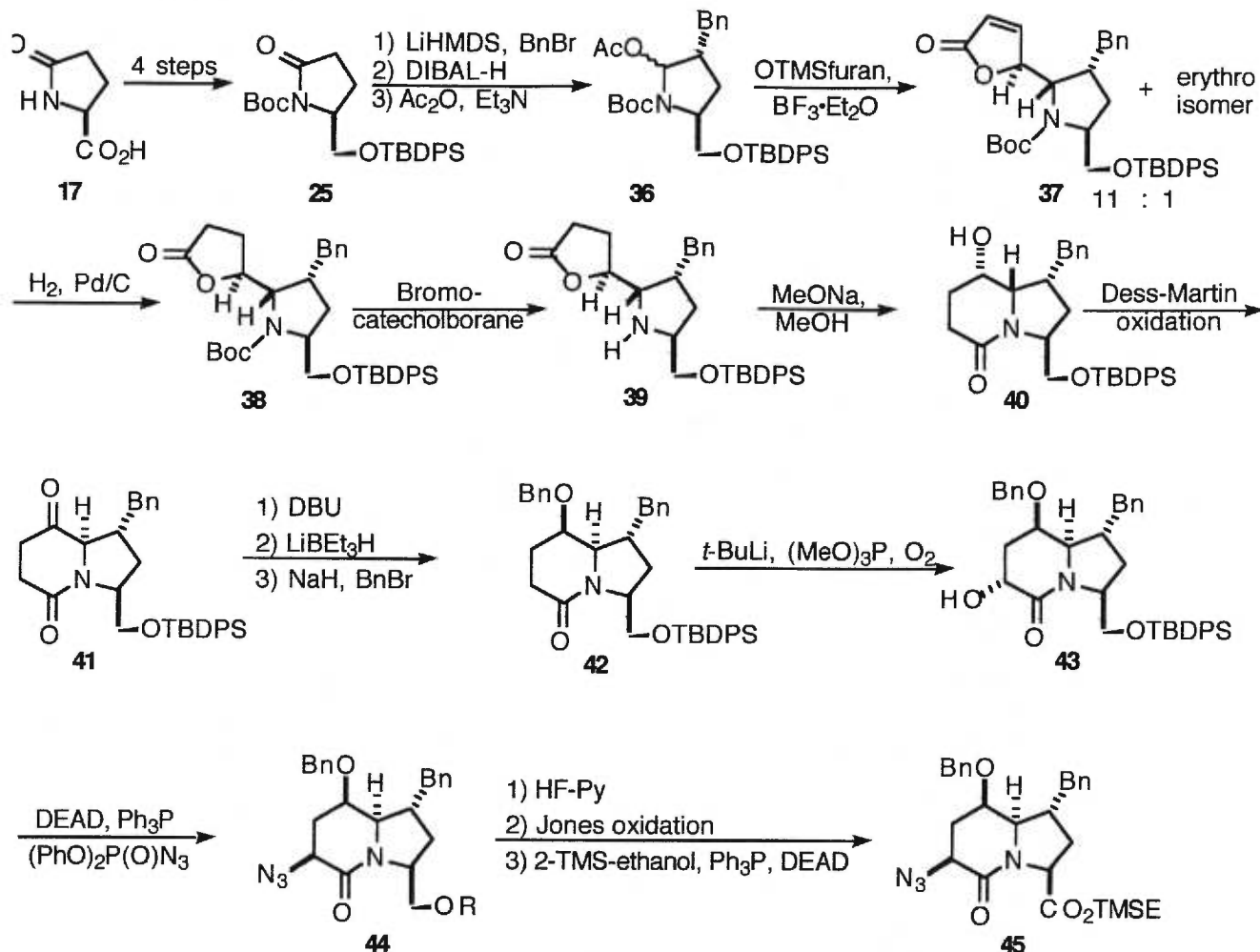
esterification gave **35** with three orthogonally protected functional groups. Transformation to the 3-indole 2-acetamido-5-*O*-benzyl carboxamide derivative led to a selective NK-2 activity (49% binding at 1 μ M).

The utilization of a benzyl substituted L-pyroglutamic acid analog in the synthesis of a C-7 benzyl indolizidinone amino acid is shown in Scheme 6.¹⁴ Benzylation of the lithium enolate of **25** led to essentially one isomer **36** which was activated as the *N*-Boc iminium ion precursor **36**. Treatment with OTMS-furan under Lewis acid catalyzed conditions gave the *threo*-product **38** as the major isomer. Manipulation of functionality as in the case of the unsubstituted analog (Scheme 5), through a series of highly stereocontrolled reactions, led to the desired indolizidinone **45**. A number of intermediates were characterized by X-ray crystal structure analysis. This strategy allows a number of other carbon (or heteroatom) substituents to be incorporated at C-7 of the intended target. The orientation of the resident groups are largely responsible for the stereocontrolled introduction of new substituents, and a single center originally present in L-pyroglutamic acid is responsible for all new centers introduced through cooperative effects. The strategies shown in Schemes 5 and 6 can be easily adapted to the creation of libraries of β -turn mimetics by attachment of the 1-aza-2-oxobicycloalkane motif to a solid phase support and manipulation of the amino acid extremities individually.¹⁵

A free-radical approach to carbocyclization has been described in which the bond-forming step leads to substitution at the amine-bearing carbon atom C-3 on a structure related to **3** (Figure 2).¹⁶ In addition to the

expected (3*R*,6*S*,9*S*)-3-benzyl-3-acetamido indolizidinone *tert*-butyl ester (34%), a significant amount (44%) of reduction was also observed (see also Scheme 10).

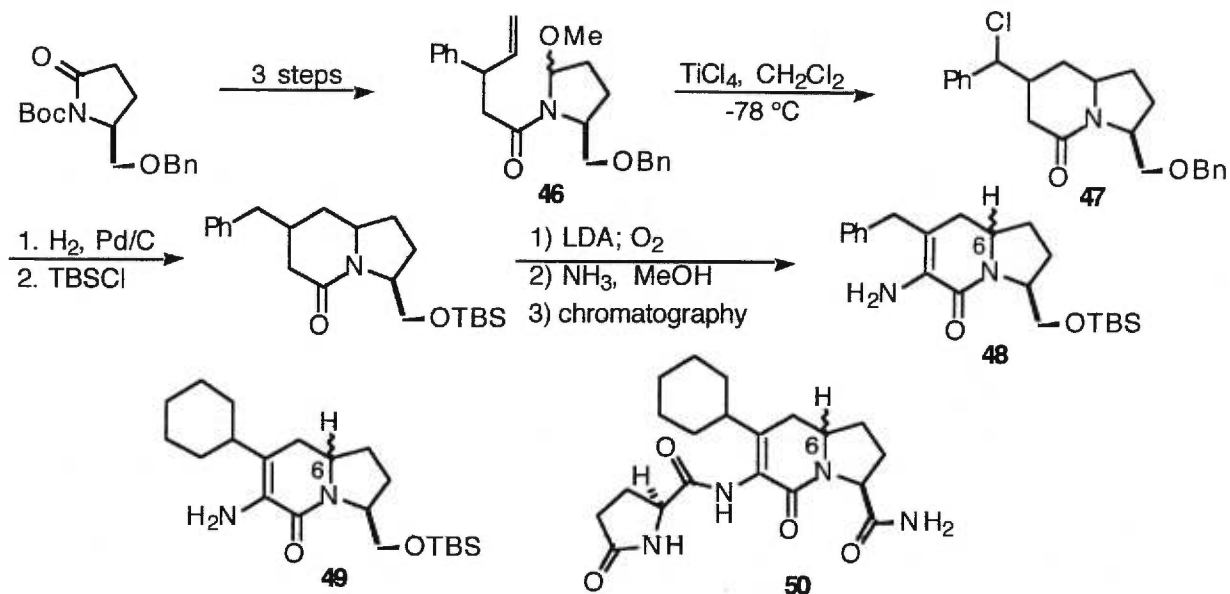
Scheme 6



A method that leads to a substituted α,β -unsaturated indolizidinone amino acid precursor related to **24** except for the absence of two stereogenic centers is illustrated in Scheme 7.^{17a} It is of interest that the 5,6-fused system **47** was the product of an unexpected ring contraction

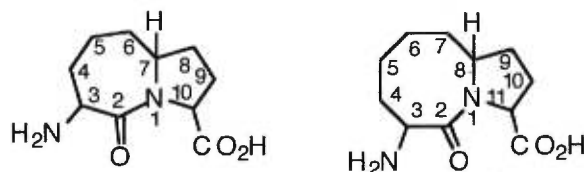
from treatment of **46** with TiCl_4 . The basic strategy was intended to involve the generation of an iminium ion and a cyclization to a 5,7-bicyclic system; however, this method led to the 5,6-bicyclic system **48**.

Scheme 7



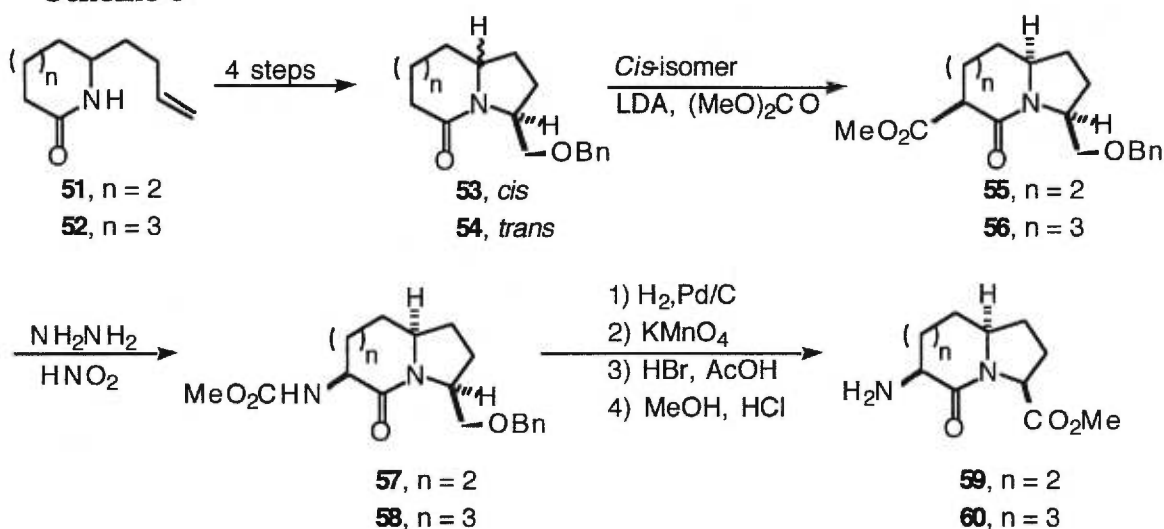
In light of this result, the 4-cyclohexyl Δ^3 -indolizidinone analog **49** was synthesized using a similar procedure.^{17b} Introduction of **49** into thyrotropin-releasing-hormone (TRH) gave mimetic **50** that exhibited receptor affinity and bioactivity contingent upon the ring-fusion stereochemistry. A comparison of **50** with the unrestricted analog cyclohexyl-Ala²-TRH concluded that (6*R*)-stereochemistry interfered with binding and potency while the (6*S*)-isomer showed 3.4 times better affinity and proved to be 4.7 times more potent.

3. 5,7 and 5,8-Fused 1-Aza-2-oxobicycloalkane Amino Acids

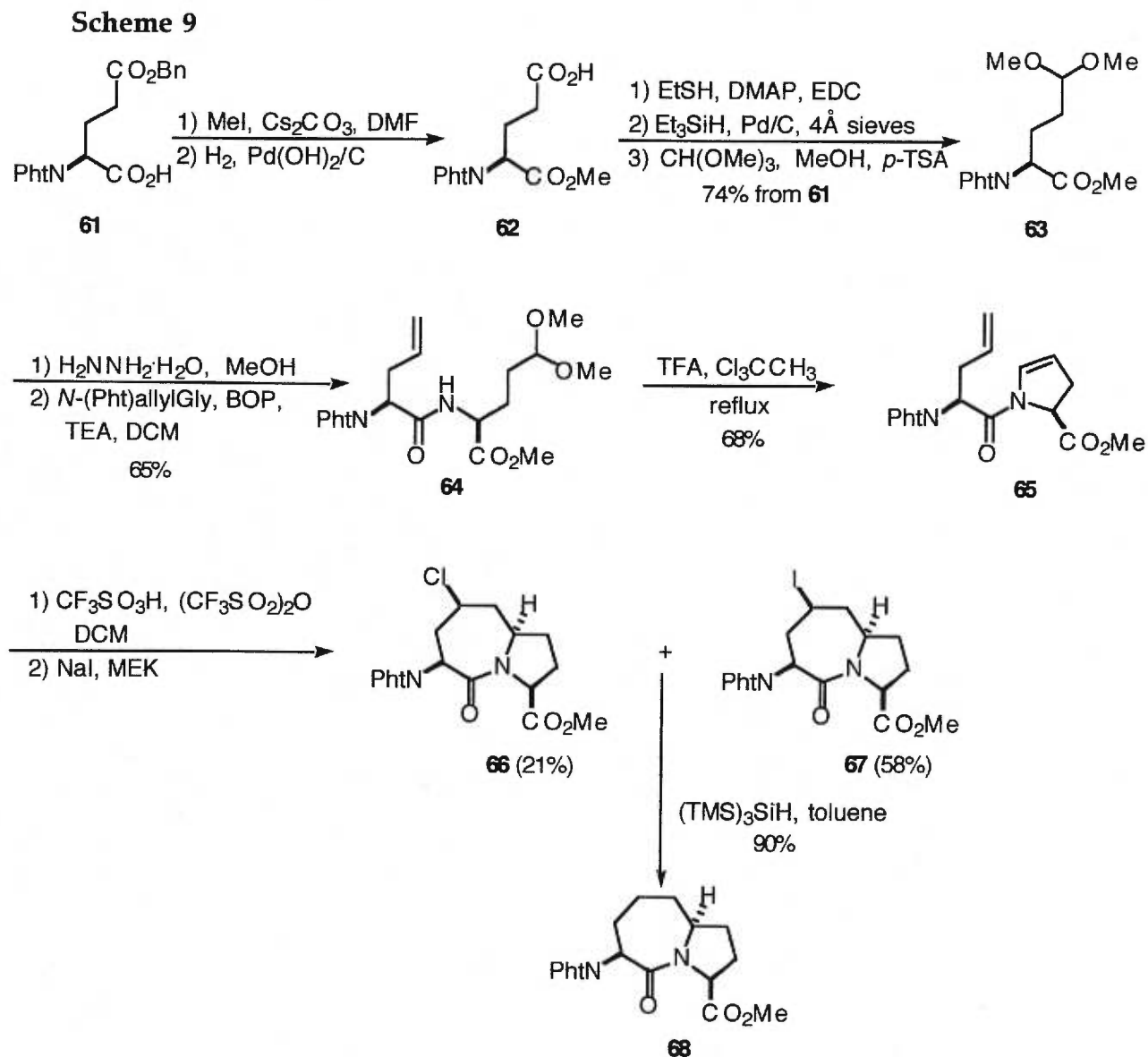


The earliest syntheses of the 5,7- and 5,8-fused skeletons exemplified by the general structures shown above, started with the lactam portion.¹⁸ Seven- and eight-membered lactams **51** and **52** were elaborated through their unsaturated side-chains to produce isomeric bicyclic lactams **53** and **54** (Scheme 8). Functionalization of the *cis*-lactam enolate led to the ester which was rearranged to the corresponding carbamate via the hydrazide. Functional group manipulation gave the racemic 5,7- and 5,8-fused bicyclic amino acid derivatives. It is of interest that the corresponding analogs comprising a 4-phenyl butyric acid group attached to the C-3 amine showed potent ACE inhibitor activity in both 5,7- and 5,8-fused ring systems.¹⁸

Scheme 8



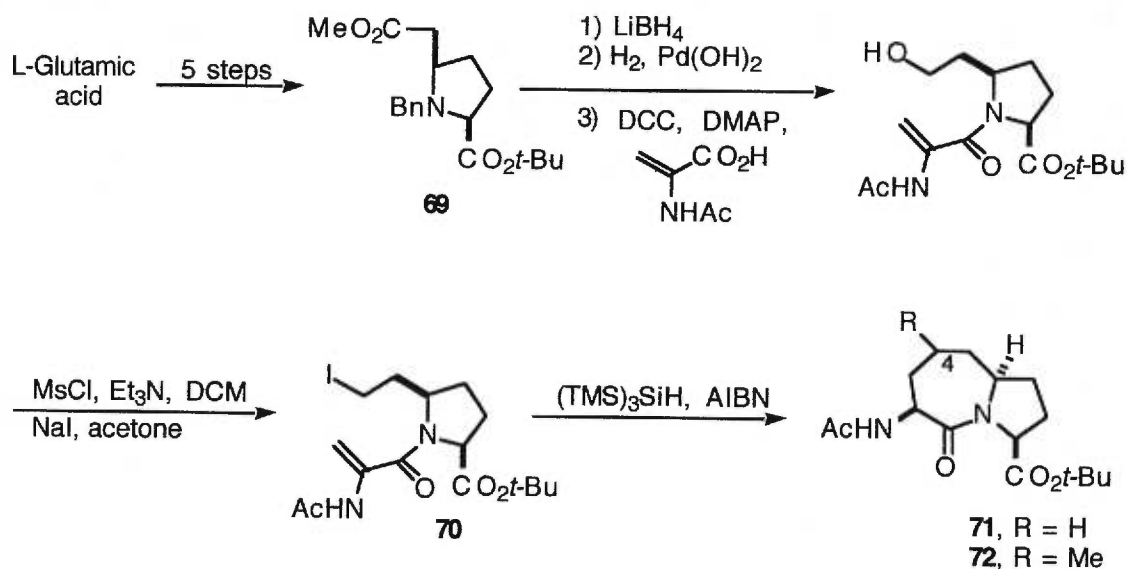
A different strategy to assemble the 5,7-fused system starting with L-glutamic acid derivative **61** is shown in Scheme 9.¹⁹ Selective functionalization of **61** through intermediates **62** and **63** led to the peptide **64** which was transformed into the cyclic enamide **65**.



In a key acyliminium ion cyclization reaction, enamide **65** was transformed into the intended 5,7-fused skeleton as a mixture of halides **66** and **67**. Radical-mediated dehalogenation afforded the *N*-phthalimido ester **68**, the structure of which was ascertained by nOe studies.

Another approach starting from L-glutamic acid features a free-radical cyclization to form the 5,7-fused ring system (Scheme 10).²⁰ Glutamate was transformed into the known *cis*-disubstituted derivative **69** which was in turn subjected to catalytic hydrogenation to liberate the free pyrrolidine derivative. Amide formation with the acrylic acid derivative, and further manipulation led to iodide **70**. The key reaction relies on a *7-endo-trig* cyclization of intermediate **70** to afford the intended target **71** in a yield of 42% with excellent diastereoselectivity. Improved yield (61%) of **71** was achieved in the free-radical cyclization when the iodide group was changed to a phenylselenenyl function.

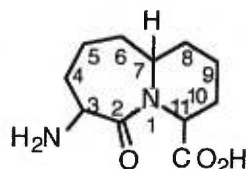
Scheme 10



Use of a dehydro amido butyrate in a similar sequence gave a 1:1 diastereomeric mixture of (4*RS*)-methyl analogues **72** in 52% yield.

The structures of 3,4-unsaturated 4-phenyl, 5,7-fused compounds prepared by intramolecular Lewis-acid mediated cyclizations^{21,22} have been revised and shown to be 5,6-fused systems.^{17a}

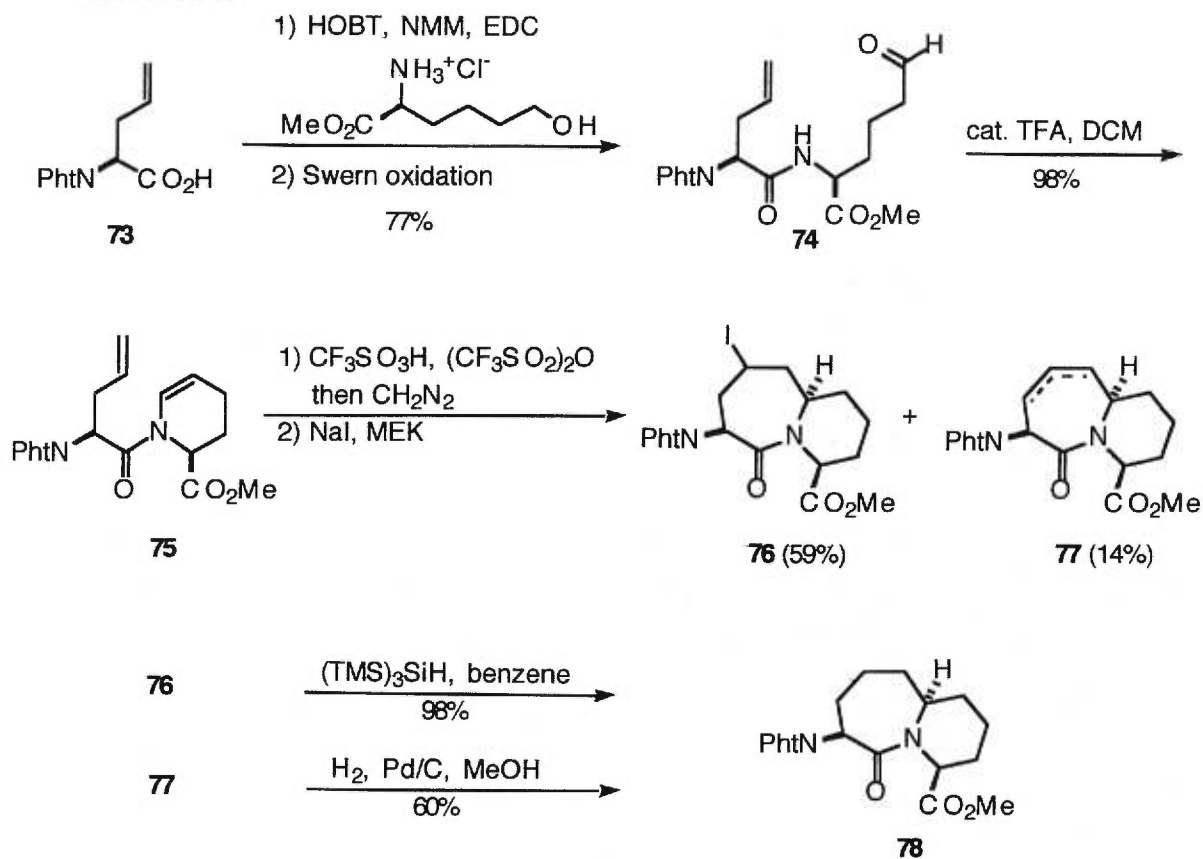
4. 6,7-Fused 1-Aza-2-oxobicycloalkane Amino Acids



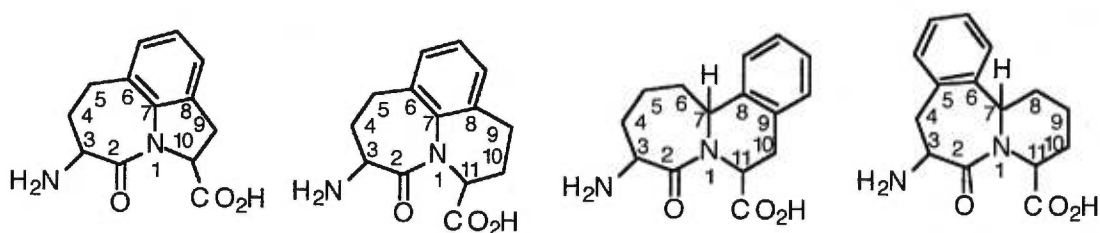
The synthesis of the 6,7-fused bicyclic systems shown above, was accomplished essentially by the same general reactions previously described for the 5,7-analog¹⁹ (Scheme 9).

N-Phthalimido L-allylglycine **73** was transformed to the corresponding amide **74**, and the latter was cyclized to the enamide **75** (Scheme 11). The seven-membered ring was constructed using an iminium ion cyclization as in the synthesis of the 5,7-fused analog shown in Scheme 9. Reduction of the two products **76** and **77** led to the desired compound **78** as a single isomer.

Scheme 11



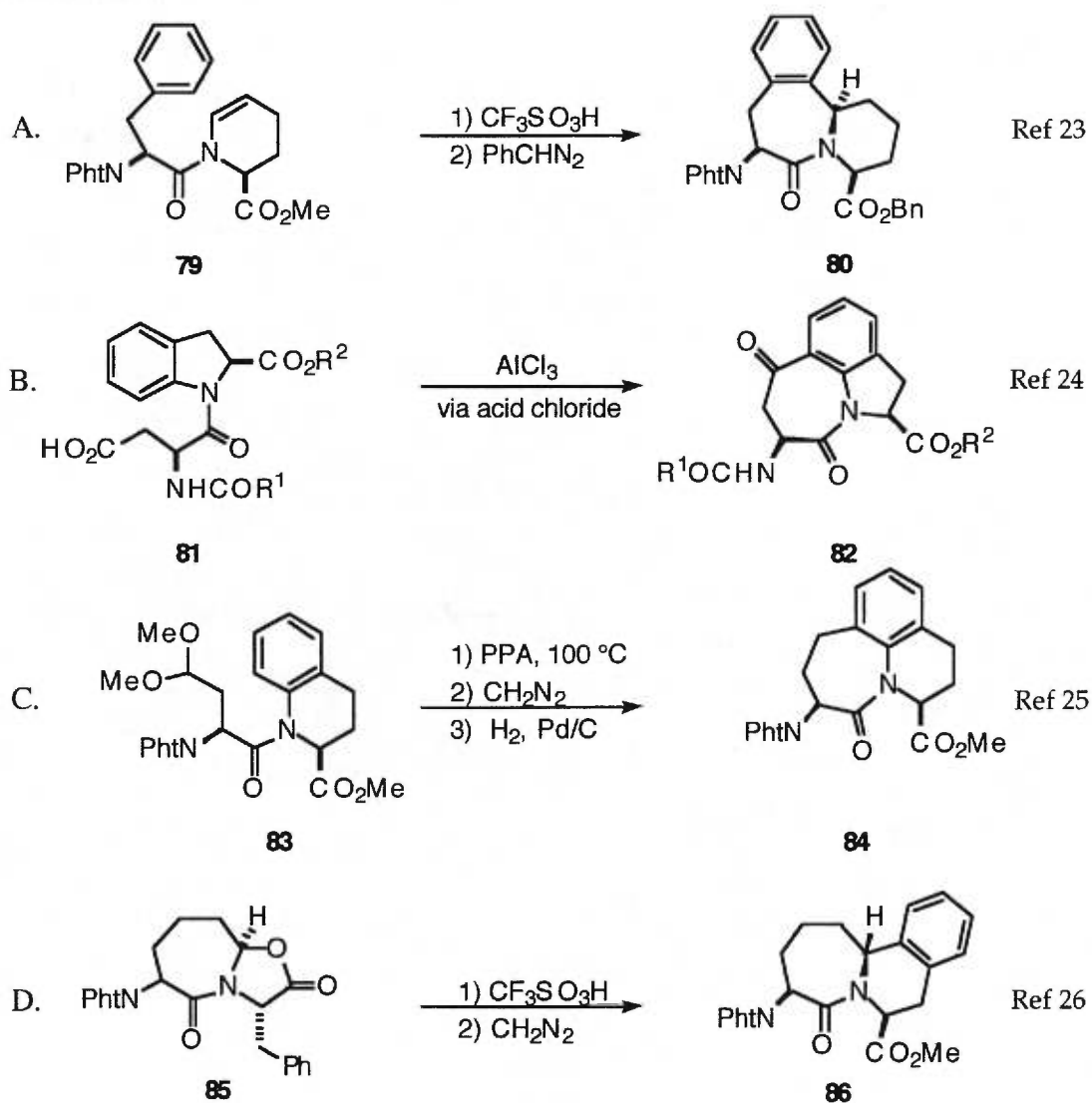
5. 5,7- and 6,7- Fused-1-Aza-2-oxobicycloalkane Amino Acids with Appended Aromatic Units.



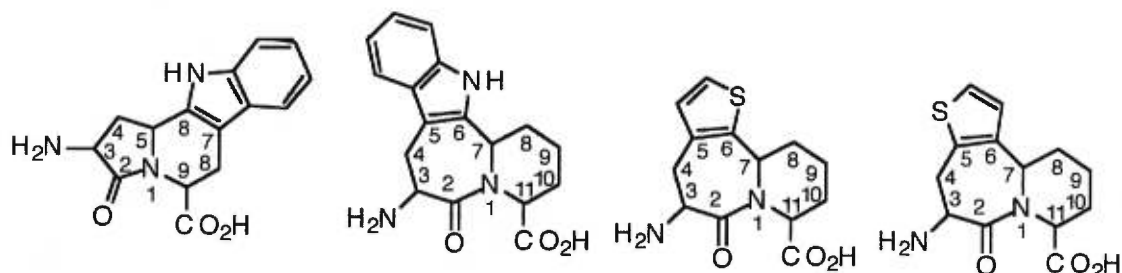
The propensity of phenylalanine in natural and unnatural molecules that have demonstrated therapeutic potential has instigated the

exploration of tricyclic structures that incorporate the phenyl ring. The synthesis strategy for these tricyclic structures involves intramolecular electrophilic aromatic substitutions of activated groups as shown in Scheme 12.²³⁻²⁶ Some C-3 aminoalkyl analogs in this series have exhibited enzymatic activity as ACE inhibitors.²³⁻²⁶

Scheme 12

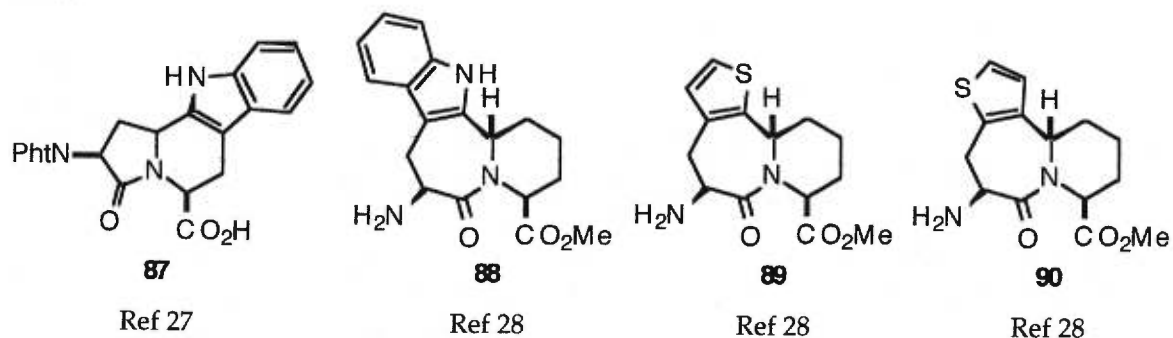


6. 5,6- and 6,7-Fused 1-Aza-2-oxobicycloalkane Amino Acids with Appended Heteroaromatic Units



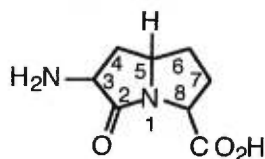
The preceding 5,6- and 6,7-fused bicyclic motifs have been synthesized^{27a,28} with appended heteroaromatic units as represented by the general structures **87-90** shown in Figure 3.

Figure 3



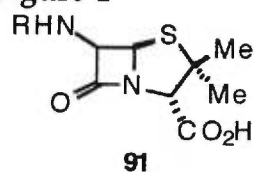
The introduction of **87** at the 4 and 5 positions of a [Lys^{2,2'}]-GS analog gave similar antibacterial activity with the (5*R*)-isomer and caused a marked decrease in antibacterial potency with the (5*S*)-isomer.^{27b}

7. **5,5-Fused 1-Aza-2-oxobicycloalkane Amino Acids**
(Pyrrolizidinone type)

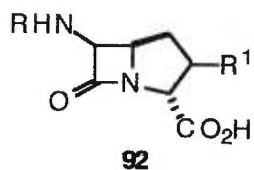


Extensive work on the synthesis and chemical modification of β -lactam antibiotics over the years has produced a multitude of biologically active analogs and novel structural entities in this area.²⁹ In view of the relatively limited possibilities left for structural and functional variations of the β -lactam motif while maintaining a rational approach to the accepted modes of antibacterial action, chemists have turned to the exploration of γ -lactams and related heterocycles³⁰ as potential antibacterial agents. The structural similarity of these analogs to the 1-aza-2-oxobicycloalkane amino acid motifs discussed in this review, warrants their inclusion, as well as some discussion of their methods of synthesis and their potential as dipeptide mimetics.

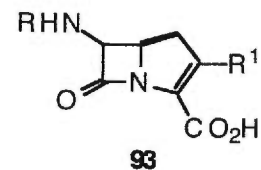
The synthesis and biological evaluation of a series of γ -lactam analogs of penicillanic and carbapenicillanic acids **91-93** (Figure 4) have been areas of intense research efforts since 1983.³¹

Figure 4

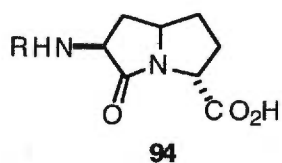
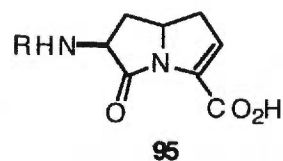
Penicillin type



Carbapenicillin type

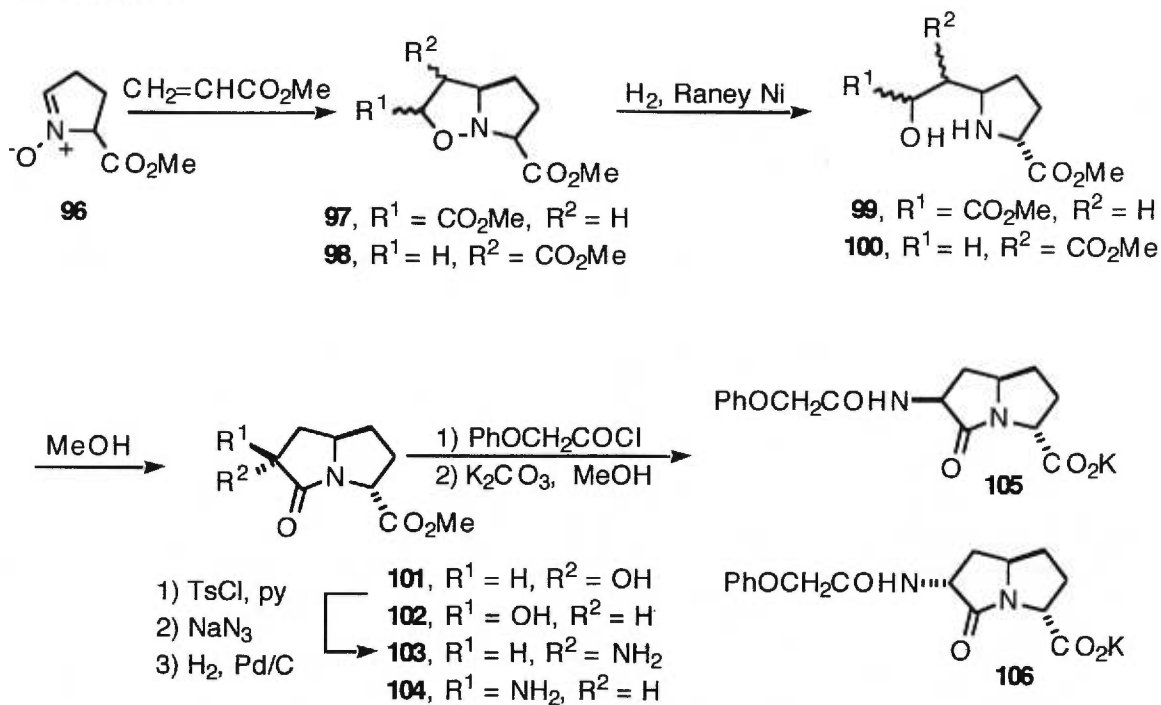


Carbapenem type

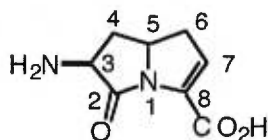
 γ -Lactam variantUnsaturated γ -Lactam variant

In one strategy,³² the nitron **96** was subjected to a 1,3-dipolar cycloaddition reaction with methyl acrylate to give a mixture of adducts **97** and **98** (Scheme 13). Reductive cleavage of the N-O bond, introduction of the amine group via azide ion, followed by cyclization gave a mixture of *N*-protected bicyclic γ -lactams. Finally, deprotection afforded a mixture of racemic products **105** and **106** which did not exhibit antibacterial activity.

Scheme 13



8. 5,5-Fused 1-Aza-2-oxobicycloalkene Amino Acids

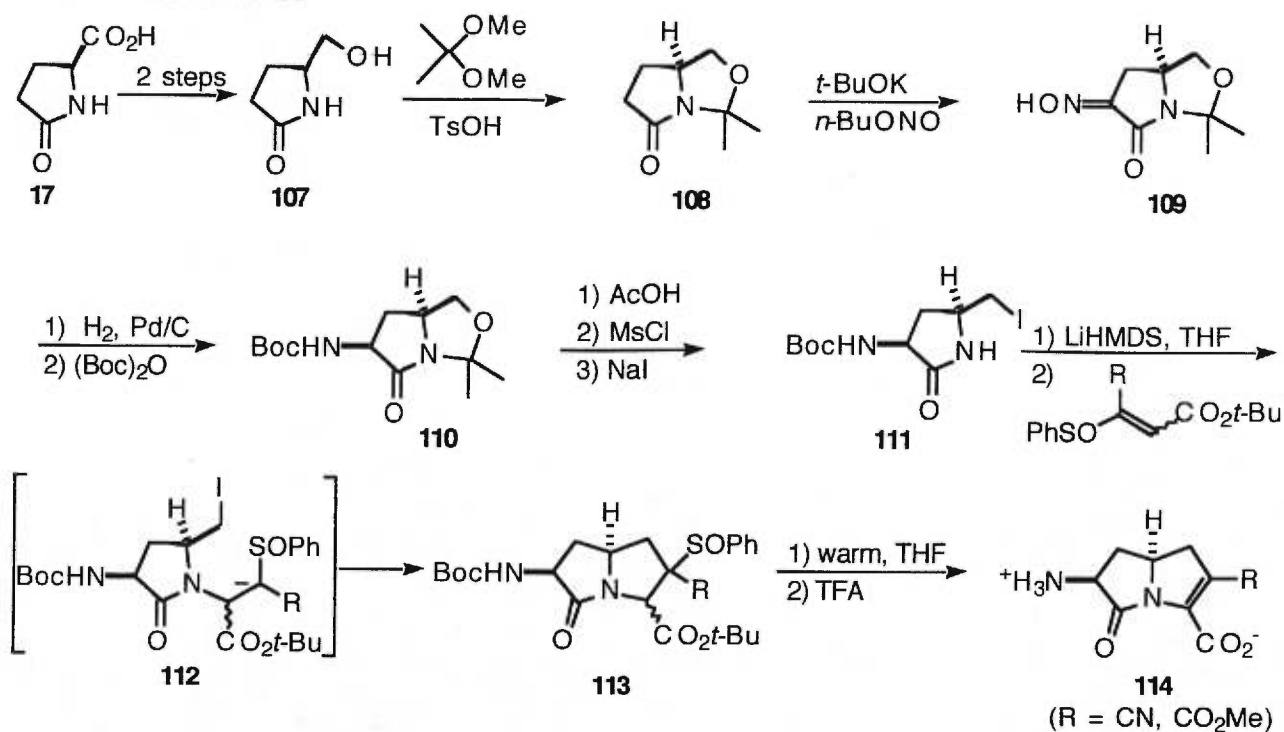


An obvious extension of the work described above³¹ involves the synthesis of the corresponding unsaturated bicyclic γ -lactams. Here, the effect of ring strain would be expected to manifest itself by rendering the molecules more susceptible to enzymes such as the penicillin binding proteins,²⁹ that are prone to be acylated by the original β -lactams.

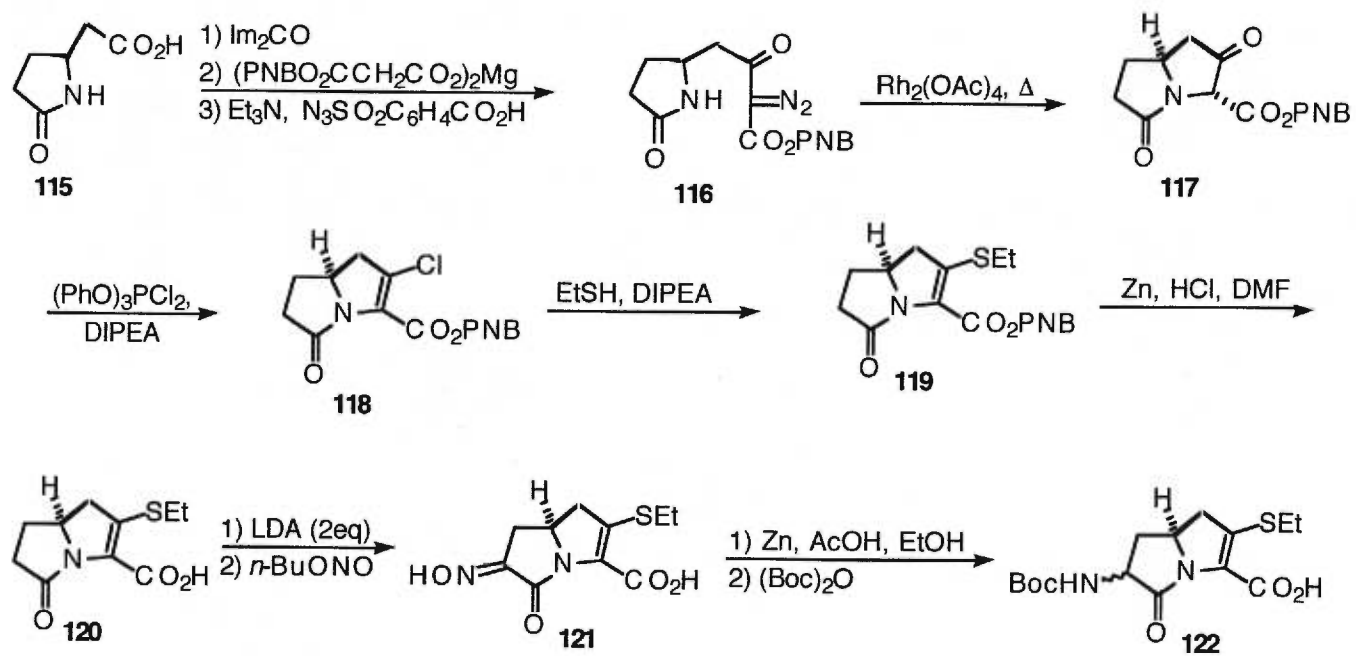
A strategy that capitalized on the ready availability of L-pyroglutamic acid as a chiral educt is shown in Scheme 14.³³ The known alcohol **107** was protected as the acetonide **108**, and the amino group was introduced by oximation of the corresponding enolate to give **109**. Catalytic hydrogenation and *N*-protection afforded the *N*-Boc derivative **110** with the expected stereochemistry because of the bias offered by the bicyclic structure. An X-ray crystal analysis confirmed the structure. The key step in the sequence was an annulation reaction involving a conjugate addition of a lithium imidate derived from **111** to provide the bicyclic lactam **113** via the sulfoxide intermediate **112**. β -Elimination followed by deprotection afforded the desired motif **114**. Only slight levels of antibacterial activity were observed in this series.

In an alternative strategy, the unsaturated γ -lactam analogs with vinylic sulfoxides and sulfones have been prepared³⁴ (Scheme 15). The homologated L-pyroglutamic acid **115** was transformed into the diazo ester **116**. Application of a Rh(II)-catalyzed insertion reaction³⁵ led to the bicyclic lactam **117**, which was further manipulated to produce a mixture of *N*-Boc derivatives expressed as **122**. These were then transformed into specific amide derivatives for biological evaluation. No antibacterial activity was detected with these γ -lactam analogs.

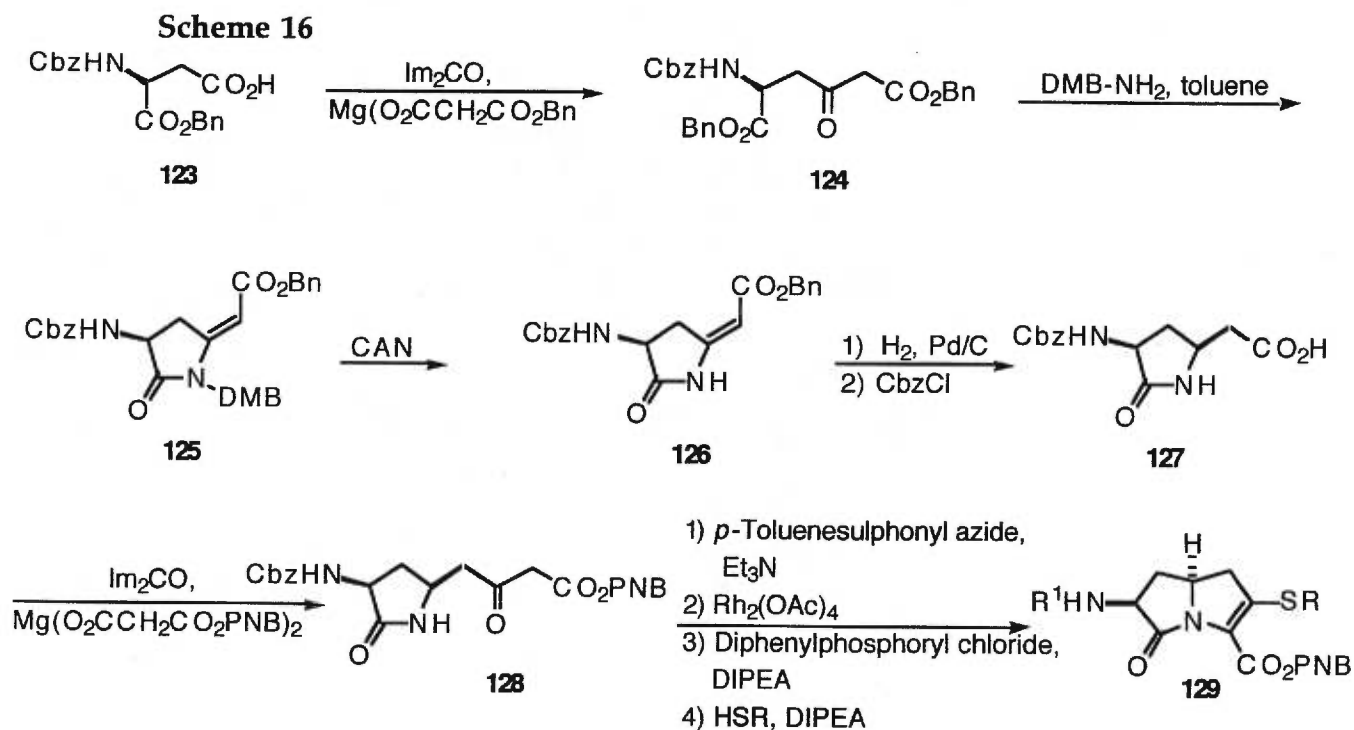
Scheme 14



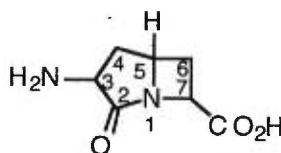
Scheme 15



Another group³⁶ has reported a synthesis of unsaturated γ -lactam analogs of carbapenems starting from L-aspartic acid derivative **123** (Scheme 16). Chain extension using a malonate synthon led to the β -keto ester **124**. Lactam formation in the presence of dimethoxybenzylamine led to **125** which was deprotected to enamido ester **126**. Catalytic hydrogenation followed by *N*-protection gave intermediate **127**, which was transformed into the γ -lactam carbapenem analog following known methods. In contrast to the lack of antibacterial activity for this class of compounds in general,^{31,34} the authors report "slight but appreciable *in vitro* antibacterial activity against the Gram-negative organisms tested", for a series of analogs.³⁶

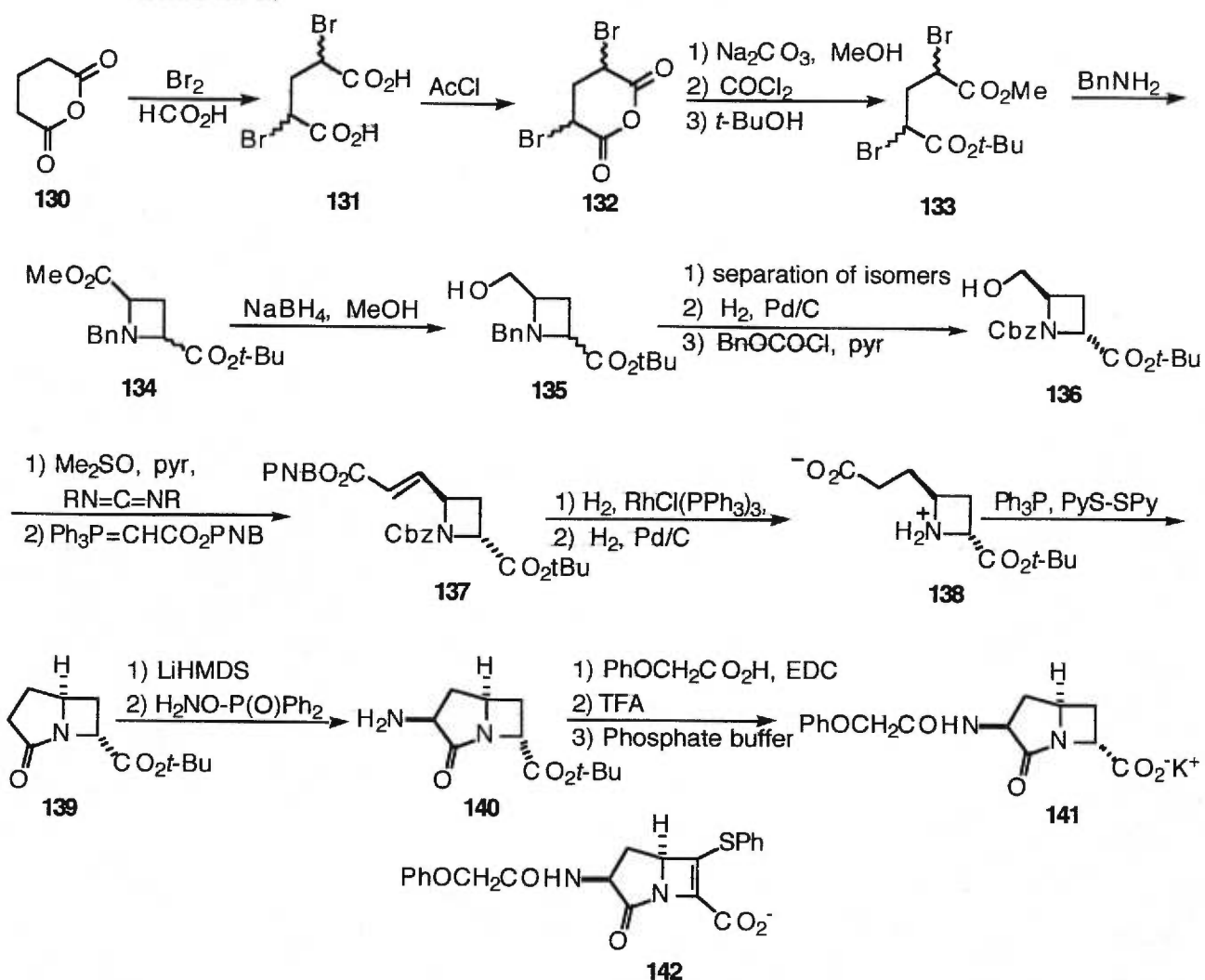


9. 4,5-Fused 1-Aza-2-oxobicycloalkane and 1-Aza-oxobicycloalkene Amino Acids



Based on molecular modeling studies it was proposed that the hybridization characteristics of the nitrogen atom in a bicyclic azetidine analog³⁷ would better approximate the situation found in penicillin. Accordingly, the synthesis of such analogs and their azete counterparts was undertaken (Scheme 17). Glutaric anhydride (**130**) was transformed into α,α' -dibromo diester **133** by conventional methods. Azetidine formation was achieved by treatment with benzylamine. Preferential reduction of the methyl ester in **134** followed by separation of *cis/trans* isomers and further manipulation led to **136**. Chain-extension and catalytic reduction gave azetidine **138** which was subjected to γ -lactam formation, affording *trans*-isomer **139**. Introduction of the amino group was achieved via enolate chemistry utilizing *O*-diphenylphosphinoyl hydroxylamine as the nitrogen source³⁸ to give **140**, which was transformed into the *N*-phenoxyacetyl penam surrogate **141**. Unfortunately, no significant antibacterial activity was detected with **141** or its *cis*-aminoacyl isomer.

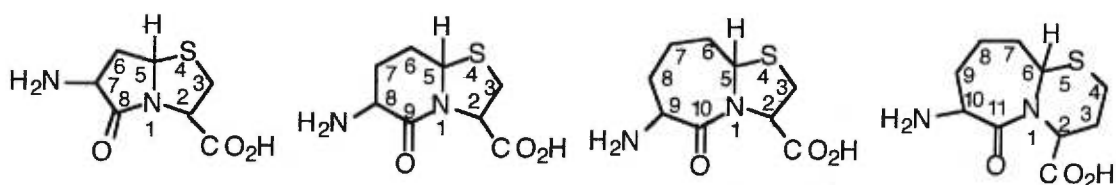
Scheme 17



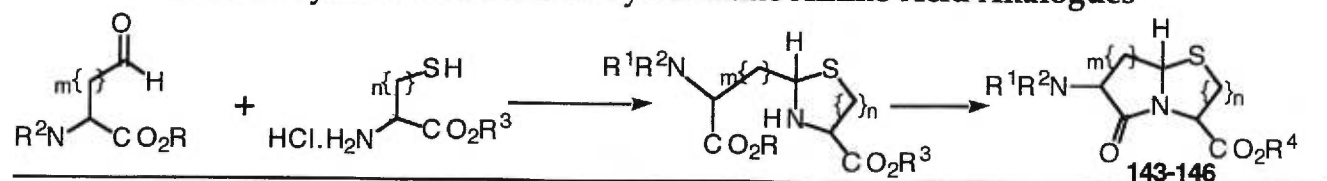
It is of interest to point out that azete analog **142** (Scheme 17), disclosed in a patent,³⁹ possesses antibacterial activity.

2.3 THIAZABICYCLOALKANE AMINO ACIDS

1. 5,5-, 5,6-, 5,7- and 6,7-Fused 1-azaobicycloalkane Amino Acids Encompassing Sulfur



The first 1-azaobicyclo[X.Y.0]alkane amino acids that were synthesized for use as conformationally rigid dipeptide mimetics were those possessing sulfur in the heterocycle ring.⁴⁰⁻⁴² Since they are prepared by a common synthesis method, we will discuss these different ring systems within the same section. The general method for synthesizing thiazabicycloalkane amino acid involves condensation of an ω -formyl α -amino acid analog with a cysteine derivative to provide a thiazolidine intermediate that is treated directly under conditions to effect intramolecular *N*-acylation and furnish the bicyclic lactam. The *N*-protected bicyclo amino acid or ester is then usually purified by chromatography.

Table 2. Synthesis of Thiazabicycloalkane Amino Acid Analogues

m	n	R, R ¹ , R ²	R ³	conditions condensation / lactam cyclization	R ⁴	%Yield ^a	Major Product	Ref
1	1	Bn, H, Boc	H	pyridine, Δ; CH ₂ N ₂	Me	68	(2 <i>S</i> , 5 <i>R</i> , 7 <i>R</i>)- 143	43
1	1	Bn, H, Cbz	Me	pyridine, Δ	Me	38	(2 <i>S</i> , 5 <i>R</i> , 7 <i>S</i>)- 143	44
1	1	Bn, H, Cbz	Me	pyridine, Δ	Me	45	(2 <i>R</i> , 5 <i>S</i> , 7 <i>S</i>)- 143	44
2	1	-CH ₂ , Cbz	H	H ₂ O / DMSO, pH 7, Δ; CH ₂ N ₂	Me	35	(2 <i>S</i> , 5 <i>R</i> , 8 <i>R</i>)- 144	43
2	1	(CH ₂) ₂ TMS, Pht	Et	HOAc, H ₂ O / BnNMe ₃ F, DMF	Et	50	(2 <i>R</i> , 5 <i>S</i> , 8 <i>S</i>)- 144	45
2	1	-CH ₂ , Cbz	Me	pyridine; K ₂ CO ₃ , MeOH	Me	46	(2 <i>R</i> , 5 <i>S</i> , 8 <i>S</i>)- 144	46
2	1	Me, Pht	H	NaOAc, H ₂ O, EtOH, Δ	H	51	(2 <i>R</i> , 5 <i>S</i> , 8 <i>S</i>)- 144	41
2	1	-CH ₂ , Cbz	Me	pyridine; K ₂ CO ₃ , MeOH	Me	70	(2 <i>S</i> , 5 <i>R</i> , 8 <i>S</i>)- 144 ^b	47
3	1	H, Pht	Me	MeOH / EEDQ	Me	74	(2 <i>R</i> , 5 <i>RS</i> , 9 <i>S</i>)- 145 ^c	42
3	2	H, Pht	Me	MeOH / EEDQ	Me	25	(2 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 10 <i>S</i>)- 146 ^d	48

^aUnless otherwise noted, yields refer to the major isomer isolated. ^b(2*S*, 5*S*, 8*S*)-**144** was also isolated in 12% yield. ^c**145** was isolated as a 1:1 mixture. ^d(2*R*, 5*R*, 10*S*)-, (2*R*, 5*S*, 10*S*)- and (2*S*, 5*R*, 10*S*)-**146** were also isolated in 21%, 8% and 1% yields.

Syntheses of thiazabicyclo[X.Y.0]alkane amino acids using ordinary ω-formyl α-amino acids and esters with cysteine and homocysteine are summarized in Table 2.^{41,43-48} Yields of bicyclic products from cysteine derivatives are generally moderate to good.^{41,43-49} The stereochemistry about the bicyclic products can be controlled by employing enantiopure amino acid substrates in the condensation/lactam cyclization sequence. In the case of 5,5- and 6,5-bicyclic systems, the major diastereomer that is ordinarily formed possesses the ring-junction hydrogen and the cysteine-

derived carboxylate, on the same side of the thiazolidine ring (Table 2).^{41,43-47}

The ω -formyl α -amino acids were protected to avoid intramolecular cyclization in those cases that could lead to the formation of dehydropyrrolidines and dehydropiperidines. Although phthalimides were initially used for amino protection,^{41,42} *N*-(Cbz)oxazolidinones have been used more recently to protect both the amine and acid groups, thereby preventing intramolecular cyclization, and simultaneously activate the α -carboxylate for intramolecular lactam formation.^{43,47,49} The hydroxymethyl group that resulted from ring opening of the *N*-(Cbz)oxazolidinone was subsequently removed under mildly alkaline conditions.

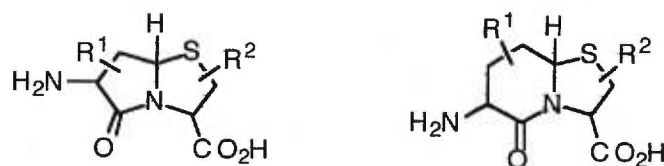
Thiapyrrolizidinone amino acid **143** (Table 2) was originally synthesized as a γ -lactam analog of the penems.^{40,44,49} Although **143** did not possess bioactivity, the related 2,3-unsaturated analog showed weak antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*.^{44,50-52,30a-c} A systematic examination of Pro-Leu-Gly-NH₂ using a variety of thiapyrrolizidinone amino acids related to **143**, and substituted thiapyrrolizidinone amino acid **152** (Section III.2) has provided strong evidence that this tripeptide adopts a type II β -turn conformation when exhibiting modulatory effects on the dopamine receptor.^{43,53}

The use of thiaindolizidinone amino acid **144** in conjunction with studies of different biologically active peptides has led to several potent

conformationally-constrained surrogates. For example, similar antibacterial activity and circular dichroism spectra indicate that (2*R*, 5*S*, 8*S*)-**144** mimics the type II' β -turn in gramicidin S, replacing D-Phe at the $i + 1$ and Pro at the $i + 2$ positions.^{45,54-56} Analogs with reduced potency were obtained upon replacing (2*R*, 5*S*, 8*S*)-**144** for Gly²-Gly³ in enkephalin (H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-NH₂, 1/1000 activity)^{55,57} and for Gly⁶-Leu⁷ in LH-RF (Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂, 1/10 activity).^{55,56,58} Substitution of thiaindolizidinone amino acid (2*S*, 5*R*, 8*S*)-**144** for L-Ala⁷-D-Ala⁸ in cyclosporin A (CsA) furnished a more potent inhibitor of the T-cell receptor signaling pathway in a signaling assay. Tricyclic cyclosporin A (TCsA) exhibits three times greater affinity for cyclophilin (CyP) and the affinity of TCsA-CyP for calcineurin was also determined to be three times greater than that of CsA-CyP.⁴⁷ Examples in which thiaindolizidinone amino acid **144** have been incorporated into peptide analogs lacking biological activity may result from mimicking an inactive conformation and from structural features that interfere with receptor recognition. For example, NMR and computational studies of an inactive cyclic hexapeptide mimetic of Tendamistat showed that (2*R*, 5*S*, 8*S*)-**144** adopted a conformation in which the constrained dipeptide occupied the i and $i + 1$ positions rather than the $i + 1$ and $i + 2$ positions of a type II' β -turn.⁴⁶ On the other hand, (2*R*, 5*S*, 8*S*)-**144** was recently shown to adopt the desired type II' β -turn, and to stabilize a bioactive geometry in a cyclic hexapeptide inhibitor of the interaction between integrin $\alpha_4\beta_1$ and vascular cell adhesion molecule-1.⁵⁹ In addition, 5,7- and 6,7-fused thiazabicycloalkane amino acids **145** and **146** have been

incorporated into the peptide frameworks of several potent metalloprotease inhibitors.^{18,48,60}

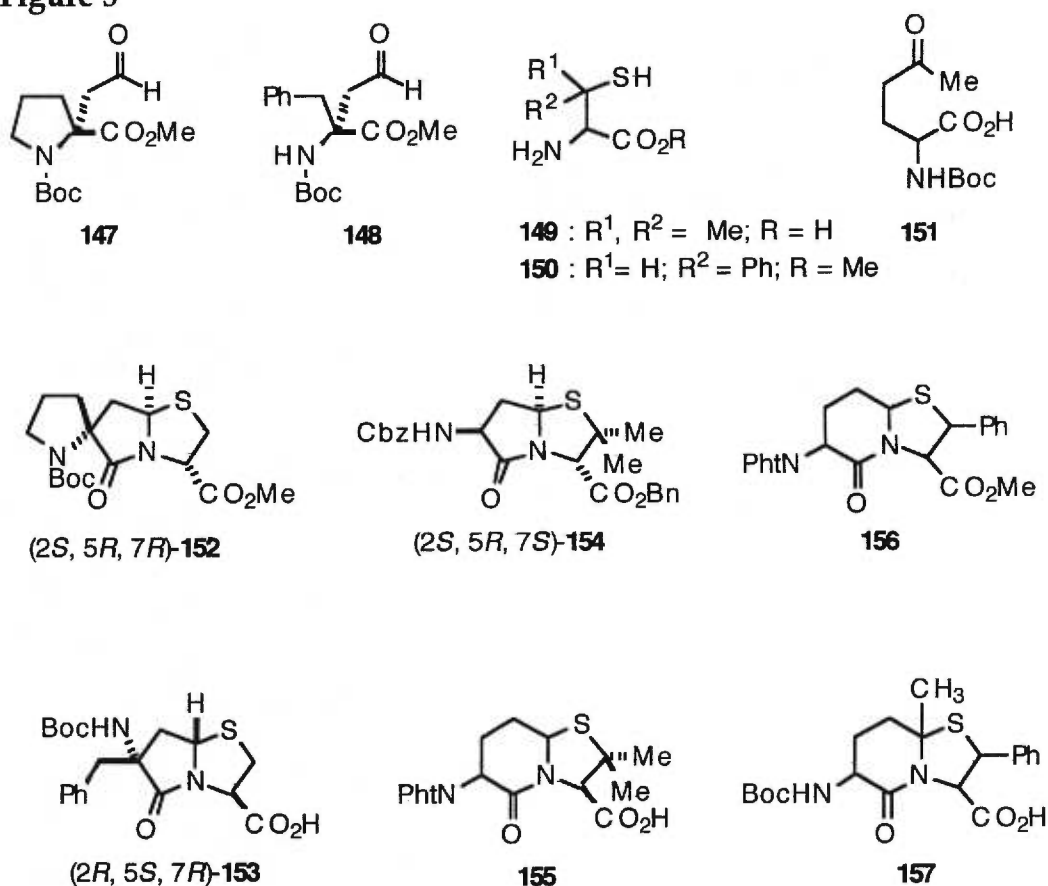
2. Substituted 5,5- and 5,6-Fused 1-Aza-2-oxobicycloalkane Amino Acids Encompassing Sulfur



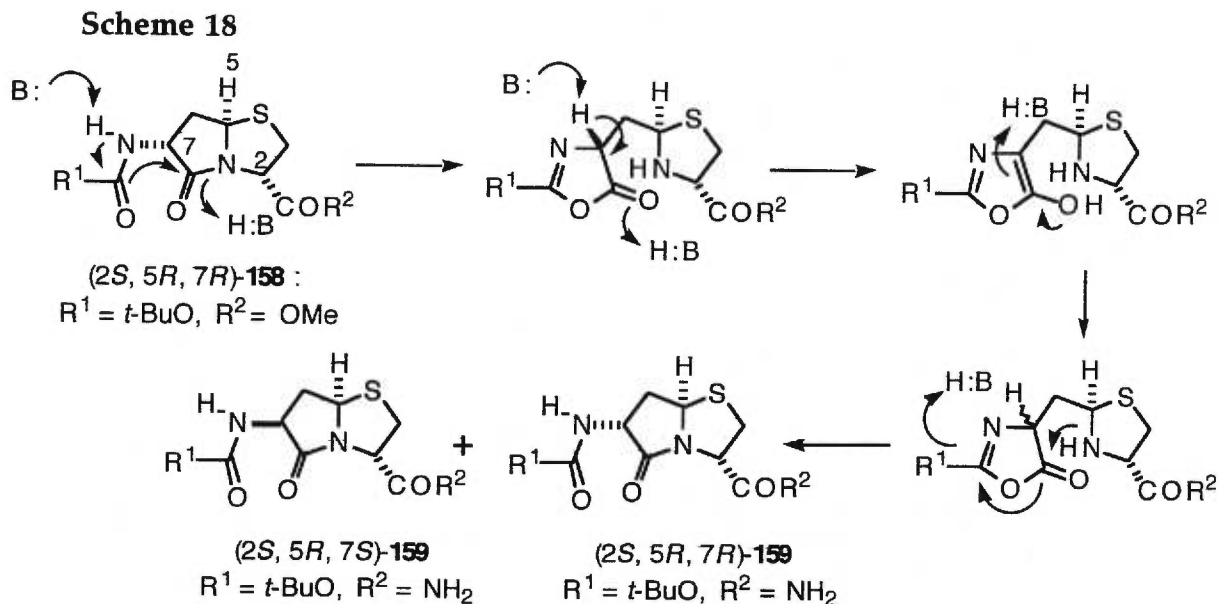
α -Alkyl ω -formyl α -amino esters **147** and **148**, β -alkyl cysteines **149** and **150**, as well as δ -keto α -amino acid **151**, all have been employed to synthesize thiazabicyclo[X.Y.0]alkane amino acid analogs possessing side-chain groups attached to the ring carbons (Figure 5). α -Alkyl ω -formyl α -amino esters react with cysteine to furnish the desired α -branched heterocycles.^{61,62} For example, the condensation between aldehyde **147**, derived from (*R*)-2-allylproline, and (*S*)-cysteine-HCl in aqueous ethanol followed by cyclization with triethylamine in DMF at 70 °C furnished the bicyclic lactam which was isolated as its methyl ester **152** in 37% overall yield.⁶² Condensation of α -methyl α -benzyl-*N*-(Boc)aspartate β -aldehyde **148** with (*R*)-cysteine in pyridine at reflux gave the thiapyrrolizidine amino acid **153** in 46% yield after acidification.⁶¹ The reaction between α -methyl *L*-*N*-(Cbz)aspartate β -aldehyde and (*S*)-penicillamine **149** in refluxing pyridine was claimed to provide 5,5-fused bicyclic lactam **154**.⁶³ On the other hand, condensation of α -methyl *N*-phthalyl-*L*-glutamate γ -

aldehyde with (*R*)-penicillamine **149** gave **155** in only 2% overall yield.^{55,56} The condensation of β -phenylcysteine methyl ester hydrochloride **150** with the same aldehyde was reported to also give a poor yield of **156**.⁶⁴ However, the bicyclic lactam **157** was obtained in good yield when β -phenylcysteine•HCl **150** (*R* = H) was condensed with the δ -keto α -amino acid **151**.⁶⁴

Figure 5

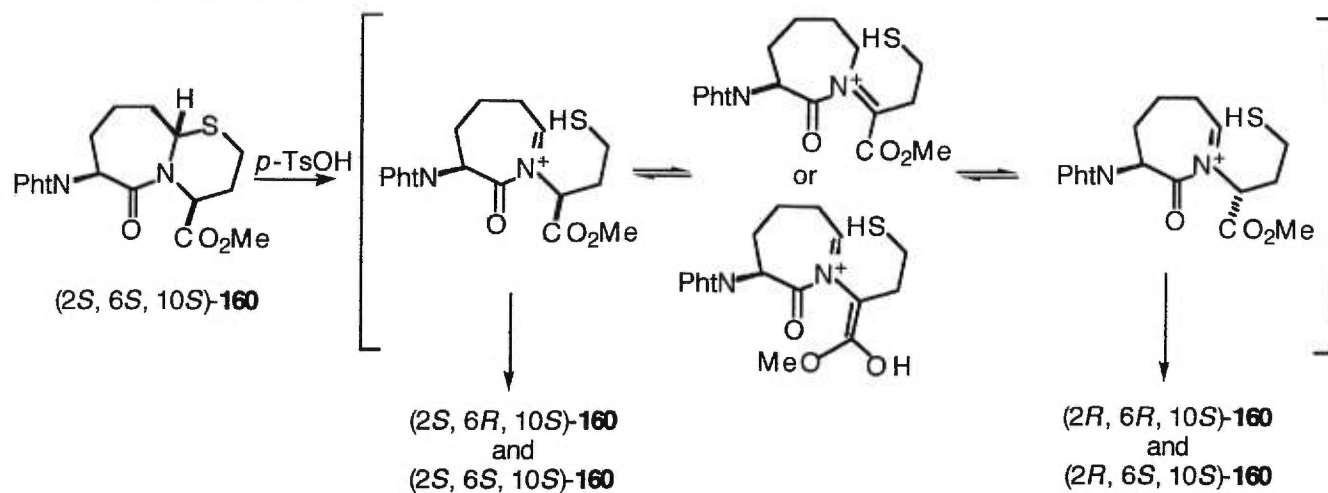


3. Epimerization of Thiazabicycloalkane Amino Acids



Epimerization has been encountered during the synthesis and further transformations of 1-azaobicyclo[X.Y.0]alkane amino acids.^{43,48} For example, treatment of (2*S*, 5*R*, 7*R*)-*N*-(Boc)amino thiapyrrolizidinone methyl ester **158** with NH_3 in methanol gave a 9:1 mixture of (2*S*, 5*R*, 7*R*)- and (2*S*, 5*R*, 7*S*)-*N*-(Boc)amino thiapyrrolizidinone carboxamides **159** (Scheme 18, $R^1 = t\text{-BuO}$, $R^2 = \text{NH}_2$).⁴³ The suggested mechanism for the epimerization of **158** under these conditions involves the formation and enolization of an oxazolone intermediate, similar to the racemization of amino acids during peptide synthesis.⁶⁵ In the case of **158**, the release of ring strain was proposed as a driving force for oxazolone formation.⁴³

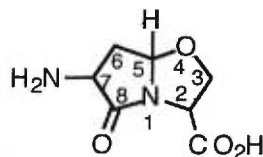
Scheme 19



Acid-induced epimerization was observed during the preparation of thiazabicyclo[5.4.0]alkane phthalimido ester **160**.⁴⁸ Treatment of pure ester **160** of either (2*S*, 6*S*, 10*S*)-, (2*R*, 6*S*, 10*S*)- or (2*R*, 6*R*, 10*S*)-configuration with *p*-toluenesulfonic acid in benzene at reflux for 2-4 h furnished a 10:30:<1:15 ratio of (2*S*, 6*S*, 10*S*)-, (2*R*, 6*S*, 10*S*)-, (2*R*, 6*R*, 10*S*)- and (2*S*, 6*R*, 10*S*)-diastereomers **160**. The mechanism for epimerization of **160** may involve enolization of an imino ester intermediate or equilibration of iminium ion intermediates under the acidic conditions as illustrated in Scheme 19.

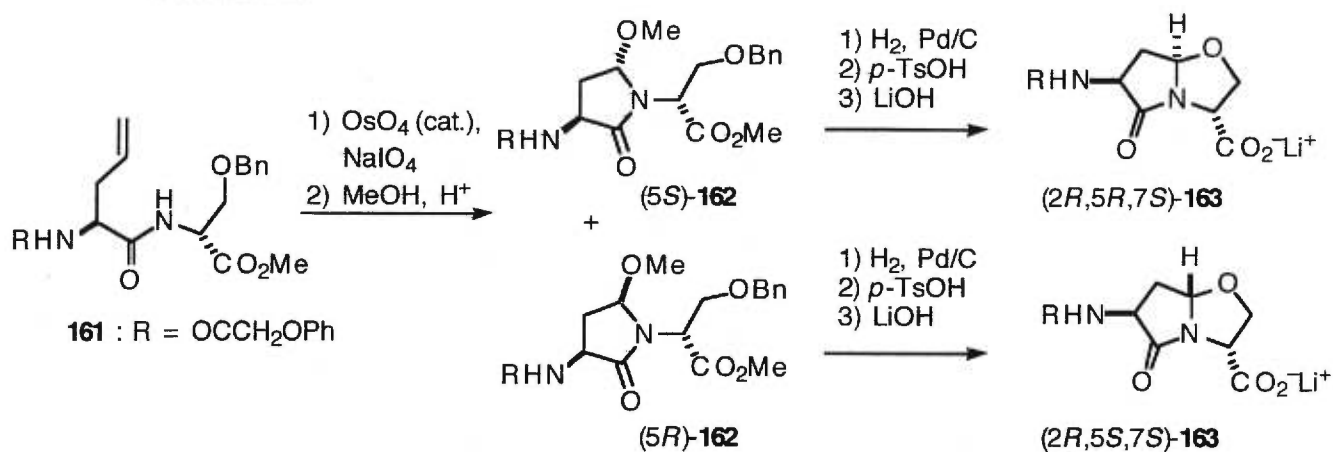
2.4 OXAZABICYCLOALKANE AMINO ACIDS

1. 5,5-Fused 1-Aza-8-oxobicycloalkane Amino Acids Encompassing Oxygen

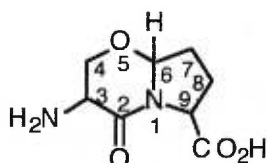


Interest in the synthesis of biologically active γ -lactam analogs of the β -lactam antibiotics led to the preparation of 5,5-fused azabicycloalkane amino acids encompassing oxygen.⁶⁶ Thus, *N*-phenoxyacetyl-(2*S*)-allylglycyl-D-(*O*-benzyl)serine methyl ester **161** was first oxidized with a combination of catalytic OsO₄ and NaIO₄ in dioxane/water followed by treatment with acidified methanol in order to provide a separable 3:1 mixture of diastereomeric methoxy lactams (5*S*)- and (5*R*)-**162** (Scheme 20). Hydrogenolysis of the benzyl ether and acid-catalyzed cyclization with inversion of configuration at the bridge-head center, followed by ester hydrolysis gave 5,5-fused bicyclic compounds (2*R*,5*R*,7*S*)- and (2*R*,5*S*,7*S*)-**163** as their lithium salts which did not exhibit antibiotic activity.

Scheme 20



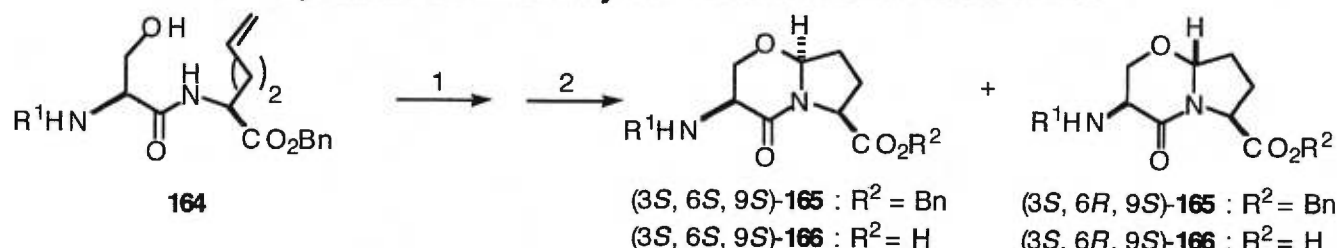
2. 5,6-Fused 1-Aza-2-oxobicycloalkane Amino Acids Encompassing Oxygen



In a related process, oxidative cleavage of *N*-acyl-*L*-serinyl-(2*S*)-but-3-enylglycine benzyl esters **164** followed by acid catalyzed cyclization gave 3-carbamato-5-oxaindolizidinone-9-carboxylates **165** in good to excellent yields (Table 3).^{67,68} The diastereoselectivity of the cyclization to form the bridgehead center was found to be influenced by the absolute configuration of the serine residue. For example, dipeptide **164** incorporating an *L*-serine provided a >8:1 ratio of (3*S*, 6*S*, 9*S*)- and (3*S*, 6*R*, 9*S*)-diastereomers **165**. Under the same conditions, dipeptide **164** with a *D*-serine residue gave a >7:1 ratio of diastereomers (3*R*, 6*R*, 9*S*)- and (3*R*, 6*S*,

9S)-**165**.⁶⁷ Major diastereomers (3S, 6S, 9S)-**165a** and (3S, 6S, 9S)-**165c** ($R^1 =$ Cbz and Fmoc) could be epimerized to (3S, 6R, 9S)-**165a** and (3S, 6R, 9S)-**165c** respectively on prolonged acid treatment ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$). Alkaline hydrolysis of (3S, 6S, 9S)-**165a** resulted in epimerization, such that *N*-protected oxazabicyclo[4.3.0]alkane amino acid (3S, 6S, 9S)-**166a** was accompanied by some of the diastereomeric acid (3R, 6S, 9S)-**166a** ($R^1 =$ Cbz).⁶⁷ Hydrogenolysis of benzyl esters **165b** and **165c** ($R^1 =$ Boc and Fmoc) gave diastereomerically pure *N*-protected amino acids **166b** and **166c** respectively.^{67,68}

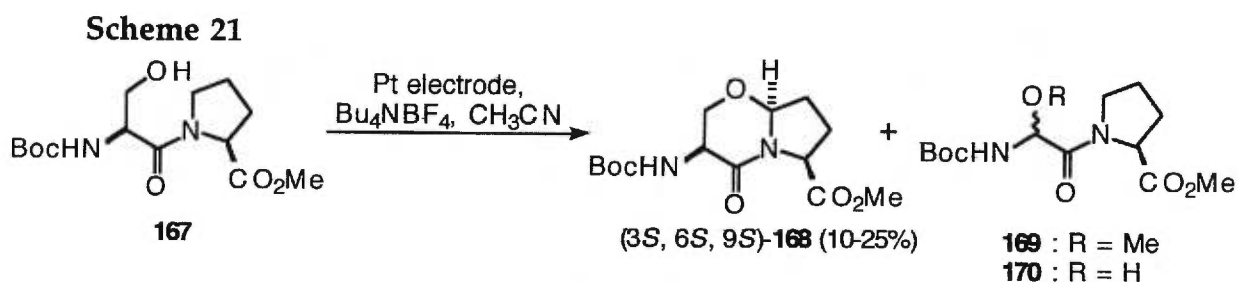
Table 3. Synthesis of Oxazabicycloalkane Amino Acid Esters 165.^{67,68}



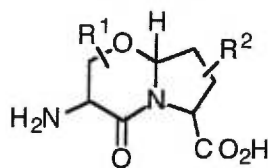
entry	R^1	1	2	%Yield	6S / 6R	Ref
a	Cbz	OsO_4 (cat.), NaIO_4 (2 eq.)	$\text{F}_3\text{CCO}_2\text{H}$ (cat.), CH_2Cl_2 , Δ	57	>8 / 1	67
b	Boc	OsO_4 (cat.), NaIO_4 (2 eq.)	$\text{F}_3\text{CCO}_2\text{H}$ (cat.), CH_2Cl_2 , Δ	77	10 / 1	67
c	Fmoc	O_3 , CH_2Cl_2 , -78°C ; Ph_3P	$\text{F}_3\text{CCO}_2\text{H}$ (cat.), CH_2Cl_2 , Δ	87	9 / 1	68

Electrochemical oxidation of *N*-Boc-L-serinyl-L-proline methyl ester **167** was recently used to generate the oxaindolizidinone ester (3S, 6S, 9S)-**168** in 15% yield on 10 mmol scale⁶⁹ in a diastereoselective fashion. The major drawback to the electrochemical oxidation was the cleavage of the hydroxymethyl side-chain of the serine residue of **167** which gave Boc- α -alkoxyglycylproline methyl esters **169**. Formation of **169** predominated

when the anodic amide oxidation was conducted in alcoholic solutions with tetrabutylammonium tetrafluoroborate as the electrolyte. Employment of dry acetonitrile as solvent was important to the cyclization; however, exclusion of water from the system was impossible and some Boc- α -hydroxyglycylproline methyl ester **170** was always isolated as a by-product⁶⁹ (Scheme 21).



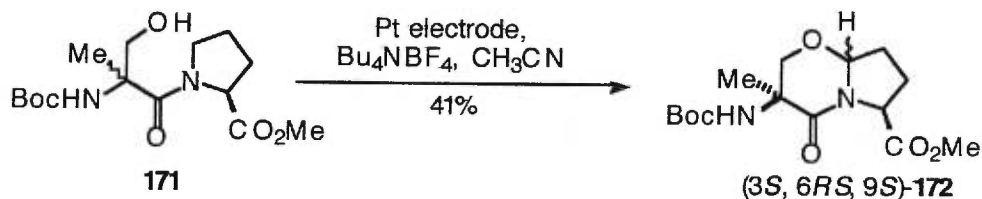
3. Substituted 5,6-Fused 1-Aza-2-oxobicycloalkane Amino Acids Encompassing Oxygen



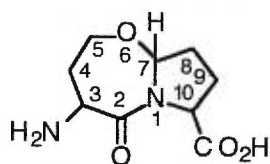
In an attempt to prepare oxaindolizidinone amino acids possessing a 3-methyl substituent, the electrochemical cyclization of *N*-Boc-(*RS*)- α -methylserinyl-*L*-proline methyl esters **171** yielded $(3S, 6RS, 9S)$ -methyl 3-methyl 3-*N*-(Boc)amino-5-oxaindolizidin-2-one-9-carboxylate **172** in 41% yield as a 6:4 mixture of diastereomers. However, this product was found

to be very acid labile and decomposed on treatment with dilute TFA⁶⁹ (Scheme 22).

Scheme 22

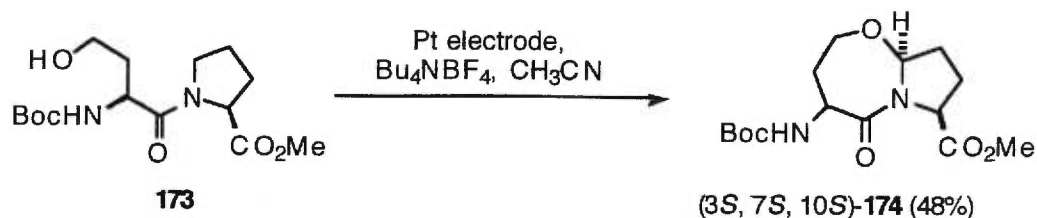


4. 5,7-Fused 1-Aza-2-oxobicycloalkane Amino Acids Encompassing Oxygen



Electrochemical oxidation of *N*-Boc-*L*-homoserinyl-*L*-proline methyl ester (*S,S*)-**173**, and *N*-Boc-*L*-homoserinyl-*D*-proline methyl ester (*S,R*)-**173**, proved effective for generating 5,7-fused 1-aza-2-oxobicycloalkane amino esters encompassing oxygen^{70,71} (Scheme 23). Bicyclic compounds (*3S, 7S, 10S*)-**174** and (*3S, 7S, 10R*)-**174** were obtained in 48% and 52% respective yields on 40 and 1 mmol scales respectively.^{70,71} In the synthesis of the 5,7-system, diminishing the current density from 19.5 mA/cm^2 to 6.9 mA/cm^2 augmented the yield of **174** from 21% to 48%. The diastereoselectivity in the cyclization was not influenced by the proline residue and peptide **173** with *S*-homoserine furnished the isomer

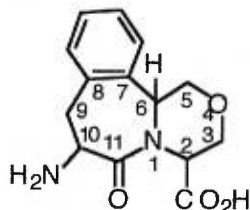
with an *S*-configuration at the bridgehead as the predominant product (>15:1).^{70,71}

Scheme 23

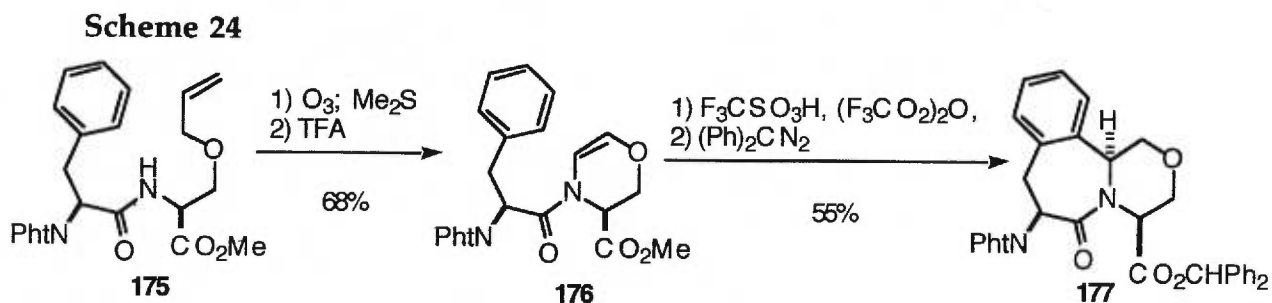
Exposure of *N*-(Boc)amino azabicycloalkane esters encompassing oxygen, 5,6- and 5,7-fused bicycles **168** and **174**, to TFA for 2 h at room temperature and to HF for 1 h at 0°C caused only deprotection of the Boc group without epimerization of the bridgehead stereocenter.^{69,70} In the presence of carbocation scavengers such as anisole and dimethylsulfide, HF deprotection was accompanied by the formation of side products that were presumed to result from ring opening of the bicyclic ring systems, and intermolecular trapping of the *N*-acyliminium ion.^{69,70} Because of the configurational lability of oxaindolizidinone amino acids under acidic conditions, the use of *N*-(Boc)amino acid **166b** was not ideal for peptide synthesis and *N*-(Fmoc)amino oxaindolizidinone acid **166c** was employed in the preparation of a leucine-enkephalin analog by solution-phase techniques.⁶⁸

5. 6,7-Fused 1-Aza-11-oxobicycloalkane Amino Acids

Encompassing Oxygen with Appended Aromatic Units

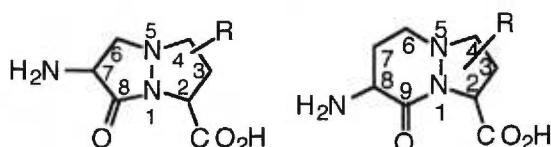


Intramolecular electrophilic addition of an acyliminium ion to an aromatic ring has been used to synthesize 6,7-fused 1-azaoxobicycloalkane amino acid encompassing oxygen. In this approach, *N*-phthalimido-*L*-phenylalaninyl-*L*-serine methyl ester was treated with allyl trichloroacetimidate to furnish the allyl ether **175**.⁷² Ozonolysis of **175** followed by acid-catalyzed cyclization afforded the morpholinoenamine derivative **176** (Scheme 24). Oxazatricycloalkane amino ester **177** was then synthesized via an acid catalyzed intramolecular acyliminium ion cyclization on **176** using conditions similar to those employed for the synthesis of azatricycloalkane amino acid **80** (Scheme 12). The methyl ester was solvolyzed during this procedure, and esterification of the tricyclic acid with diphenyldiazomethane led to the isolation of ester **177** in 55% yield after chromatography.⁷²



2.5 DIAZABICYCLOALKANE AMINO ACIDS

1 Substituted 5,5- and 5,6-Fused 1,5-Diazaobicycloalkene Amino Acids (Fused Pyrazolidinones and Pyridazinones)



The majority of the known diazabicycloalkane amino acid motifs incorporate generally the two ring nitrogens at the ring-junction sites, a feature which simplifies their synthesis. In the mid 1980's several research groups became interested in the possibility of utilizing 5,5-fused pyrazolidinones as constrained aza- γ -lactam mimics of the carbapenem class of antibacterial drugs. Several compounds of this type bearing electron-withdrawing appendages at C-3 have shown promising antibacterial properties.⁷³ Although their use as constrained dipeptide mimetics is limited by their instability towards basic hydrolysis of the amide,⁷⁴ their preparation and structural features are amenable towards their use as scaffolds for other purposes.

The first 5,5-fused pyrazolidinones synthesized harbored a carbonyl group at C-3 and a gem dimethyl group at C-4.⁷⁵ Their synthesis utilized a 1,3-dipolar cycloaddition reaction as the key ring forming step (Scheme 25).

Scheme 25

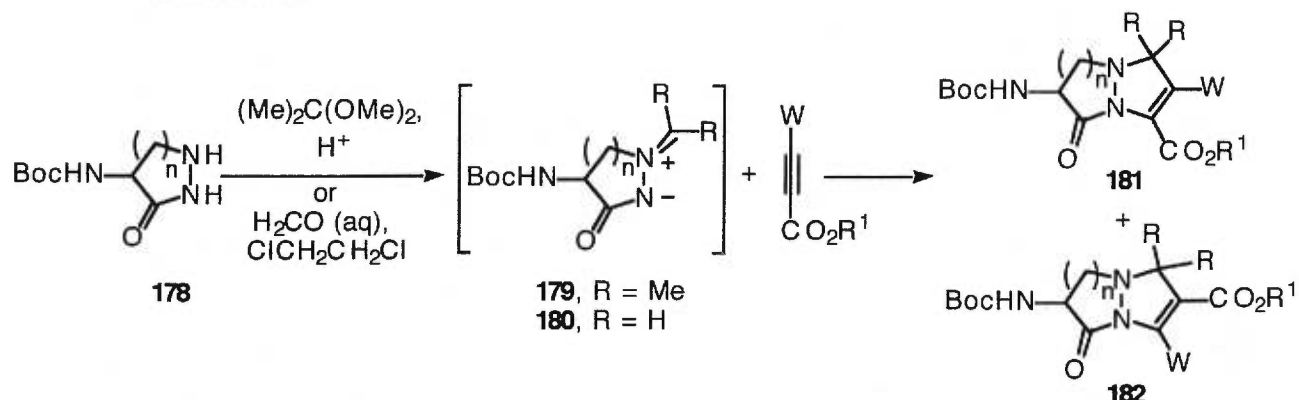
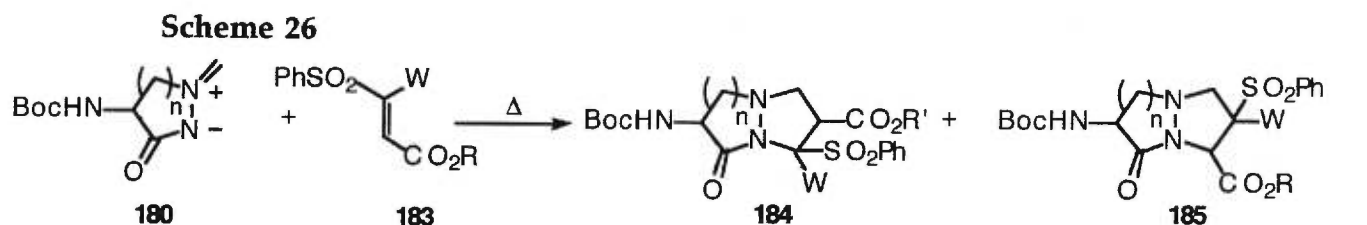


Table 4.

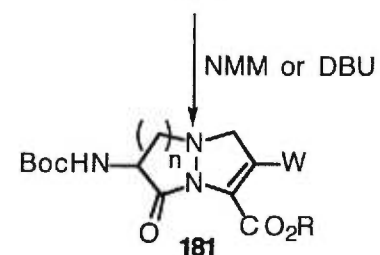
n	R	W	R ¹	Isolated products	% Yield	Ref
1	Me	CO ₂ allyl	allyl	181 = 182	67	76
1	H	CO ₂ Me	Me	181 = 182	88	77
1	H	H	allyl	182	23	77
1	H	COMe	allyl	2:3;181:182	26	77
1	H	CO ₂ allyl	allyl	181 = 182	49	75
1	H	CH ₂ OTHP	allyl	182	10	77
1	H	Ph	allyl	182	10	77
1	H	CO ₂ Me	allyl	1:1;181:182	38	77
2	H	CO ₂ allyl	allyl	181 = 182	17	83

The starting pyrazolidinone template **178** ($n = 1$) was readily prepared in 2 steps from *N*-(Boc)serine methyl ester in 60% yield. Treatment of **178** with 2,2-dimethoxypropane and a catalytic amount of acid in boiling methanol afforded ylide **179** in quantitative yield after recrystallization. Prolonged exposure of **179** to diallyl acetylene dicarboxylate in CH₂Cl₂ at ambient temperature gave the racemic bicyclic system **181** (R = Me, W = CO₂allyl, R¹ = allyl) in 67%. Similarly, the addition of aqueous formaldehyde to **178** provided azomethine imine ylide **180**, which could not be isolated and was directly heated with acetylene dicarboxylates in 1,2-dichloroethane to furnish 5,5-fused

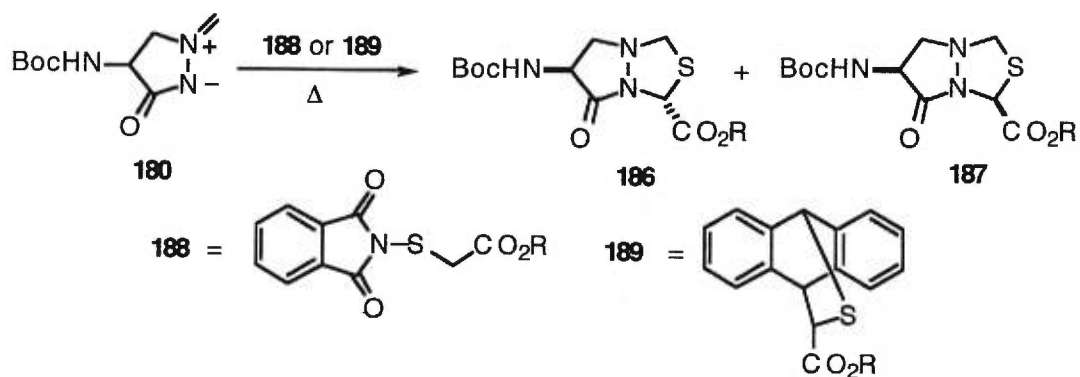
pyrazolidinones **181** (R = H, Table 4).⁷⁶ Because of the instability of the amide towards base, the exocyclic amine was typically protected as a Boc derivative and the carboxylates were introduced as either their *tert*-butyl or allyl esters. When unsymmetrical dipolarophiles were employed,⁷⁷ regioisomeric mixtures of bicyclic products were usually obtained, the desired regioisomer often being the minor product (Table 4). This problem could be overcome by the use of phenyl vinyl sulfones as the acetylenic equivalent in the 1,3-dipolar cycloaddition step (Scheme 26).⁷⁸ For example, (*E*)-substituted phenyl vinyl sulfones **183** reacted with **180** in refluxing 1,2-dichloroethane to give predominantly the desired bicyclic compound **185** (>95:5). On the other hand, (*Z*)-substituted phenyl vinyl sulfones gave the undesired regioisomer **184**. Base-promoted elimination of the sulfonyl moiety in **187** using *N*-methylmorpholine or DBU at 0 °C afforded the unsaturated product **181** in moderate yields (21-61%, Table 5). In practice, ylide formation, 1,3-dipolar cycloaddition, and alkene formation were typically performed without purification of the intermediates. Enantiomerically pure 5,5-fused pyrazolidinones⁷⁸ have been prepared starting with enantiopure forms of the pyrazolidinone template **178**.⁷⁹ *N*-Methylmorpholine was used for the elimination of the sulfonyl group in these cases because DBU caused racemization.

**Table 5.**

n	W	R	% Yield of 181 ^a	Ref
1	CO ₂ Me	allyl	47	83
1	CO ₂ Me	allyl	61	83
1	COMe	<i>t</i> -Bu	32	83
1	COCO ₂ Et	allyl	38	83
1	CN	<i>t</i> -Bu	44	83
1	H	allyl	49	83
2	COMe	allyl	21	78

^a overall yield from **180**

A related 1,3-dipolar cycloaddition reaction has been used to regioselectively obtain the 2-thia-analogs⁸⁰ **186** and **187** (Scheme 27). Treatment of **180** with a catalytic amount of NMM followed by the dropwise addition of a thioaldehyde precursor, **188** or **189**, and heating at reflux in 1,2-dichloroethane furnished in 65% yield a 3:1 mixture of diastereoisomers **186** and **187** which could be separated.

Scheme 27

An intramolecular Horner-Wadsworth-Emmons reaction⁸¹ has been used in a “one-pot” preparation of C-3-substituted 5,5-fused pyrazolidinones (Scheme 28).⁸² Treatment of α -substituted phosphonate esters **190** with acetic anhydride and tetramethyl diaminomethane gave vinyl phosphonates **191** that were immediately reacted with the pyrazolidinone **178** to afford selectively the Michael adduct **192**. Subsequent addition of an oxalyl chloride mono-ester and Hünig’s base gave the acylated intermediate **193** which cyclized to **181** (Scheme 28, Table 6).

The above mentioned strategies in Schemes 25-28 have been successfully employed for the preparation of the corresponding 5,6-analogs (see Tables 4-6).⁸³

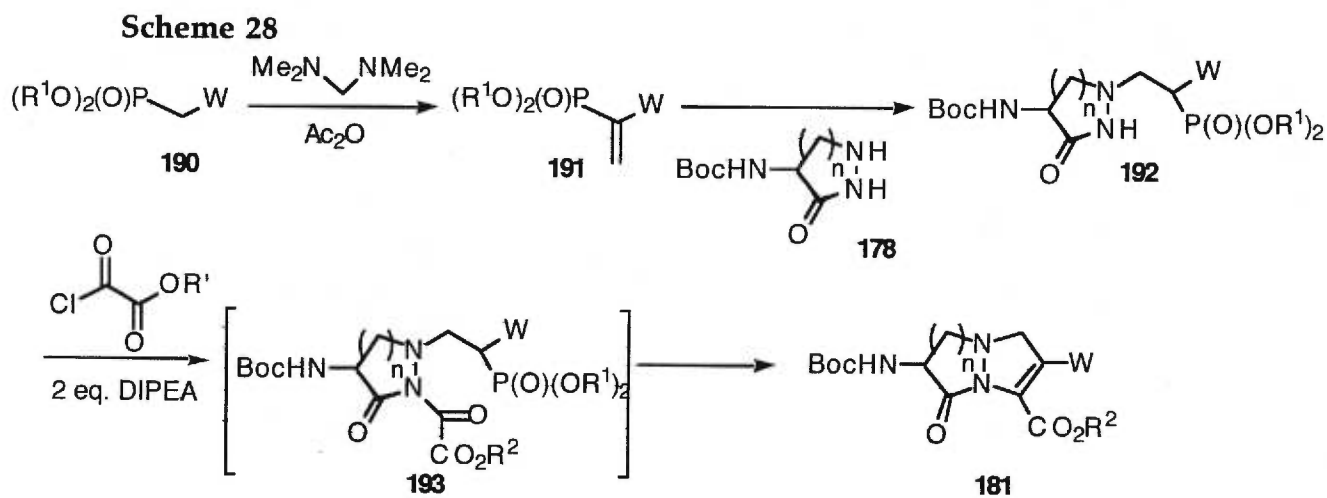
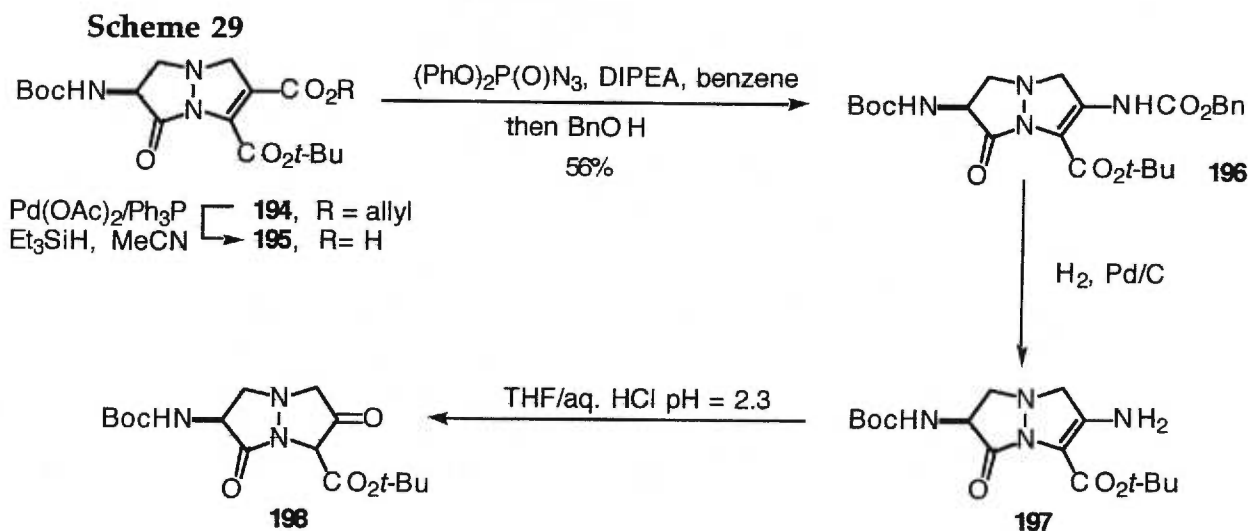


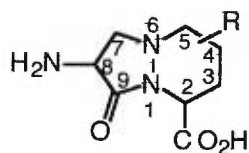
Table 6.

n	W	R ²	% Yield of 181	Ref
1	CO ₂ allyl	<i>t</i> -Bu	58	85
1	CN	allyl	25	82
1	CO ₂ Et	allyl	20	86
1	CO ₂ Ph	allyl	63	86
1	COEt	allyl	6	86
1	CN	allyl	28	86
1	SO ₂ Me	allyl	35	86
2	CN	allyl	11	83

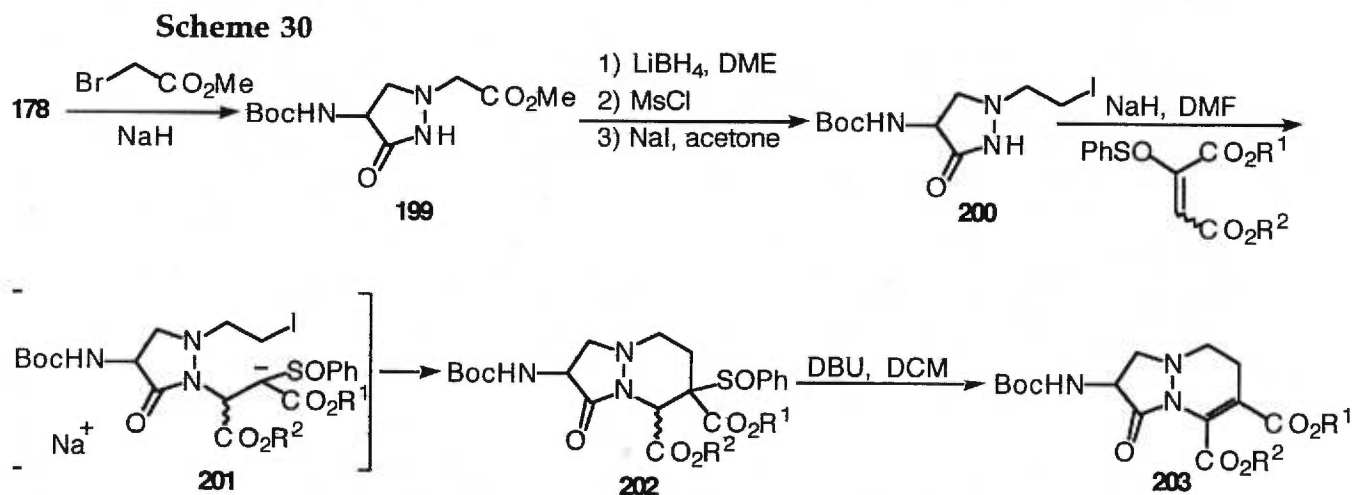
A noteworthy means to modify C-3 involves a selective Curtius rearrangement⁸⁴ of the C-3 carboxylate (Scheme 29).⁸⁵



2. Substituted 5,6-Fused 1,6-Diaza-9-oxobicycloalkene Amino Acids (5,6-Fused Pyrazolidinones)



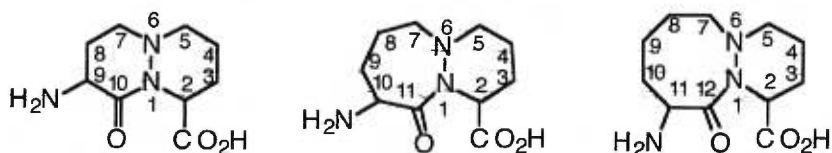
Synthesized initially as core analogues of the cephalosporin class of antibacterial agents, the 5,6-fused 1,6-diaza-9-oxobicycloalkene amino acid derivatives were found to be less active than their corresponding 5,5-fused systems (section V.1). Their syntheses proceed generally via a selective chain extension from the amine group of pyrazolidinone **178** followed by a ring annulation utilizing an acetylene equivalent (Scheme 30).⁸⁶



For example, alkylation of **178** with methyl bromoacetate afforded **199** in 36% yield, which was subsequently converted into the primary iodide **200**. Treatment with NaH in DMF followed by the addition of a

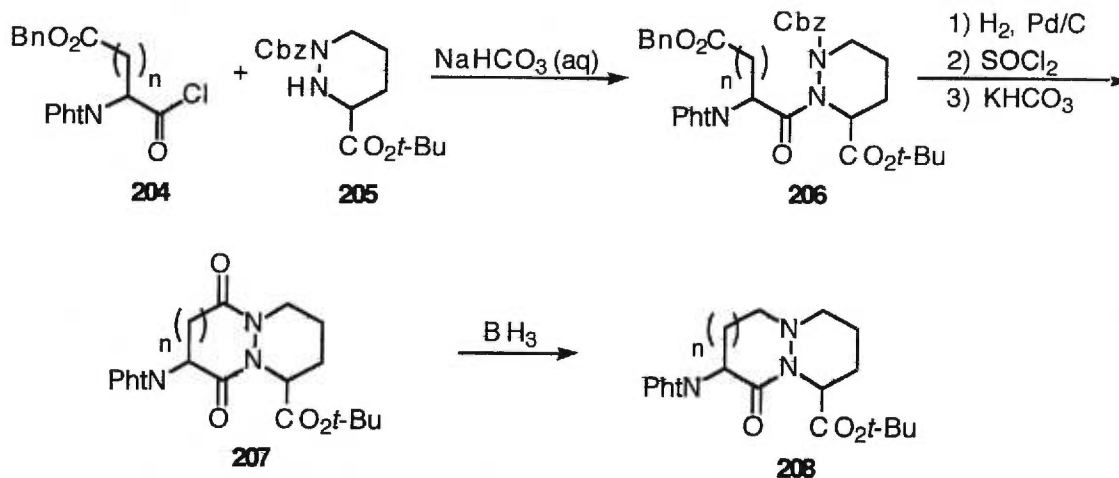
phenyl vinyl sulfoxide led to a regioselective Michael addition resulting in stabilized anion intermediate **201**, which upon intramolecular displacement of the iodide furnished a diastereomeric mixture of bicyclic products **202**. Base-induced elimination of phenylsulfonic acid afforded the desired bicycloalkene amino ester **203** in 36% overall yield from **200**.

3. 6,6-, 6,7- and 6,8-Fused 1,6-Diazaoxobicycloalkane Amino Acids (6,6-, 6,7- and 6,8-Pyridazine Based Structures)



Designed and synthesized to act as conformationally restrained analogues of the angiotensin converting enzyme inhibitors Captopril and Enalapril,⁸⁷ these diazabicyclo[X.Y.0]alkane amino acids possess a hexahydropyridazine fused either to an appropriately functionalized tetrahydropyridazinedione, hexahydro[1,2]diazepinedione or octahydro[1,2]diazocanedione. These systems are prepared in the same general manner, via the condensation of an α -aminodicarboxylate and a protected hexahydropyridazine-3-carboxylate (piperazic acid, Scheme 31).

Scheme 31

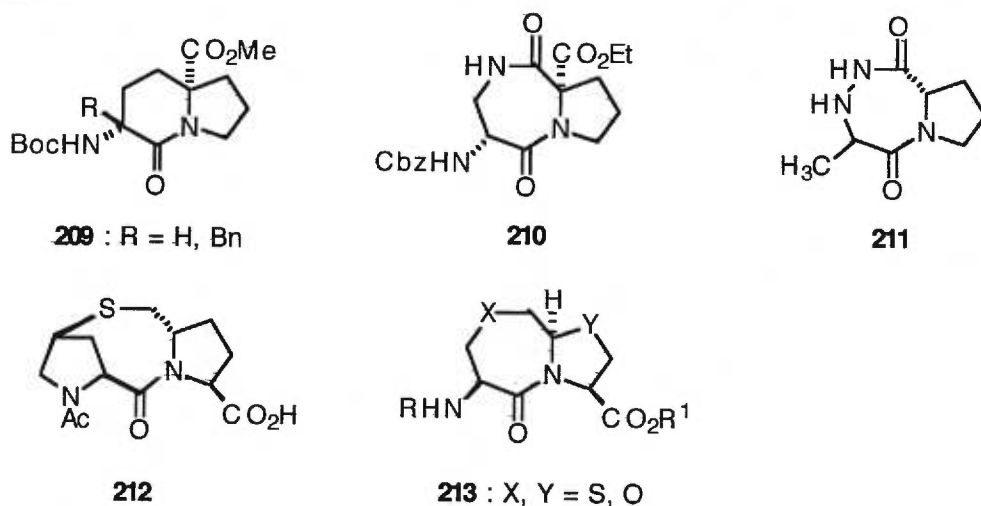


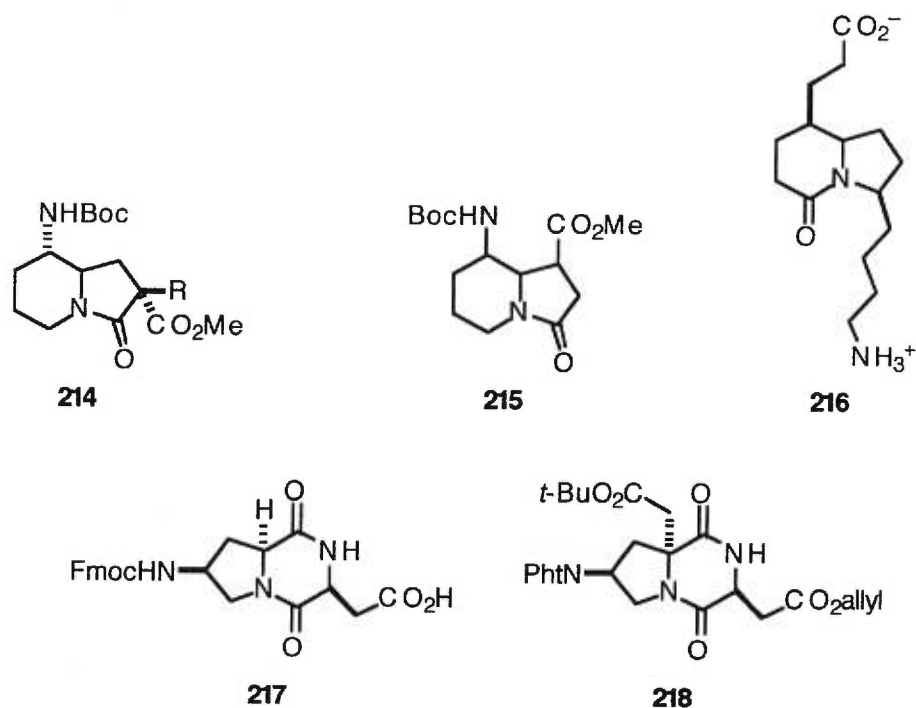
N-Acylation of *N'*-(Cbz)piperazate **205** with ω -benzyl aspartic, glutamic or α -aminoadipic α -acid chlorides **204** furnished amides **206**. Deprotection of the benzyl and Cbz groups via hydrogenolysis, generation of the corresponding acid chloride and treatment with aqueous KHCO_3 afforded bicyclic compounds **207** with yields above 70%. The corresponding mono-oxo systems **208** were obtained in excellent yields (>90%) by selective reduction of the less hindered lactam using borane in THF.⁸⁷ The use of enantiopure starting materials has led to the efficient preparation of numerous chiral, non-racemic 6,6-, 6,7- and 6,8-pyridazino based bicyclic systems of this type in multigram quantities.

2.6 MISCELLANEOUS EXAMPLES

Mimetics of other peptide structures have been based on related azacycloalkane amino acid motifs (Figure 6). For example, indolizidinone amino acid **209**,⁸⁸⁻⁹⁰ 5,7-fused diazabicycloalkane amino acid **210**,⁹¹ and 5,7-fused triazabicycloalkane amino acid **211**,⁹² all have been synthesized to serve as mimetics of X-Pro *cis*-amide rotamers and type IV β -turns. Tricyclic-dipropyl structure **212** has been used as a template for α -helix induction.⁹³ In addition, several 5,7-fused azabicycloalkane amino acid analogs **213** have been synthesized that encompass two heteroatoms in the ring system.⁹⁴ Finally, some representative structures of other 5,6-fused bicyclo motifs **214-218**,⁹⁵⁻⁹⁷ that do not encompass the Ala-Pro type dipeptide mimic simulated by the corresponding indolizidinone prototype (Section II.1), have been included in this Report as examples of interesting bicyclic amino acid scaffolds (Figure 6).

Figure 6





2.7 PERSPECTIVES

Our knowledge of the relationship between structure, function and conformation of natural peptides and proteins is steadily growing and has shown that among these molecules, enzymes and protein receptors play primordial roles in physiological events that bear directly on life processes. Understanding of the interactions of peptide structures at the molecular level is now essential for tackling any therapeutically relevant area of drug design. In this regard, the vast majority of peptide-based interactions with peptidic substrates are ultimately translated into non-peptidic counterparts often called peptidomimetics. In this Report, we have addressed the

synthesis of bicyclic amino acid motifs that may be used as scaffolds upon which pharmacologically relevant groups can be appended. Alternatively, the motifs can be utilized as conformationally constrained entities that mimic parts of natural peptidic substrates. These templates in which the peptide backbone geometry and side-chain functionality are restrained in bicycloalkane ring systems have already found important use as antibacterials and as constituents of metalloprotease inhibitors. Their incorporation into larger structures has given fundamental insight of the mechanism of action of relevant biologically active peptides and proteins. Future developments in this area of peptide mimicry should lead to both greater understanding of protein biochemistry as well as novel drug candidates for a variety of pathological and therapeutic indications.

The medicinal chemist's role is more crucial than ever, especially in the advent of combinatorial methods for drug discovery and lead optimization. Biologically active molecules of a peptidic nature will ultimately require "redesigning" into structural types that are metabolically stable while maintaining their biological activities. The initial objectives in drug design reside in achieving better binding to specific receptors, and more potent inhibition of target enzymes. While the structures covered in this review may be distant from such noble goals at first glance, it is our hope that they can be cleverly and beneficially used to design new medicinal agents.[†]

2.8 ABBREVIATIONS

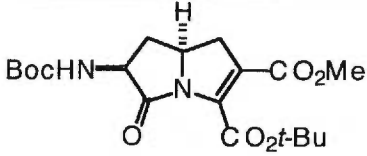
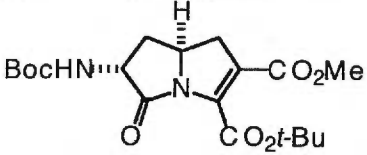
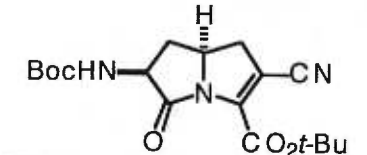
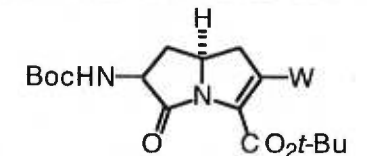
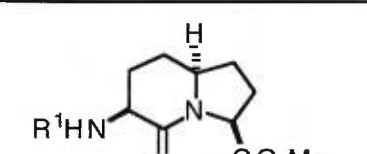
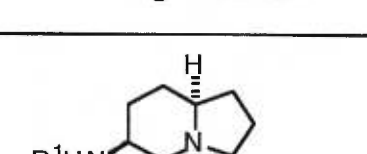
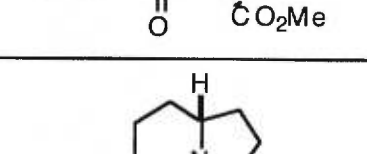
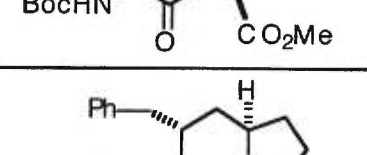
Ac	Acetyl
ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
ADTN	2-Amino-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene
Boc	<i>tertiary</i> -Butyloxycarbonyl
Bn	Benzyl
Bz	Benzoyl
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CoA	Co-enzyme A
COSY	Correlated Spectroscopy
DBU	Diazabicyclo[5.4.0]undecene
DCM	Dichloromethane
DIPEA	<i>N-N</i> -Diisopropylethylamine
DMB	Dimethoxybenzyl
EPPA	D-2-(4-Ethyl-2,3-dioxopiperazin-1-ylcarbonylamino)-2-phenylacetic acid
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
NEP	Neutral endopeptidase
NK-2	Neurokinin-2 receptor
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholine
nOe	Nuclear Overhauser Effect
OTMS furan	2-(Trimethylsilyloxy)furan
Pht	Phthalimido
PNB	<i>p</i> -Nitrobenzyl

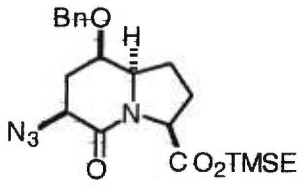
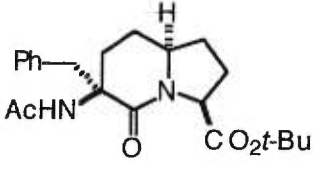
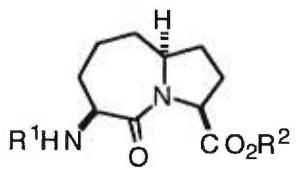
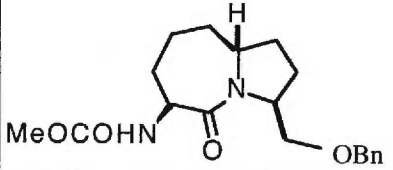
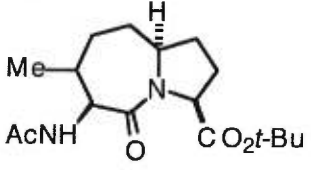
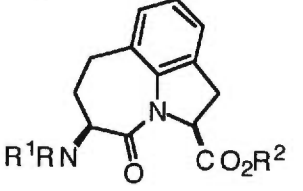
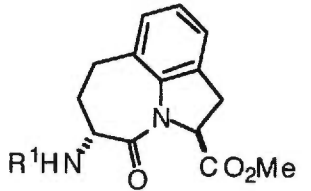
PNZ	p-Nitrobenzyloxycarbonyl
ROESY	Rotational-frame Overhauser Enhancement Spectroscopy
TBDMS	<i>tertiary</i> -Butyldimethylsilyl
TBDPS	<i>tertiary</i> -Butyldiphenylsilyl
TMSE	Trimethylsilylethyl

2.9 TABULAR SUMMARY OF AZABICYCLOALKANE AMINO ACIDS AND DERIVATIVES

The following tabular summary has been ordered in the same general manner as the preceding text, i.e. the compounds are categorized as carbo-, thio-, oxa- and diaza-bicycloalkane amino acids in that order, and generally arranged from the smallest bicyclic system to the largest, in that particular series.

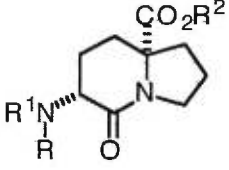
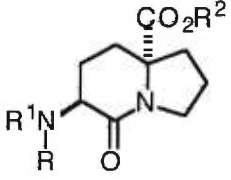
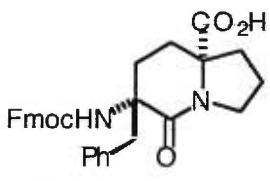
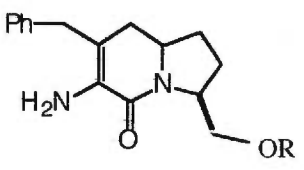
Type	Compounds	Comments	References
4,5-fused		X-ray of the PhOCH ₂ CO- derivative Designed as a β -lactam analog. No significant antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative organisms nor β -lactamase 1 (from <i>Bacillus cereus</i>).	37
4,5-fused		Designed as a β -lactam analog. Antibacterial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria.	30b 39
5,5-fused		X-ray of the C-3 alcohol derivative. Designed as a β -lactam analog. No significant antibacterial nor β -lactamase inhibitory activity.	31 32
5,5-fused		Designed as a β -lactam analog. No significant antibacterial nor β -lactamase inhibitory activity.	31 32
5,5-fused		R ¹ = PNZ, R ² = Ac R ¹ = Boc, R ² = PNZ Designed as β -lactam analogs. Antibacterial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria.	36
5,5-fused		Designed as a β -lactam analog. Antibacterial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria.	36
5,5-fused		Designed as a β -lactam analog. Antibacterial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria.	36

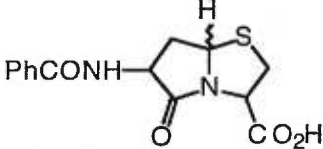
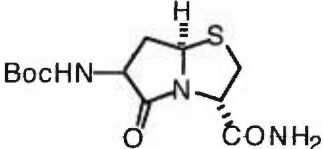
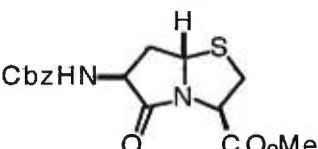
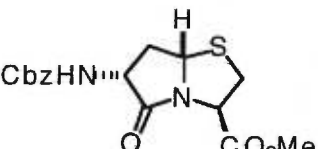
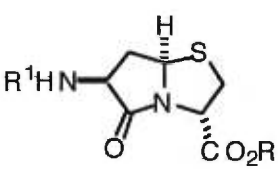
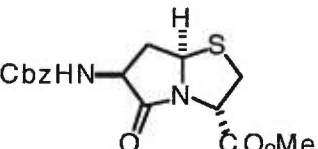
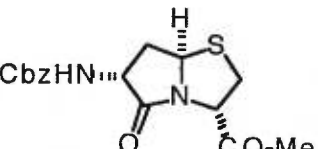
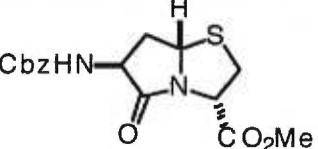
Type	Compounds	Comments	References
5,5-fused		Designed as a β -lactam analog. No activity against <i>E. Coli</i> X161 and X850.	33
5,5-fused		Designed as a β -lactam analog. No activity against <i>E. Coli</i> X161 and X850.	33
5,5-fused		Designed as a β -lactam analog. No activity against <i>E. Coli</i> X161 and X850.	33
5,5-fused		W = CO ₂ Me, CN, SEt, SOEt, SO ₂ Et W = SEt (α/β 2:3) Designed as β -lactam analogs.	34 30 34
5,6-fused		R ¹ = Boc, X-ray analysis, nOe experiments R ¹ = Cbz Designed as a type II' β -turn mimetic. Introduced into a Gramicidin S analog exhibiting antibacterial activity.	10 9 10b,e
5,6-fused		R ¹ = Boc, nOe experiments R ¹ = Cbz (racemic)	10 9
5,6-fused		Designed as a type II' β -turn mimetic.	10
5,6-fused		Selective antagonist for the NK-2 receptor.	11

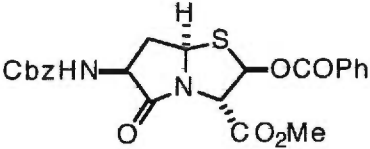
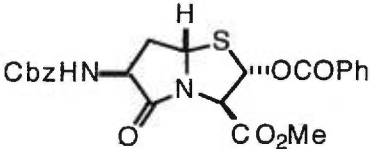
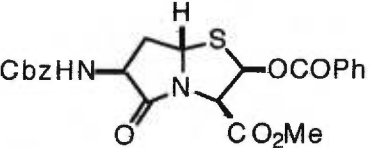
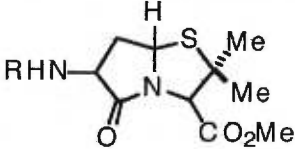
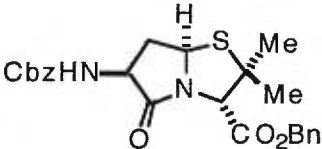
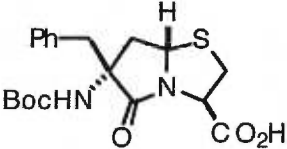
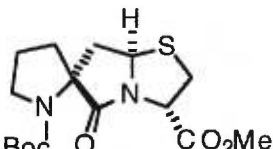
Type	Compounds	Comments	References
5,6-fused		Intermediate in the production of a selective antagonist for the NK-2 receptor.	13
5,6-fused			20
5,7-fused		R ¹ = Ac, R ² = <i>t</i> -Bu R ¹ = Ac, R ² = Me, X-ray analysis R ¹ = Pht, R ² = Me, nOe experiments R ¹ = H, R ² = Me Designed for use in metalloprotease inhibitors (ACE/NEP).	20, 16 20, 16 19, 28 18
5,7-fused		X-ray analysis.	18
5,7-fused			20
5,7-fused		R = R ¹ = Pht, R ² = Et R = H, R ¹ = Ac, R ² = Me R = H, R ¹ = COCF ₃ , R ² = Me, X-ray analysis. Designed for use in metalloprotease inhibitors (ACE/NEP).	28, 25 24 24
5,7-fused		R ¹ = COCF ₃ , R ¹ = H, X-ray analysis Designed for use in metalloprotease inhibitors (ACE/NEP).	24

Type	Compounds	Comments	References
5,8-fused		Designed for use in metalloprotease inhibitors (ACE).	18
5,8-fused		Designed for use in metalloprotease inhibitors (ACE).	18
5,6-fused		R ¹ = Cbz, R ² = Me R ¹ = Boc, R ² = Me R ¹ = Cbz, R ² = Bn, nOe experiments Designed as a type II' β-turn mimetic. Introduced into GS analog.	27
5,6-fused		R ¹ = Cbz, R ² = Me R ¹ = Boc, R ² = Me R ¹ = Cbz, R ² = Bn, nOe experiments Designed as a type II' β-turn mimetic. Introduced into GS analog.	27
6,7-fused		X-ray analysis Designed for use in metalloprotease inhibitors (ACE).	19
6,7-fused		R = R ¹ = Pht R = R ¹ = H, X-ray analysis Designed for use in metalloprotease inhibitors (ACE).	28, 25
6,7-fused		Designed for use in metalloprotease inhibitors (ACE).	28, 25

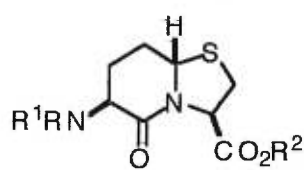
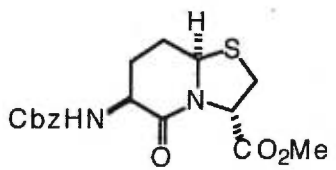
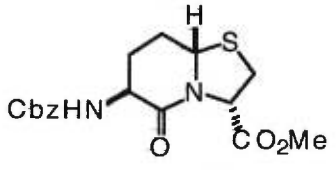
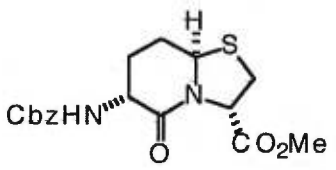
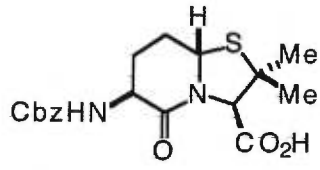
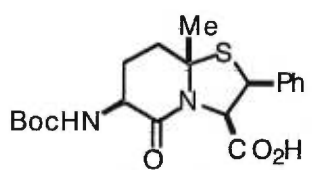
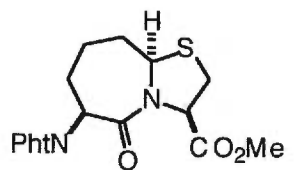
Type	Compounds	Comments	References
6,7-fused		X-ray analysis Designed for use in metalloprotease inhibitors (ACE/NEP).	26
6,7-fused		X-ray analysis Designed for use in metalloprotease inhibitors (ACE/NEP).	23
6,7-fused		Designed for use in metalloprotease inhibitors (ACE/NEP).	28
6,7-fused		Designed for use in metalloprotease inhibitors (ACE/NEP).	28
6,7-fused		Designed for use in metalloprotease inhibitors (ACE/NEP).	28

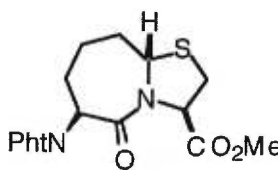
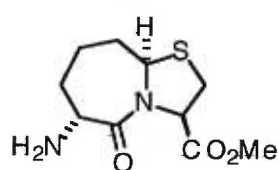
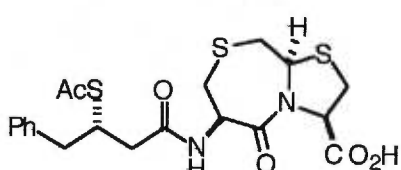
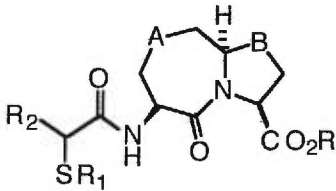

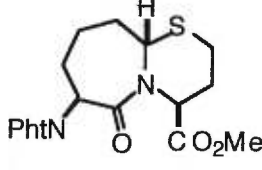
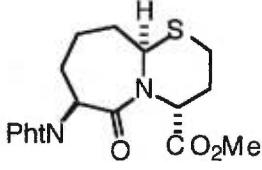
Type	Compounds	Comments	References
5,6-fused		<p>R = H, R¹ = Boc R² = Me, X-ray analysis.</p> <p>R = Boc, R¹ = NHBoc, R² = <i>t</i>-Bu 1:9 mixture of diastereoisomers at C-3</p> <p>R = H, R¹ = Fmoc, R² = H Designed as a type VI β-turn mimetic.</p>	88 88, 90 88, 90
5,6-fused		<p>R = Boc, R¹ = NHBoc, R² = <i>t</i>-Bu 9:1 mixture of diastereoisomers at C-3</p> <p>R¹ = Fmoc, R = R² = H ROESY experiments Designed as a type VI β-turn mimetic.</p>	88, 90
5,6-fused		<p>Designed as a type VI β-turn mimetic.</p>	90
5,6-fused		<p>R = TBDMS, Me</p>	17

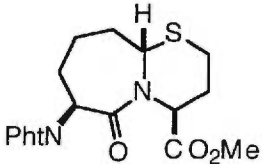
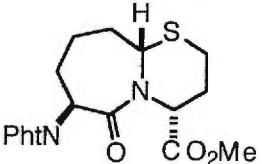
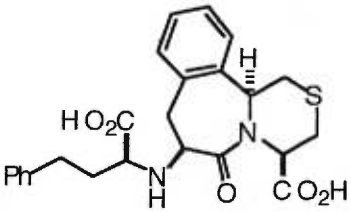
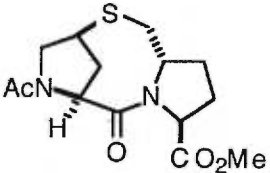
Type	Compounds	Comments	References
5,5-fused		Designed as a β -lactam analog. No significant antibiotic nor β -lactamase inhibitory activity.	40
5,5-fused		9(<i>R</i>):1(<i>S</i>) mixture of diastereoisomers nOe and NOESY experiments Designed as a type-II β -turn mimetic. In a derivative, it increased the binding of receptor agonist ADTN to the dopamine receptor.	43
5,5-fused		nOe experiments Designed as a β -lactam analog.	44 49 50
5,5-fused		nOe experiments Designed as a β -lactam analog.	44
5,5-fused		$R^1 = \text{Cbz}, R^2 = \text{Me}$, nOe experiments $R^1 = \text{Boc}, R^2 = \text{H}$ Designed as a β -lactam analog. No biological activity against <i>S. aureus</i> .	44 49
5,5-fused		nOe experiments Designed as a β -lactam analog.	44
5,5-fused		nOe experiments Designed as a β -lactam analog.	44
5,5-fused		nOe experiments Designed as a β -lactam analog.	49

Type	Compounds	Comments	References
5,5-fused		Designed as a β -lactam analog.	44 50
5,5-fused		3(<i>S</i>):1(<i>R</i>) mixture of diastereoisomers at C-3. Designed as a β -lactam analog.	44 50
5,5-fused		1(<i>R</i>):3(<i>S</i>) mixture of diastereoisomers at C-3. Designed as a β -lactam analog.	44 50
5,5-fused		R = CPh and Bn Designed as a β -lactam analog. No significant antibiotic nor β -lactamase inhibitory activity.	40
5,5-fused		Designed as a β -lactam analog.	63
5,5-fused		nOe experiments. Designed as a β -lactam analog.	61
5,5-fused		nOe experiments. Designed as a type II β -turn mimetic. In a derivative, it increased the binding of receptor agonist ADTN to the dopamine receptor.	53 62

Type	Compounds	Comments	References
5,5-fused		Designed as a type II' β -turn mimetic.	98
5,5-fused		1:1 mixture of diastereoisomers at C-5. Designed as a β -lactam analog. Weak biological activity against <i>S. aureus</i> .	34 44 50
5,5-fused		3(<i>S</i>):1(<i>R</i>) mixture of diastereoisomers at C-3. NOESY experiments. Designed as a β -lactam analog. No antibacterial nor β -lactamase inhibitory activity.	44
5,5-fused		3.75(<i>R</i>):1(<i>S</i>) mixture of diastereoisomers at C-7. Designed as a β -lactam analog. Low activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria.	51
5,5-fused		R = Me, CH ₂ OAc, CO ₂ Me Racemic and optically active. Designed as β -lactam analogs.	30a 30b 34
5,5-fused		R = Me, CH ₂ OAc, CO ₂ Me. Racemic. Designed as β -lactam analogs.	30a 30b 34
5,5-fused		1(<i>cis</i>):3(<i>trans</i>) mixture of diastereoisomers. Designed as a β -lactam analog.	52

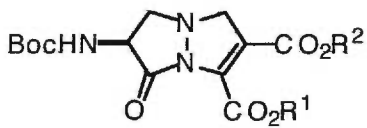
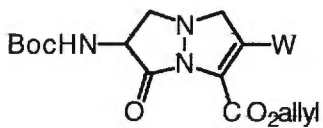
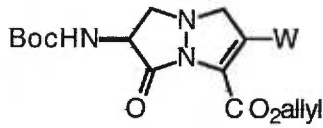
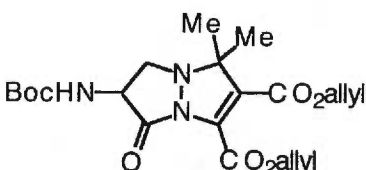
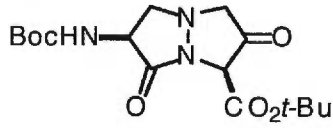
Type	Compounds	Comments	References
5,6-fused		$R^1 = \text{Boc}, R = R^2 = \text{H}$, X-ray analysis $R, R^1 = \text{Pht}, R^2 = \text{H}$ $R^1 = \text{Fmoc}, R = R^2 = \text{H}$ $R^1 = \text{Cbz}, R = \text{H}, R^2 = \text{Me}$ nOe experiments. Designed as a type II' β -turn mimetic. Diverse biological applications.	41 55 46
5,6-fused		Designed for use in an analog of CsA.	47
5,6-fused			47
5,6-fused		nOe experiments. Designed as a type II β -turn. Used in Tendamistat analogs.	43 46
5,6-fused			55 56
5,6-fused		Designed for use in a Dermorphine analog.	55 64
5,7-fused		1:1 mixture of diastereoisomers at C-5 X-ray analysis. Designed for use in metalloprotease inhibitors (ACE).	18 60 42

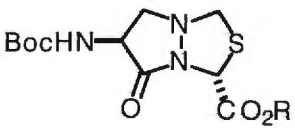
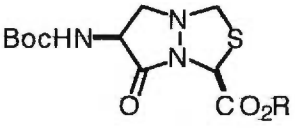
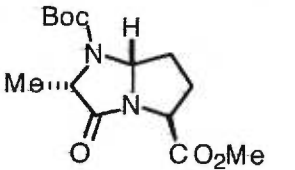
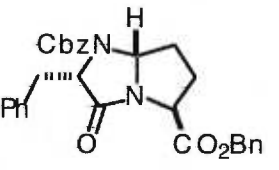
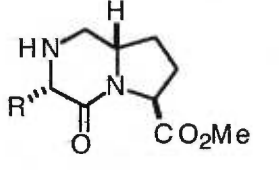
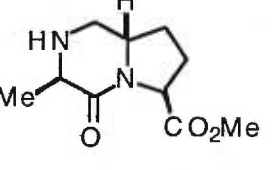
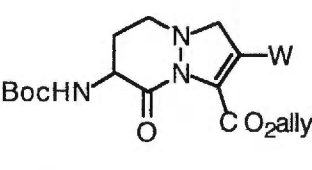
Type	Compounds	Comments	References
5,7-fused		1:1 mixture of diastereoisomers at C-5. Designed for use in metalloprotease inhibitors (ACE).	18 60 42
5,7-fused		Designed for use in metalloprotease inhibitors (ACE).	60
5,7-fused		Designed for use as a metalloprotease inhibitor (ACE).	94
5,7-fused		R = H, alkyl, ArY, CH ₂ OCH ₂ CCMe ₃ , Ph ₂ CH R ₁ = H, Ac, PhCO, CH ₂ O ₂ CCMe ₃ , Q ₁ R ₂ = H, alkyl, CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OMe, ArY A = CH ₂ , O, S B = S, O ArY = (substituted) arylalkyl Q ₁ = COCH ₂ -Morpholine Designed for use in metalloprotease inhibitors (ACE/NEP).	94
5,6-fused		Designed as a β-lactam analog.	30a
5,7-fused		nOe and COSY experiments. Designed for use in metalloprotease inhibitors (ACE/NEP).	48
5,7-fused		Designed for use in metalloprotease inhibitors (ACE/NEP).	48

Type	Compounds	Comments	References
6,7-fused		Designed for use in metalloprotease inhibitors (ACE/NEP).	48
6,7-fused			48
6,7-fused		Designed for use as a metalloprotease inhibitors (ACE).	72
5,8,5-fused		X-ray of the acid derivative. Designed as a template for α -helix formation.	93

Type	Compounds	Comments	References
5,5-fused		Designed as a β -lactam analog. Inactive against <i>S. aureus</i> NCTC-6571.	66
5,5-fused		Design as a β -lactam analog. Inactive against <i>S. aureus</i> NCTC-6571.	66
5,6-fused		$R^1 = \text{Cbz}, R^2 = \text{Bn}$, nOe experiments. >8:1 mixture of diastereoisomers at C-6. $R^1 = \text{Boc}, R^2 = \text{Bn}$, 10:1 mixture of diastereoisomers at C-6. $R^1 = \text{Boc}, R^2 = \text{Me}$, nOe experiments. $R^1 = \text{Fmoc}, R^2 = \text{Bn}$, 9 : 1 mixture of diastereoisomers at C-6. Designed as a β -turn mimetic.	67 67 69 68
5,6-fused		$R^1 = \text{Cbz}, R^2 = \text{Bn}$, nOe experiments 1:>8 mixture of diastereoisomers at C-6. $R^1 = \text{Boc}, R^2 = \text{Bn}$, 1:10 mixture of diastereoisomers at C-6. $R^1 = \text{Fmoc}, R^2 = \text{Bn}$, 1:9 mixture of diastereoisomers at C-6. Designed as a β -turn mimetic.	67 67 68
5,6-fused		$R^1 = \text{Cbz}$, X-ray analysis, nOe experiments. >10:1 mixture of diastereoisomers at C-6. $R^1 = \text{Boc}$, >7:1 mixture of diastereoisomers at C-6.	67
5,6-fused		$R^1 = \text{Cbz}$, nOe experiments 1:>10 mixture of diastereoisomers at C-6. $R^1 = \text{Boc}$, 1:>7 mixture of diastereoisomers at C-6.	67

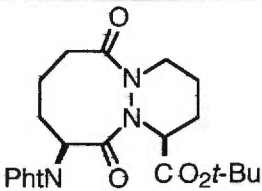
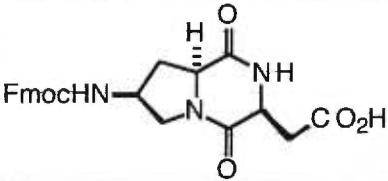
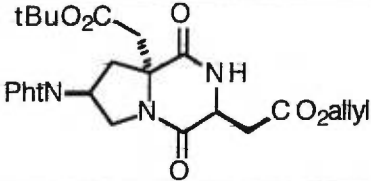
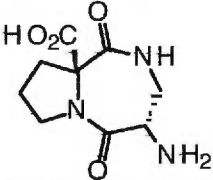
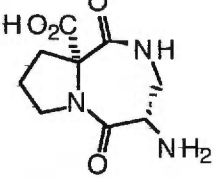
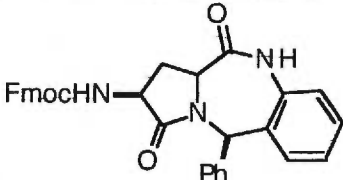
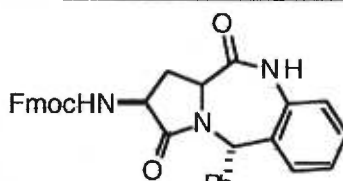
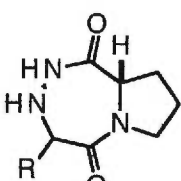
Type	Compounds	Comments	References
5,6-fused		6:4 mixture of diastereoisomers at C-6.	69
5,7-fused		Designed as a β -turn mimetic.	70
5,7-fused			71
5,7-fused		<p>R = H, alkyl, ArY, CH₂OCH₂CCMe₃, Ph₂CH R₁ = H, Ac, PhCO, CH₂O₂CCMe₃, Q₁ R₂ = H, alkyl, CH₂OCH₂CH₂OMe, ArY A = CH₂, O, S B = S, O ArY = (substituted) arylalkyl Q₁ = COCH₂-Morpholine Designed for use as metalloprotease inhibitors (ACE/NEP).</p>	94
6,7-fused		Designed for use as a metalloprotease inhibitor (ACE/NEP).	72

Type	Compounds	Comments	References
5,5-fused		$R^1 = \text{allyl}, R^2 = \text{allyl}$ $R^1 = \text{Me}, R^2 = \text{allyl}$ $R^1 = \text{allyl}, R^2 = \text{Me}$, X-ray analysis. Designed as β -lactam analogs. Antibacterial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria.	100 76 76 76, 77
5,5-fused		$W = \text{COMe}, \text{COPh}, \text{CONHPh}, \text{PO}_3\text{Me}_2, \text{CF}_3, \text{CH}_2\text{OH}, \text{H}$ $W = \text{CO}_2\text{Me}, \text{COMe}, \text{COCO}_2\text{Et}, \text{H}$ $W = \text{COMe}, \text{CN}$ for <i>t</i> -Bu ester $W = \text{COMe}, \text{CO}_2\text{Me}, \text{CO}_2\text{Et}, \text{CO}_2\text{Pr}, \text{CO}_2\text{Bn}, \text{COEt}, \text{CN}, \text{SO}_2\text{Me}$ $W = \text{CO}_2\text{Et}, \text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}, \text{COEt}, \text{CN}, \text{SO}_2\text{Me}$ Designed as β -lactam analogs.	100, 101 77 78 78 73b 86a
5,5-fused		$W = \text{CO}_2\text{Me}, \text{COMe}$, X-ray analysis $W = \text{CN}, \text{SO}_2\text{Me}$ $W = \text{CN}, \text{SO}_2\text{Me}, \text{SO}_2\text{Et}, \text{SO}_2\text{Ph}$ $W = \text{CN}, \text{SO}_2\text{Me}, \text{SO}_2\text{Et}, \text{SO}_2n\text{-Pr}, \text{SO}_2n\text{-Bu}, \text{SO}_2\text{Ph}, \text{allyl}, \text{COMe}, \text{CO}_2\text{Me}, \text{SO}_3\text{Me}$ X-ray analyses for $W = \text{COMe}; \text{CO}_2t\text{-Bu}$. Designed as β -lactam analogs. Antibacterial activity.	100, 101 77 82 73b 73c
5,5-fused		Designed as a β -lactam analog. <i>In vitro</i> antimicrobial activity against <i>S. aureus</i> .	75
5,5-fused		Designed as a β -lactam analog.	85

Type	Compounds	Comments	References
5,5-fused		R = Me, <i>t</i> -Bu, HC(Ph) ₂ , Et, allyl 3(<i>R</i>):1(<i>S</i>) mixture of diastereoisomers at C-2. nOe experiments. Designed as β-lactam analogs.	80
5,5-fused		R = Me, <i>t</i> -Bu, HC(Ph) ₂ , Et, allyl, H 1(<i>S</i>):3(<i>R</i>) mixture of diastereoisomers at C-2. nOe experiments. Designed as β-lactam analogs.	80
5,5-fused		nOe experiments.	71
5,5-fused		X-ray of the acid derivative. Designed as a β-lactam analog.	102
5,6-fused		R = Me, CH ₂ Ph NOESY and HMBC experiments.	103
5,6-fused			103
5,6-fused		W = CO ₂ allyl, CN, COMe Designed as β-lactam analogs. Antibacterial activity.	80

Type	Compounds	Comments	References
5,7-fused		Designed for use in metalloprotease inhibitors (ACE/NEP).	104 28
5,7-fused		Designed for use in metalloprotease inhibitors (ACE/NEP).	104 28
5,6-fused		W = CO ₂ Me, X-ray analysis. W = COMe Designed as β-lactam analogs.	100 86a 73b 86b
6,6-fused		Designed for use in metalloprotease inhibitors (ACE/NEP).	60 87a
6,6-fused		Designed for use in metalloprotease inhibitors (ACE).	87a 87c
6,6-fused		Designed for use in metalloprotease inhibitors (ACE).	87a 87c
6,7-fused		Designed for use in metalloprotease inhibitors (ACE).	104, 28 60 87a 87b

Type	Compounds	Comments	References
6,7-fused		Designed for use in metalloprotease inhibitors (ACE).	87a
6,7-fused		Designed for use in metalloprotease inhibitors (ACE).	87a
6,7-fused		Designed for use in metalloprotease inhibitors (ACE).	87a
6,7-fused		Designed for use in metalloprotease inhibitors (ACE/NEP).	104, 28 60 87a, 87b
6,7-fused		Designed for use in metalloprotease inhibitors (ACE).	87b
6,7-fused		Designed for use in metalloprotease inhibitors (ACE).	87a
6,8-fused		Designed for use in metalloprotease inhibitors (ACE).	87a

Type	Compounds	Comments	References
6,8-fused		Designed for use in metalloprotease inhibitors (ACE).	87a
5,6-fused		Used to stabilize loop conformations in cyclic peptides having NPNA and RGD motifs.	96a
5,6-fused		Used in cyclic peptides having NPNA motifs.	96b
5,7-fused		1:1 mixture of diastereoisomers at C-7. Designed for use as Xaa-Pro amide <i>cis</i> -rotamer and type VI β -turn mimetics.	91
5,7-fused		1:1 mixture of diastereoisomers at C-7. Designed for use as Xaa-Pro amide <i>cis</i> -rotamer and type VI β -turn mimetics.	91
5,7-fused		5(<i>R</i>):1(<i>S</i>) mixture of diastereoisomers at C-2. nOe experiments.	105
5,7-fused		1(<i>S</i>):5(<i>R</i>) mixture of diastereoisomers at C-2. nOe experiments.	105
5,7-fused		R = H, X-ray analysis. R = Me, X-ray analysis for the <i>R</i> derivative. Designed for use as Xaa-Pro amide <i>cis</i> -rotamer and type VI β -turn mimetics.	92

2.10 ACKNOWLEDGEMENT

We thank NSERC (Canada) and FCAR (Quebec) for generous financial assistance.

2.11 REFERENCES & NOTES

1. For recent reviews on amino acids, see a) Sardina, F.J.; Rapoport, H. "Enantiospecific Synthesis of Heterocycles from α -Amino Acids", *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1825. b) Duthaler, R.O. "Recent Developments in the Stereoselective Synthesis of α -Amino Acids", *Tetrahedron* **1994**, *50*, 1539. c) Ohfuné, Y. "Stereoselective Routes Toward the Synthesis of Unusual Amino Acids", *Acc. Chem. Res.* **1992**, *25*, 360. d) Williams, R.H. "The Synthesis of Optically Active α -Amino Acids", New York, N.Y., Pergamon, 1989. e) Coppola, G.M.; Shcuster, H.F. "Asymmetric Synthesis: Construction of Chiral Molecules Using Amino Acids", Wiley, New York, N.Y., 1987.
 2. See for example, a) Gante, J. "Peptidomimetics - Tailored Enzyme Inhibitors", *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1699; b) Adang, A.E.P.; Hermkens, P.H.H.; Linders, J.T.M.; Ottenheijm, H.C.J.; van Staveren, C.J. "Case Histories of Peptidomimetics: Progression from Peptides to Drugs", *Rec. Trav. Chim. Pays Bas* **1994**, *113*, 63.
- † -----
For an authoritative review on "Conformational Analysis of Dipeptide Mimics" see Gillespie, P.; Cicariello, J.; Olson, G.L. *Peptide Science*, in press.

- c) Olson, G.L.; Bolin, D.R.; Bonner, M.P.; Bös, M.; Cook, C.M.; Fry, D.C.; Graves, B.J.; Hatada, M.; Hill, D.E.; Kahn, M.; Madison, V.S.; Rusiecki, V.K.; Sarabu, R.; Sepinwall, J.; Vincent, G.P.; Voss, M.E. "Concepts and Progress in the Development of Peptide Mimetics", *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3039.
3. For selected reviews, see a) Symposia-in-Print No. 5, "Approaches to Non-peptide Ligands for Peptide Receptor Sites", Horwell, D.C., Guest editor, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, p. 797. b) Giannis, A.; Kolter, T. "Peptidomimetics for Receptor Ligands - Discovery, Development and Medical Perspectives", *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1244. c) Morgan, B.A.; Gainor, J.A., "Approach to the Discovery of non-Peptide Ligands for Peptide Receptors and Peptidases", *Annu. Rep. Med. Chem.* **1989**, *24*, 243.
4. For a perspective see, Appelt, K. and 32 co-authors, "Design of Enzyme Inhibitors Using Iterative Protein Crystallographic Analysis", *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1925.
5. See for example, a) Greer, J.; Erickson, J.W.; Baldwin, J.J.; Varney, M.D. "Application of the Three-Dimensional Structures of Protein Target Molecules in Structure-Based Drug Design", *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1035. b) Martin, Y.C. "3D Database Searching in Drug Design", *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2145.
6. See for example, a) Rizo, J.; Giersach, L.M. "Constrained Peptides: Models of Bioactive Peptides and Protein Substructures", *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, *61*, 387. b) Kahn, M. "Peptide Secondary Structure Mimetics: Recent Advances and Future Challenges", *Synlett.* **1993**, 821. c) Symposia-in-print No. 50, "Peptide Secondary

- Structure Mimetics", Kahn, M. Guest Editor, *Tetrahedron* **1993**, 49, p. 3433. d) Hölzemann, G., "Peptide Conformation Mimetics", *Kontakte* **1991**, 3. d) Olson, G.L.; Voss, M.E.; Hill, D.E.; Kahn, M.; Madison, V.S.; Cook, C.M. "Design and Synthesis of a Protein β -Turn Mimetic", *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 323. e) Ball, J.B.; Alewood, P.F. "Conformational Constraints: Nonpeptide β -turn Mimics", *J. Mol. Recogn.* **1990**, 3, 55. f) Kahn, M.; Wilke, S.; Chen, B.; Fujita, K.; Lee, Y.-H.; Johnson, M.E. "The Design and Synthesis of Mimetics of Peptide β -Turns", *J. Mol. Recogn.* **1988**, 1, 75. g) Venkatachalam, C.M. "Stereochemical Criteria for Polypeptides and Proteins. V. Conformation of a System of Three Linked Peptides Units", *Biopolymers*. **1968**, 6, 1425.
7. See for example, Gallo, E.A.; Gellman, S.H. "Hydrogen-Bond-Mediated Folding in Depsipeptide Models of β -Turns and α -Helical Turns", *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 9774, and subsequent papers.
8. For recent reviews, see a) Thomson, L.A.; Ellman, J.A. "Synthesis and Applications of Small Molecule Libraries", *Chem. Rev.* **1996**, 96, 555. b) Special issue, "Combinatorial Chemistry", *Acc. Chem. Res.* **1996**, 29, No. 3. c) Terrett, N.K.; Gardner, M.; Gordon, D.W.; Kobylecki, R.J.; Steele, J. "Combinatorial Synthesis – The Design of Compound Libraries and their Application to Drug Discovery", *Tetrahedron* **1995**, 51, 8135. d) Lowe, G. "Combinatorial Chemistry", *Chem. Soc. Rev.* **1995**, 309. e) Gallop, M.A.; Barrett, R.W.; Dower, W.J.; Fodor, S.P.A.; Gordon, E.M. "Applications of Combinatorial Technologies to Drug Discovery. 1. Background and Peptide Combinatorial Libraries", *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 1235. f) Gordon, E.;

- Barrett, R.W.; Dower, W.J.; Fodor, S.P.A.; Gallop, M.A. "Applications of Combinatorial Technologies to Drug Discovery. 2. Combinatorial Organic Synthesis, Library Screening Strategies, and Future Directions", *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1385. g) Felder, E.R. "The Challenge of Preparing and Testing Combinatorial Compound Libraries in the Fast Lane at the Front End of Drug Development", *Chimia* **1994**, *48*, 531.
9. Mueller, R.; Revesz, L. "Synthesis of 6,5-Fused Bicyclic Lactams as Potential Dipeptide β -Turn Mimetics", *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 4091.
10. a) Lombart, H.-G.; Lubell, W. D. "Rigid Dipeptide Mimetics: Efficient Synthesis of Enantiopure Indolizidinone Amino Acids", *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9437. b) Lombart, H.-G.; Lubell, W. D. "Use Of Azabicycloalkane Amino Acids To Stabilize β -Turn Conformations In Model Peptides And Gramicidin S", In *Peptides: Chemistry, Structure and Biology*, P.T.P Kaumaya and R.S. Hodges, Editors; ESCOM Sci. Pub. B.V.: Leiden, The Netherlands, 1996, p. 695. c) Lombart, H.-G.; Lubell, W. D. "A Claisen Condensation Approach to Prepare Azabicycloalkane Amino Acid β -Turn Mimetics", In *Peptides 1994 (Proceedings of the 23rd European Peptide Symposium)*, H.L.S. Maia, Editor; ESCOM, Leiden, The Netherlands, 1995, p. 696. d) Lombart, H.-G.; Lubell, W.D. "Synthesis of Enantiopure α,ω -Diamino Dicarboxylates and Azabicycloalkane Amino Acids by Claisen Condensation of α -[N-(Phenylfluorenyl)amino]Dicarboxylates", *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 6147. e) Lombart, H.-G.; Hin, B; Lubell, W. D., unpublished results.

11. Hanessian, S.; Ronan, B.; Laoui, A. "Design and Synthesis of a Prototype Model Antagonist of Tachykinin NK-2 Receptor", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 1397.
12. Barton, D.H.R.; Hervé, Y.; Potier, P.; Thierry, J. "Synthesis of Novel α -Amino-Acids and Derivatives Using Radical Chemistry: Synthesis of L- and D- α -Amino-Adipic Acids, L- α -Aminopimelic Acid and Appropriate Unsaturated Derivatives", *Tetrahedron* **1987**, *43*, 4297.
13. Hanessian, S.; McNaughton-Smith, G. "A Versatile Synthesis of a β -Turn Peptidomimetic Scaffold: An Approach Towards a Designed Model Antagonist of the Tachykinin NK-2 Receptor", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1567.
14. Hanessian, S.; Haché, B.; McNaughton-Smith, G., unpublished results.
15. Hanessian, S.; McNaughton-Smith, G., unpublished results.
16. Colombo, L.; Di Giacomo M.; Scolastico, C.; Manzoni, L.; Belvisi, L.; Molteni, V. "Conformationally Constrained Dipeptides: Synthesis of 7,5- and 6,5-Fused Bicyclic Lactams by Stereoselective Radical Cyclizations", *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 625.
17. a) Moeller, K.D.; Hanau, C.E.; d'Avignon, A. "The Use of HMQC-TOCSY Experiments for Elucidating the Structures of Bicyclic Lactams: Uncovering a Surprise Rearrangement in the Synthesis of a Key Pro-Phe Building Block", *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 825. b) Wenhao, L.; Moeller, K. D. "Conformationally Restricted TRH Analogs: The Compatibility of a 6,5-Bicyclic Lactam-Based Mimetic with Binding to TRH-R", *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10106.

18. Thorsett, E.D. "Conformationally Restricted Inhibitors of Angiotensin Converting Enzyme", *Actual. Chim. Thér. 13e série*, **1986**, 257.
19. Robl, J.A. "Peptidomimetic Synthesis: Utilization of N-Acyliminium Ion Cyclization Chemistry in the Generation of 7,6- and 7,5-Fused Bicyclic Lactams", *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 393.
20. Colombo, L.; Di Giacomo, M.; Papeo, G.; Carugo, O. Scolastico, C.; Manzoni, L. "Synthesis of 7,5-Fused Bicyclic Lactams by Stereoselective Radical Cyclization", *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 4031.
21. Moeller, K.D.; Rothfus, S. "Conformationally Constrained Thyroliberin Analogs: A Novel Electrochemical Route to a Key Rigid Pro-Phe Building Block", *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 2913.
22. Moeller, K.D.; Hanau, C.E. "Reductive Routes to Rigid Peptide Building Blocks: The Dependence of A Regioselective Imide Reduction on the Nature of an α -Alkoxy Substituent", *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 6041.
23. a) Flynn, G.A.; Beight, D.W.; Mehdi, S.; Koehl, J.R.; Giroux, E.L.; French, J.F.; Hake, P.W.; Dage, R.C. "Application of a Conformationally Restricted Phe-Leu Dipeptide Mimetic to the Design of a Combined Inhibitor of Angiotensin I-Converting Enzyme and Neutral Endopeptidase 24.11", *J Med. Chem.* **1993**, 36, 2420. b) Flynn, G.A.; Giroux, E.L.; Dage, R.C. "An Acyl-Iminium Ion Cyclization Route to a Novel Conformationally Restricted Dipeptide Mimic: Applications to Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition", *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 7914.

24. De Lombaert, S.; Blanchard, L.; Stamford, L.B.; Sperbeck, D.M.; Grim, M.D.; Jenson, T.M.; Rodriguez, H.R. "Practical Syntheses of a Novel Tricyclic Dipeptide Mimetic Based on a [6H]-Azepino Indoline Nucleus: Application to Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition", *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 7513.
25. Robl, J.A.; Karanewsky, D.S.; Asaad, M.M. "Synthesis of Benzo-Fused, 7,5- and 7,6-Fused Azepinones as Conformationally Restricted Dipeptide Mimetics", *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1593.
26. Robl, J.A.; Cimarusti, M.P.; Simpkins, L.M.; Weller, H.N.; Pan, Y.Y.; Malley, M.; DiMarco, J.D. "Peptidomimetic Synthesis: A Novel, Highly Stereoselective Route to Substituted Freidinger Lactams", *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 2348.
27. a) De la Figuera, N.; Alkorta, I.; García-López, M.T.; Herranz, R.; González-Muñiz, R. "2-Amino-3-oxohexahydroindolizino[8,7-*b*]indole-5-carboxylate Derivatives as New Scaffolds for Mimicking β -Turn Secondary Structures. Molecular Dynamics and Stereoselective Synthesis", *Tetrahedron* **1995**, *51*, 7841. b) De la Figuera, N.; Jiménez, M. A.; Biacs, M.; García-López, M.T.; González-Muñiz, R.; Andreu, D. "Gramicidin S Analogs Containing the New β -Turn Dipeptide Mimetic IBTM", In *Peptides 1994, Proceedings of the 23rd European Peptide Symposium*, H.L.S. Maia, Editor; ESCOM, Leiden, The Netherlands, 1995, p. 702.
28. Simpkins, L.M.; Robl, J.A.; Cimarusti, M.P.; Ryono, D.E.; Stevenson, J.; Sun C.-Q.; Petrillo, E.W.; Karanewsky, D.S.; Asaad, M.M.; Bird, J.E.; Schaeffer, T.R.; Trippodo, N.C. "Dual ACE/NEP Inhibitors: Synthesis and Activity of Mercaptoacyl Dipeptides Containing

- Conformationally Restricted Dipeptide Surrogates", Abstracts of Papers 210th, Am. Chem. Soc. Meeting, Chicago, Ill., MEDI 064 (1995).
29. For recent reviews on β -lactam antibiotics, see a) Berko, A.H. "Preparations of Two Pivotal Intermediates for the Synthesis of 1- β -Methyl Carbapenem Antibiotics", *Tetrahedron* **1996**, 52, 331; "The Organic Chemistry of β -Lactams", Georg, G.I. Ed.; VCH Publishers, Inc., New York, N.Y. 1993 and references cited therein. b) Neuhaus, F.C.; Georgopapadakou, N.H. in "Emerging Targets in Antibacterial and Antifungal Chemotherapy", Sutcliffe, J.; Georgopapadakou, N.H. eds., Chapman and Hall, New York, N.Y., 1992.
30. For reviews, see a) Baldwin, J.E.; Lynch, G.P.; Pitlik, J. " γ -Lactam Analogues of β -Lactam Antibiotics", *J. Antibiotics* **1991**, 44, 1. b) Marchand-Brynaert, J.; Ghosez, L. "Non- β -Lactam Analogues of Penicillins and Cephalosporins", Ohno, M.; Lukacs, G. Eds., Springer-Verlag, Berlin, **1990**, p. 727. c) Jungheim, L.N; Ternansky, R.J. "Non- β -Lactam Mimics of β -Lactam Antibiotics", in *The Chemistry of β -Lactams*, Page, M.I. Ed.; Chapman and Hall, **1992**, p. 306.
31. Baldwin, J.E.; Chan, M.F.; Gallacher, G.; Monk, P.; Prout, K. " γ -Lactam Analogs of Penicillanic and Carbapenicillanic Acids", *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1983**, 250.
32. Baldwin, J.E.; Chan, M.F.; Gallacher, G.; Otsuka, M. " γ -Lactam Analogs of Penicillanic and Carbapenicillanic Acids", *Tetrahedron* **1984**, 40, 4513.

33. Boyd, B.D.; Foster, B.J.; Hatfield, L.D.; Hornback, W.J.; Jones, N.D.; Munroe, J.E.; Swartzendruber, J.K. " γ -Lactam Analogs of Carbapenems", *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 3457.
34. Allen, N.E.; Boyd, D.B.; Campbell, J.B.; Deeter, J.B.; Elzey, T.K.; Foster, B.J.; Hatfield, L.D.; Hobbs, J.N. Jr.; Hornback, W.J.; Hunden, D.C.; Jones, N.D.; Kinnick, M.D.; Morin, J.M. Jr.; Munroe, J.E.; Swartzendruber, J.K.; Vogt, D.G. "Molecular Modeling of γ -Lactam Analogs of β -Lactam Antibacterial Agents: Synthesis and Biological Evaluation of Selected Penem and Carbapenem Analogues", *Tetrahedron* **1989**, 45, 1905.
35. Salzmann, T.N.; Ratcliffe, R.W.; Christensen, B.G.; Bouffard, F.A. "A Stereocontrolled Synthesis of (+)-Thienamycin", *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 6161.
36. Hashiguchi, S.; Natsugari, H.; Ochiai, M. "Synthesis of γ -Lactam Analogues of Carbapenems with Substituted-thio Groups at the C-3 Position", *J. Chem. Soc., Perkin Trans I* **1988**, 2345.
37. a) Baldwin, J.E.; Adlington, R.M.; Jones, R.H.; Schofield, C.J.; Zaracostas, C.; Greengrass, C.W. " γ -Lactam Analogues of Carbapenicillanic Acids", *Tetrahedron* **1986**, 42, 4879. b) Baldwin, J.E.; Adlington, R.M.; Jones, R.H.; Schofield, C.J.; Zaracostas, C.; Greengrass, C.W. " γ -Lactam Analogues of Carbapenicillanic Acids", *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1985**, 194.
38. a) Colvin, E.W.; Kirby, G.W. Wilson, A.C. "O-(Diphenylphosphinyl)hydroxylamine: A New Reagent for Electrophilic C-Amination", *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 3835. b) Boche, G.; Bernheim, M.; Schrott, W. "Primary Amines via

- Electrophilic Amination of Organometallic Compounds with *O*-(Diphenylphosphinyl)hydroxylamine", *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 5399.
39. Heck, J.V. "3-Amino-6-Substituted Thio-1-azabicyclo[3.2.0]hept-6-en-2-one-7-carboxylic acids", U.S. Patent 4,428,960 (1984), *Chem. Abst.* **1984**, 100, p. 561, 191655h.
40. Du Vigneaud, V.; Carpenter, F.H. "XXVII. The γ -Lactam of Benzylhomopenicilloic Acid And Related Compounds", in *The Chemistry of Penicillin* Eds., Clarke, H.T.; Johnson, J.R.; Robinson, R. **1949**, 1004, Princeton University Press, Princeton, N.J.
41. Nagai, U.; Sato, K. "Synthesis of a Bicyclic Dipeptide with the Shape of β -Turn Central Part", *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 647.
42. Wyvratt, M.J.; Tischler, M.H.; Ikeler, T.J.; Springer, J.P.; Tristram, E.W.; Patchett, A.A. "Bicyclic Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme", *Peptide, Structure and Function, Proceedings of the 8th Am. Peptide. Symp.* Eds. V.J. Hruby and D. H. Rich, 1983, Pierce Chem. Company, Rockford, Ill. p. 551.
43. Subasinghe, N.L.; Bontems, R.J.; McIntee, E.; Mishra, R.K.; Johnson, R.L. "Bicyclic Thiazolidine Lactam Peptidomimetics of the Dopamine Receptor Modulating Peptide Pro-Leu-Gly-NH₂", *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 2356.
44. Baldwin, J.E.; Freeman, R.T.; Lowe, C.; Schofield, C.J.; Lee, E. "A γ -Lactam Analogue of the Penems Possessing Antibacterial Activity", *Tetrahedron* **1989**, 45, 4537.

45. Bach, H. A.C.; Markwalder, J.A.; Ripka, W.C. "Synthesis and NMR Conformational Analysis of a β -Turn Mimic Incorporated into Gramicidin S", *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, *38*, 314.
46. Etzkorn, F.A.; Guo, T.; Lipton, M.A.; Goldberg, S.D.; Bartlett, P.A. "Cyclic Hexapeptides and Chimeric Peptides as Mimics of Tendamistat", *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10412.
47. Belshaw, P.J.; Meyer, S.D.; Johnson, D.D.; Romo, D.; Ikeda, Y.; Andrus, M.; Alberg, D.G.; Schultz, L.W.; Clardy, J.; Schreiber, S.L. "Synthesis, Structure and Mechanism in Immunophilin Research", *Synlett* **1994**, 381.
48. Slusarchyk, W.A.; Robl, J.A.; Taunk, P.C.; Asaad, M.M.; Bird, J.E.; DiMarco, J.; Pan, Y. "Dual Metalloprotease Inhibitors. V. Utilization of Bicyclic Azepinonethiazolidines and Azapinonetetrahydrothiazines in Constrained Peptidomimetics of Mercaptoacyl Dipeptides", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 753.
49. Baldwin, J.E.; Lee, E. "Synthesis of Bicyclic γ -Lactams via Oxazolidinones", *Tetrahedron* **1986**, *42*, 6551.
50. Baldwin, J.E.; Lowe, C.; Schofield, C.J. "A γ -Lactam Analogue of Penems Possessing Antibacterial Activity", *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 3461.
51. Boyd, D.B.; Elzey, T.K.; Hatfield, L.D.; Kinnick, M.D.; Morin, Jr., J.M. " γ -Lactam Analogue of the Penems", *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 3453.
52. Marchand-Brynaert, J.; Couplet, B.; Dive, G.; Ghosez, L. "New γ -Lactam Homologs of Penems", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 2303.

53. Genin, M.J.; Mishra, R.K.; Johnson, R.L. "Dopamine Receptor Modulation by a Highly Rigid Spiro Bicyclic Peptidomimetic of Pro-Leu-Gly-NH₂", *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3481.
54. Sato, K.; Nagai, U. "Synthesis and Antibiotic Activity of a Gramicidin S Analogue Containing Bicyclic β -Turn Dipeptides", *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1986**, 1231.
55. Nagai, U.; Kato, R.; Sato, K.; Nakamura, R. "Bicyclic Turned Dipeptide (BTD) as a β -Turn Mimetic; Its Design, Synthesis and Incorporation into Bioactive Peptides", *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3577.
56. Nagai, U.; Sato, K. "Synthesis and Properties of Some Peptides Containing a Bicyclic Dipeptide Unit with Semi-Rigid β -Turn Conformation", *Peptide, Structure and Function, Proceedings of the 9th Am. Peptide. Symp.* Eds. C.M. Deber, V.J. Hruby and K.D. Kopple, 1985, Pierce Chem. Company, Rockford, Ill. p. 465.
57. Nagai, U.; Sato, K.; Ling, N.; Matsuzaki, T.; Tomotake, Y. "Synthesis and Properties of Some Peptides Related to the Bicyclic β -Turn Dipeptide (BTD)", *Peptides, Chemistry and Biology, Proc.10th. Am. Peptide. Symp.* Ed. G.R. Marshall, ESCOM, Leiden, 1988, p. 129.
58. Nagai, U.; Nakamura, R.; Kato, K.; Ying, S.-Y. "Synthesis of an LH-RH Analog with Restricted Conformation by Incorporation of a Bicyclic Beta-Turn Dipeptide Unit", *Peptide Chemistry 1986: T Miyazawa, Ed., Protein Research Fondation, Osaka, 1987*, 295.
59. Doyle, P.M.; Harris, J.C.; Moody, C.M.; Sadler, P.J.; Sims, M.; Thornton, J.M.; Uppenbrink, J.; Viles, J.H. "Solution Structure of a Biologically Active Cyclic LDV Peptide Analogue Containing a Type II' β -Turn Mimetic", *Int. J. Peptide Protein Res.* **1996**, *47*, 427.

60. Wyvratt, M.J.; Patchett, A.A. "Recent Development in the Design of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors", *Med. Res. Rev.* **1985**, *5*, 483.
61. Baldwin, J.E.; Lee, V.; Schofield, C.J. "Synthesis of a Bicyclic γ -Lactam Dipeptide Analogue", *Heterocycles*, **1992**, *34*, 903.
62. Genin, M.J.; Johnson, R.L. "Design, Synthesis, and Conformational Analysis of a Novel Spiro-Bicyclic System as a Type II β -turn Peptidomimetic", *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8778.
63. Baldwin, J.E.; Norris, W.J.; Freeman, R.T.; Bradley, M.; Adlington, R.M.; Long-Fox, S.; Schofield, C.J. " γ -Lactam Formation from Tripeptides with Isopenicillin N Synthase", *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1988**, 1128.
64. Nagai, U.; Kato, R. "Synthesis of Phenyl-Substituted BTD (Bicyclic Turned Dipeptide)", *Peptide Chem., Struct. Biol., Proc. Am. Peptide Symp.* 11th, 1989 (Pub. 1990). Eds. Rivier, J.E.; Marshall, G.R., ESCOM Sci. Pub. Leiden, p. 653.
65. Bodansky, M. "The Principles of Peptide Synthesis" Springer-Verlag, Berlin, **1984**.
66. Baldwin, J.E.; Freeman, R.T.; Schofield, C.J. "Synthesis of a Novel Bicyclic γ -Lactam Analogue of the 1-Oxapenam", *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 4019.
67. Baldwin, J.E.; Hulme, C.; Schofield, C.J.; Edwards, A.J. "Synthesis of Potential β -Turn Bicyclic Dipeptide Mimetics", *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 935.
68. Claridge, T.D.W.; Hulme, C.; Kelly, R.J.; Lee, V.; Nash, I.A.; Schofield, C.J. "Synthesis and Analysis of Leu-Enkephalin

- Analogues Containing Reverse Turn Peptidomimetics", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 485.
69. Slomczynska, U.; Chalmers, D.K.; Cornille, F.; Smythe, M.L.; Beusen, D.D.; Moeller, K.D.; Marshall, G.R. "Electrochemical Cyclisation of Dipeptides to Form Novel Bicyclic, Reverse-Turn Peptidomimetics. 2. Synthesis and Conformational Analysis of 6,5-Bicyclic Systems", *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1198.
70. Cornille, F.; Slomczynska, U.; Smythe, M.L.; Beusen, D.D.; Moeller, K.D.; Marshall, G.R. "Electro-chemical cyclisation of Dipetides Toward Novel Bicyclic, Reverse-Turn Peptidomimetics. 1. Synthesis and Conformational Analysis of 7,5-Bicyclic Systems", *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 909.
71. Cornille, F.; Fobian, Y.M.; Slomczynska, U.; Beusen, D.D.; Marshall, G.R.; Moeller, K.D. "Anodic Amide Oxidations: Conformationally Restricted Peptide Building Blocks from the Direct Oxidation of Dipeptides", *Tetrahedron Lett.* **1994**, *38*, 6989.
72. Burkholder, T.P.; Le, T.-B.; Giroux, E.L.; Flynn, G.A. "Acid-Catalyzed O-Allylation of β -Hydroxy- α -Amino Acids: An Entry into Conformationally Constrained Dipeptide Surrogates", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 579.
73. a) Allen, N.E.; Hobbs, J.N.; Preston, D.A.; Turner, J.R.; Wu, C.Y.E. "Antibacterial Properties of the Bicyclic Pyrazolidinones", *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 92. b) Ternansky, R.J.; Draheim, S.E. "Structure-Activity Relationship within a Series of Pyrazolidinone Antibacterial Agents. 1. Effect of Nuclear Modification on *In Vitro* Activity", *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3219. c) Ternansky, R.J.; Draheim, S.E.; Pike,

- A.J.; Counter, F.T.; Eudaly, J.A.; Kasher, J.S. "Structure-Activity Relationship within a Series of Pyrazolidinone Antibacterial Agents. 2. Effect of Side Chain Modification on *In Vitro* Activity and Pharmacokinetic Parameters", *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3224.
74. Indelicato, J.M.; Pasini, C.E. "The Acylating Potential of γ -Lactam Antibacterials: Base Hydrolysis of Bicyclic Pyrazolidinones", *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1227.
75. Jungheim, L.N.; Sigmund, S.K.; Fischer, J.W. "Bicyclic Pyrazolidinones, a New Class of Antibacterial Agent Based on the β -Lactam Model", *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 285.
76. Jungheim, L.N.; Sigmund, S.K.; Jones, N D. "Bicyclic Pyrazolidinones, Steric and Electronic Effects on Antibacterial Activity", *Tetrahedron. Lett.* **1987**, *28*, 289.
77. Jungheim, L.N.; Sigmund, S.K. "1,3-Dipolar Cycloaddition Reactions of Pyrazolidinium Ylides with Acetylenes. Synthesis of a New Class of Antibacterial Agents", *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 4007.
78. Jungheim, L.N.; Barnett, C.J.; Gray, J.E.; Horcher, L.N.; Shepherd, T.A.; Sigmund, S.K. "1,3-Dipolar Cycloaddition Reactions Of Pyrazolidinium Ylides With Vinyl Sulfones. A Regioselective Synthesis of Bicyclic Pyrazolidinone Antibacterial Agents", *Tetrahedron* **1988**, *44*, 3119.
79. Jungheim, L.N.; Holmes, R.E. "4-Substituted Diazolidinones", Eur. Pat. Appl. 202,795, 11/26/86; U.S. Appl. 728,734, 4/30/85.
80. Shepherd, T.A.; Jungheim, L.N. "Thioaldehyde in Cycloaddition Reactions. Synthesis of Nuclear Analogues of Pyrazolidinone Antibacterial Agents", *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 5061.

81. For a review see Wadsworth, W.S.Jr. "Synthetic Applications of Phosphoryl-stabilized Anions", *Org. React.* **1977**, *25*, 73.
82. Ternansky, R.J.; Draheim, S.E.N. "[3.3.0] Pyrazolidinones: An Efficient Synthesis of A New Class of Synthetic Antibacterial Agents", *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 2805.
83. Jungheim, L.N.; Boyd, D.B.; Indelicato, J.M.; Pasini, C.E.; Preston, D.A.; Alborn, W.E. "Synthesis, Hydrolysis Rates, Supercomputer Modeling, and Antibacterial Activity of Bicyclic Tetrahydropyridazinones", *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1732.
84. Ninomiya, K.; Shioiri, T.; Yamada, S. "Phosphorus in Organic Synthesis-VII. Diphenyl Phosphorazidate (DPPA). A New Convenient Reagent for a Modified Curtius Reaction", *Tetrahedron* **1974**, *30*, 2151.
85. Neel, D.A.; Holmes, R.E.; Paschal, J.W. "Synthesis of a 3-Keto Bicyclic Pyrazolidinone Using a Curtius Rearrangement", *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4891.
86. a) Ternansky, R.J.; Draheim, S.E. "The Chemistry of Substituted Pyrazolidinones; Applications to the Synthesis of Bicyclic Derivatives", *Tetrahedron* **1992**, *48*, 777. b) Ternansky, R.J.; Draheim, S.E.N. "[4.3.0]Pyrazolidinones as Potential Antibacterial Agents", *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 6569.
87. a) Attwood, M.R.; Hassall, C.H.; Krohn, A.; Lawton, G.; Redshaw, S. "The Design and Synthesis of the Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Cilazapril and Related Bicyclic Coumpounds", *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I.* **1986**, 1011. b) Thomas, W.A.; Whitcombe, I.W.A. "Nuclear Magnetic Resonance Studies and Conformational

- Analysis of Bicyclic Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme. Part 2. The Octahydro-6H-pyridazo[1,2-a][1,2]diazepines", *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II* **1986**, 747. c) Gilbert, P.J.; Thomas, W.A. "Nuclear Magnetic Resonance Studies and Conformations of Bicyclic Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme. Part 1. Octahydropyridazo[1,2-a] pyridizanediones as Models for Alanylproline and Captopril", *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II* **1985**, 1077.
88. Dumas, J.P.; Germanas, J.P. "Design, Synthesis and Evaluation of a Novel Bicyclic Lactam as a Gly-Pro Type VI Beta-Turn Mimic", *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 1493.
89. Gramberg, D.; Robinson, J.A. "Design and Synthesis of a *cis*-Gly-Pro, Type-VI Turn, Dipeptide Mimetic and its Use in Fmoc-Solid Phase Peptide Synthesis", *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 861.
90. Gramberg D.; Weber, C.; Beeli, R.; Inglis, J.; Bruns, C.; Robinson, J.A. "Synthesis of a Type-VI β -Turn Peptide Mimetic and its Incorporation into a High-Affinity Somatostatin Receptor Ligand", *Helv. Chim. Acta* **1995**, 78, 1588.
91. Curran T.P.; McEnaney, P.M. "A Short Synthesis of Bicyclic Dipeptides Corresponding to Xxx-L-Pro and Xxx-D-Pro Having Constrained *Cis*-Proline Amides", *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 191.
92. Lenmanm M.M.; Ingham, S.L.; Gani, D. "Synthesis and Structure of *cis*-Peptidyl Prolinamide Mimetics Based upon 1,2,5-Triazepine-3,6-diones", *J. Chem. Soc, Chem. Comm.* **1996**, 85.
93. a) McClure, K.F.; Renold, P.; Kemp, D.S. "An Improved Synthesis of a Template for α -Helix Formation", *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 454. b)

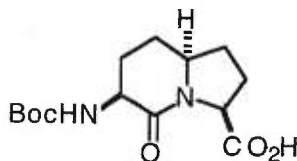
- Kemp, D.S.; Curran, T.P. "(2S, 5S, 8S, 11S)-1-Acetyl-1,4-diaza-3-keto-5-carboxy-10-thia-tricyclo-[2.8.0^{4,8}]-tridecane. Synthesis of Prolyl-Proline-Derived, Peptide-Functionalized Templates for α -Helix Formation", *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 4931. c) Kemp, D.S.; Curran, T.P.; Davis, W.M.; Boyd, J.G.; Muendel, C. "Studies of N-terminal Templates for α -Helix Formation. Synthesis and Conformation Analysis of (2S, 5S, 8S, 11S)-1-acetyl-1,4-diaza-3-keto-5-carboxy-10-thia-tricyclo-[2.8.0^{4,8}]-tridecane (Ac-Hel₁-OH)", *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 6672. d) Olsen, G.L.; Rusiecki, V.K. "Design of Peptide-Functionalized Templates for α -Helix Formation", *Chemtracts-Org. Chem.* **1989**, 2, 235.
94. Flynn, G.A. "Preparation of Mercaptoacetylamine Bicyclic Lactam Derivatives Useful as Inhibitors of Enkephalinase and Angiotensin-Converting Enzyme", PCT Int. Appl. WO 94 10,193, US Appl. Patent 968,770; *Chem. Abstr.* 122: 10677c.
95. a) González-Muñiz, R.; Dominguez, M.J.; Garcia-López, M.T. "Synthesis of 2-Substituted 8-Amino-3-oxoindolizidine-2-carboxylic Acid Derivatives as Peptide Conformation Mimetics", *Tetrahedron* **1992**, 48, 5191. b) Gómez Monterrey, I.M.; González-Muñiz, R.; Herranz, R.; García-López, M.T. "Synthesis of 8-Amino-3-oxoindolizidine-1-carboxylic Acid Derivatives as Conformationally Restricted Templates for Use in Design of Peptide Mimetics", *Tetrahedron* **1995**, 51, 2729.
96. a) Bisang, C.; Weber, C.; Robinson, J.A. "Protein-Loop Mimetics: A Diketopiperazine-Based Template to Stabilize Loop Conformations in Cyclic Peptides Containing the NPNA and RGD Motifs", *Helv.*

- Chim. Acta* **1996**, 79, 1825. b) Emery, F.; Bisang, C.; Farve, M.; Jiang, L.; Robinson, J.A. "A Template for the Solid-Phase Synthesis of Conformationally Restricted Protein Loop Mimetics", *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1996**, 2155.
97. Kahn, M.; Chen, B.; Zieske, P. "The Design and Synthesis of a Nonpeptide Mimic of Erabutoxin", *Heterocycles* **1987**, 25, 29.
98. Subasinghe, N.L.; Johnson, R.L. "Synthetic Studies Towards Conformationally Constrained β -Turn Mimics Possessing Side Chain Functionality", Abstracts of Papers 207th; Am. Chem. Soc. Meeting, San Diego, CA, MEDI. 047 (1994).
99. Coulton, S.; Southgate, R. "Synthesis Of Novel 2-Oxo-4-Thia-1-Azabicyclo(3.3.0)Oct-7-Ene-8-Carboxylic Acid-Derivatives", *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I.* **1992**, 961.
100. Jungheim, L.N.; Ternansky, R.J.; Holmes, R.E. "Bicyclic Pyrazolidinone Antibacterial Agents", *Drugs of the Future*, **1990**, 15, 149.
101. Ternansky, R.J.; Draheim, S.E. "The Synthesis and Biological Evaluation of Pyrazolidinone Antibacterial Agents" in *Recent Advances in the Chemistry of β -Lactam Antibiotics, 4th International Symposium*, Eds. Bentley, P.H.; Southgate, R. Royal Society of Chemistry, Special Publication, **1989**, 70, 139.
102. Baldwin, J.E.; Hulme, C.; Edwards, A.J.; Schofield, C.J. "Synthesis of a Bicyclic γ -Lactam Dipeptide Analogue", *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 1665.
103. Fobian, Y.M.; d'Avignon, A.; Moeller, K.D. "New Routes to Conformationally Restricted Peptide Building Blocks: A

- Convenient Preparation of Bicyclic Piperazinone Derivatives", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 315.
104. Robl J.A.; Sun, C.-Q.; Simpkins, L.M.; Ryono, D.E.; Barrish, J.C.; Karanewky, D.S.; Asaad, M.M.; Schaeffer, T.R., Trippodo, N.C. "Dual Metalloprotease Inhibitors. III. Utilization of Bicyclic and Monocyclic Diazepinone Based Mercaptoacetyls", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 2055.
105. Mulzer, J.; Schröder, F.; Lobbia, A.; Buschmann, J.; Luger, P. "Synthesis of a New Unnatural Amino Acid with Benzodiazepine-Containing Side Chain and Incorporation into a Tripeptide", *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1737.

CHAPITRE 3

Stratégie de synthèse et résultats préliminaires en vue d'obtenir le système acide aminé indolizidinone, l'acide (3S, 6S, 9S)-2-oxo-3-N-(tert-butoxyoxycarbonyl)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylique 1.

**1**

3.1 Stratégie générale.

La stratégie envisagée est une approche générale dans le but d'obtenir des systèmes acides aminés azabicyclo[X.Y.0]alcanes.

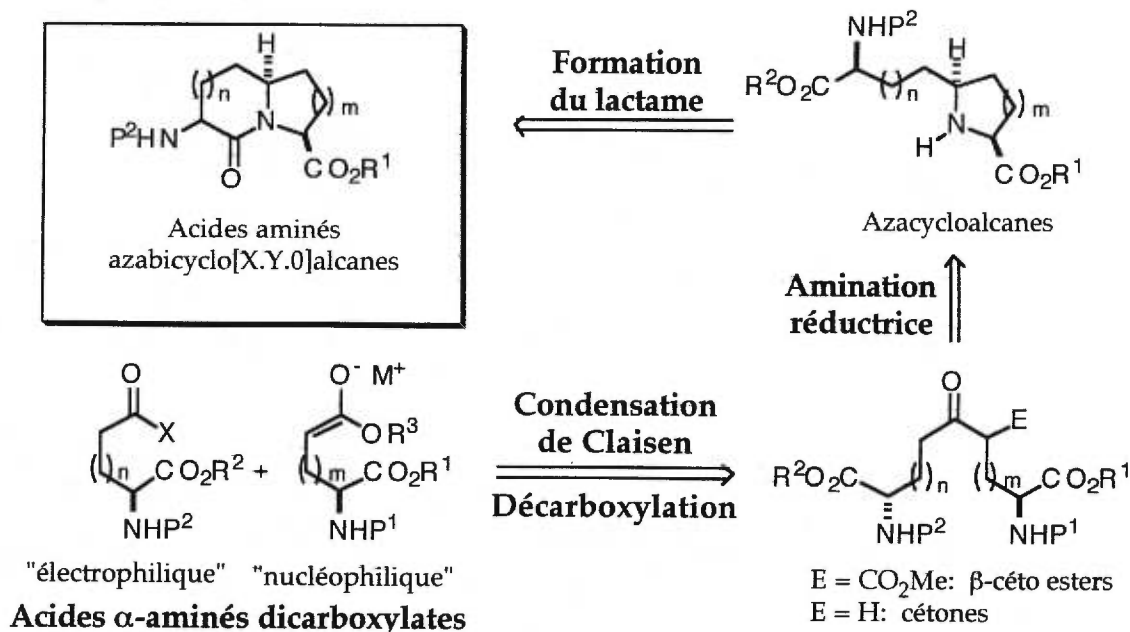
La stratégie idéale devrait prendre en considération les points suivants:

- contrôle de la stéréochimie de tous les centres stéréogènes, en particulier celui en tête de pont, qui donnerait accès aux deux stéréoisomères concaves et convexes;
- contrôle de la taille des cycles pour obtenir une gamme de systèmes acides aminés azabicyclo[X.Y.0]alcanes;

- possibilité d'inclure des substituants à diverses positions du peptidomimétique.

Cette stratégie que nous avons développée tient compte de tous ces points et elle est présentée sur le schéma 1.

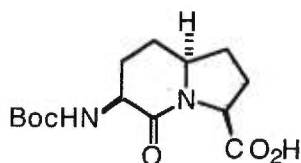
Schéma 1. Stratégie générale pour la synthèse d'acides aminés azabicyclo[X.Y.0]alcanes.



A partir de dérivés α-aminés dicarboxylates de deux types, l'acylation régiosélective d'un synthon électrophile avec un énolate en position terminale (synthon nucléophile) devrait donner un β-céto ester. Une décarboxylation de celui-ci donnerait efficacement des dérivés α,ω-diamino dicarboxylates fonctionnalisés. Les azacycloalcanes substitués pourraient être obtenus par une amination réductrice intramoléculaire de ces cétones. Une cyclisation intramoléculaire au lactame devrait conduire

de façon stéréosélective aux systèmes désirés, les acides aminés 1-azabicyclo[X.Y.0]alcanes. L'utilisation d'acides aminés dicarboxylates de départ de différente longueur, tels que les dérivés glutamates ($n = m = 1$), aspartes ($n = m = 0$) ou à chaînes plus longues ($n \geq 2, m \geq 2$), permettrait d'obtenir des systèmes bicycliques contenant une grande variété de taille des cycles. Cette stratégie permet le contrôle entre les hydrogènes amides clefs en liaison hydrogène avec des résidus carbonylés. Comme les chaînes latérales peptidiques d'un repliement jouent un rôle dans la reconnaissance, notre stratégie pourvoie en l'incorporation stéréocontrôlée de chaînes latérales à différentes positions des cycles. Ainsi, les substituants pourraient être introduits sur les cycles soit par la conservation du carboxylate du β -céto ester, soit par alcoylation au niveau de la cétone. La stéréochimie des chaînes latérales, du squelette ou du centre en tête de pont C_6 peut être contrôlée par l'utilisation d'acides aminés énantiomériquement purs de configuration L ou D afin d'obtenir une gamme de composés.

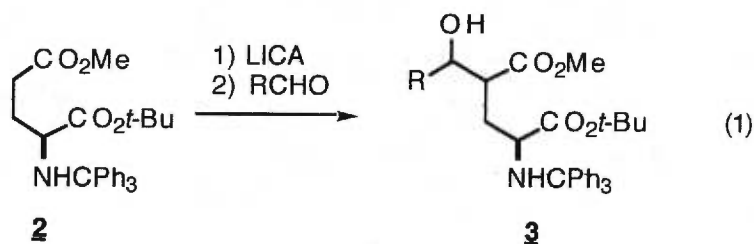
A partir de l'acide glutamique comme synthon chiral, nous avons donc développé une synthèse énantiosélective efficace de l'acide aminé indolizidinone **1** (noté AAI; $m = n = 1, R^1 = H, R^2 = Boc$, schéma 1). Cette stratégie nous donne accès également à tous les stéréoisomères possibles de cette molécule.

**1**

3.2 Réactions régiosélectives des énolates des dérivés de l'acide glutamique: précédents.

Des études précédentes ont montré que les déprotonations régiosélectives de dérivés de l'acide glutamique sont possibles. Ces réactions sur des énolates en position γ du glutamate avec des électrophiles dépendent de la nature du groupe protecteur sur l'amine, du contre ion de l'énolate et de l'électrophile.

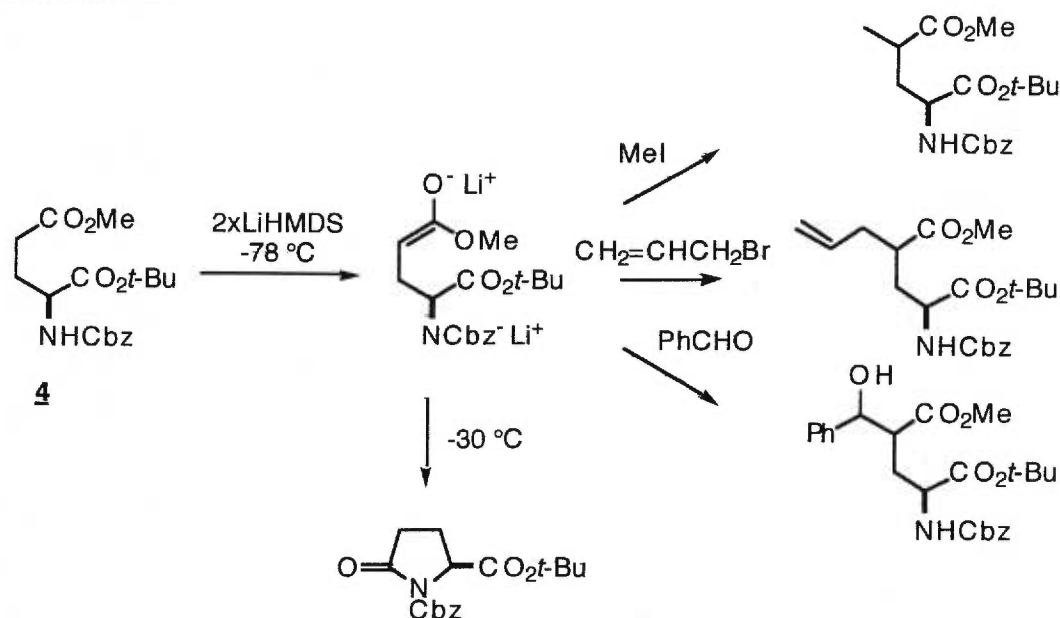
L'énolate de lithium en position γ du *N*-trityl L-glutamate de dibenzyle peut réagir avec le chloroformate de benzyle.¹ Cependant cet énolate n'est pas très réactif avec d'autres électrophiles, tels que des halogénures d'alcoyles ou des dérivés carbonylés.^{2a} L'utilisation d'un groupe protecteur de l'acide en γ moins encombré a permis des réactions avec des aldéhydes avec des rendements de 10 à 95% (équation 1).²



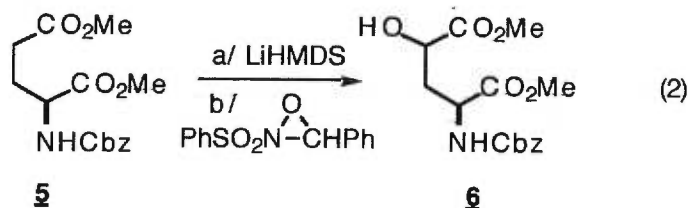
Le changement du groupe protecteur trityle en benzyloxycarbonyle (Cbz) permet une diversité des substituants introduits. Il permet également d'éviter la racémisation du centre en α , car il rend l'hydrogène de l'amine du carbamate plus acide. Ainsi, les énolates de lithium réagissent avec des halogénures d'alcoyles et des aldéhydes pour donner

des glutamates substitués en position γ avec des rendements de 50 à 80% (schéma 2).^{3a,b} Des différentes bases utilisées, l'utilisation d'un sel de l'hexaméthylsilazane permet de bonnes énoisations des esters tout en évitant la racémisation du centre stéréogène présent.

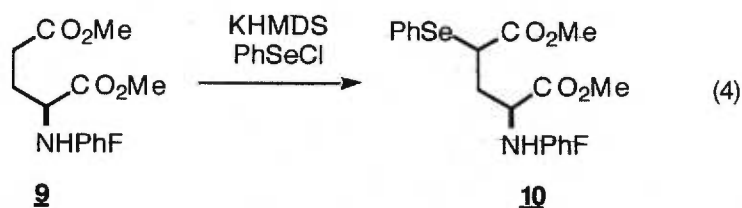
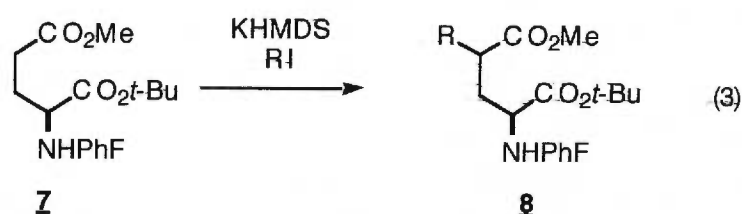
Schéma 2. Réactions régiosélectives des énoates de lithium du glutamate.^{3a,b}



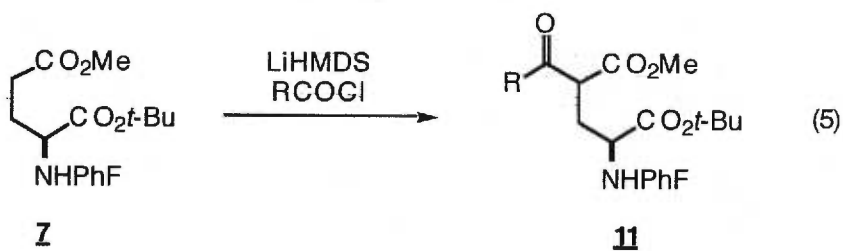
Les énoates de lithium réagissent également avec les oxaziridines pour donner des esters hydroxylés en position γ (équation 2).⁴



Tout comme le groupe protecteur benzyloxycarbonyle, le groupe protecteur de l'amine 9-(9-phénylfluorényle) évite une racémisation du centre α -aminé (une discussion plus approfondie est présentée dans la section 3.5.1). Ainsi, les énolates de potassium sont préférés pour obtenir des bons rendements lors de réactions d'alcoylation avec des iodures d'alcoyles^{3c} (équation 3), tandis qu'ils réagissent également avec le chlorure de phénylsélényle⁵ (équation 4).

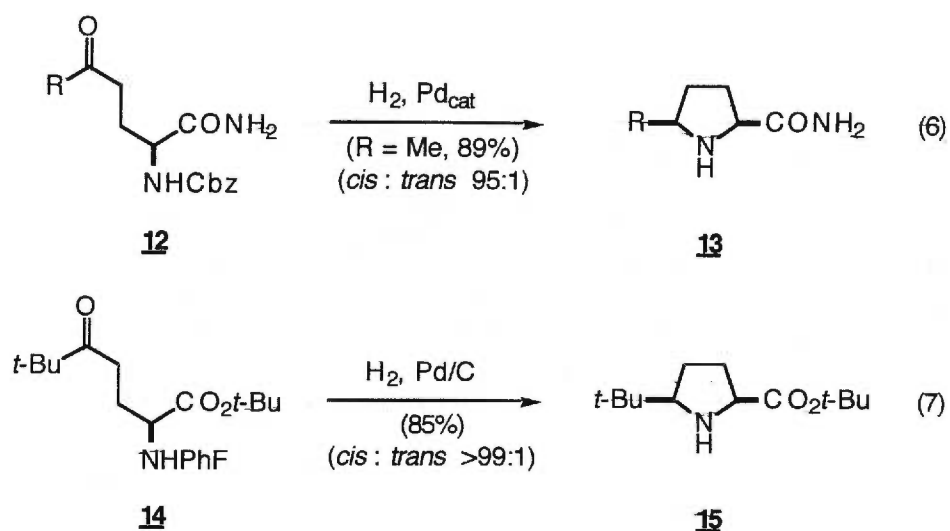


Des acylations régiosélectives de l'énolate de lithium en position γ du glutamate **7** avec divers chlorures d'acides comme électrophiles ont été effectuées avec des bons rendements (équation 5).⁶ Par contre, en utilisant l'énolate de potassium, aucun β -céto ester n'a été isolé.^{6a}

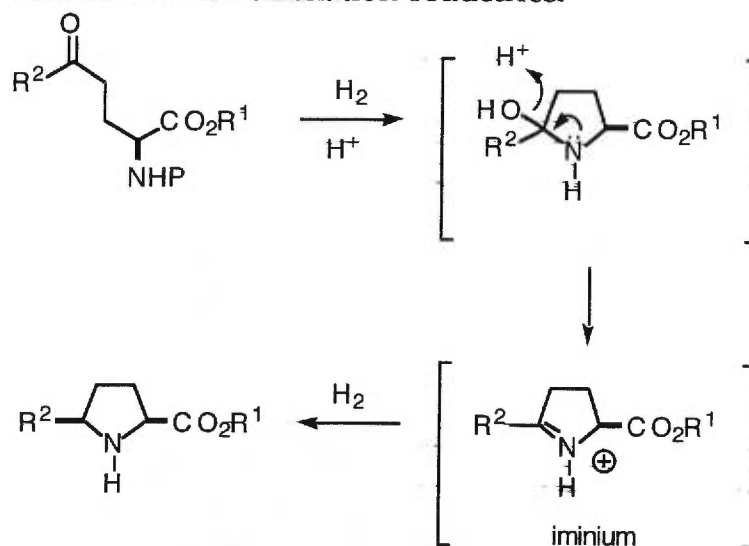


3.3 Amination réductrice: précédents.

Des études précédentes ont montré que l'amination réductrice de dérivés substitués dérivant du glutamate, comme les composés **12** et **14**, a permis les synthèses de prolines substituées (équation 6⁷ et 7⁶).



L'hydrogénation, en présence d'un catalyseur au palladium, procède par la déprotection du groupe 9-(9-phénylfluorényl) et la formation intramoléculaire d'une imine (schéma 3). La protonation puis l'addition d'hydrogène sur la face la moins encombrée de l'ion iminium conduit ensuite à la formation de prolines substituées en position 5 avec une grande sélectivité.

Schéma 3. Mécanisme de l'amination réductrice.

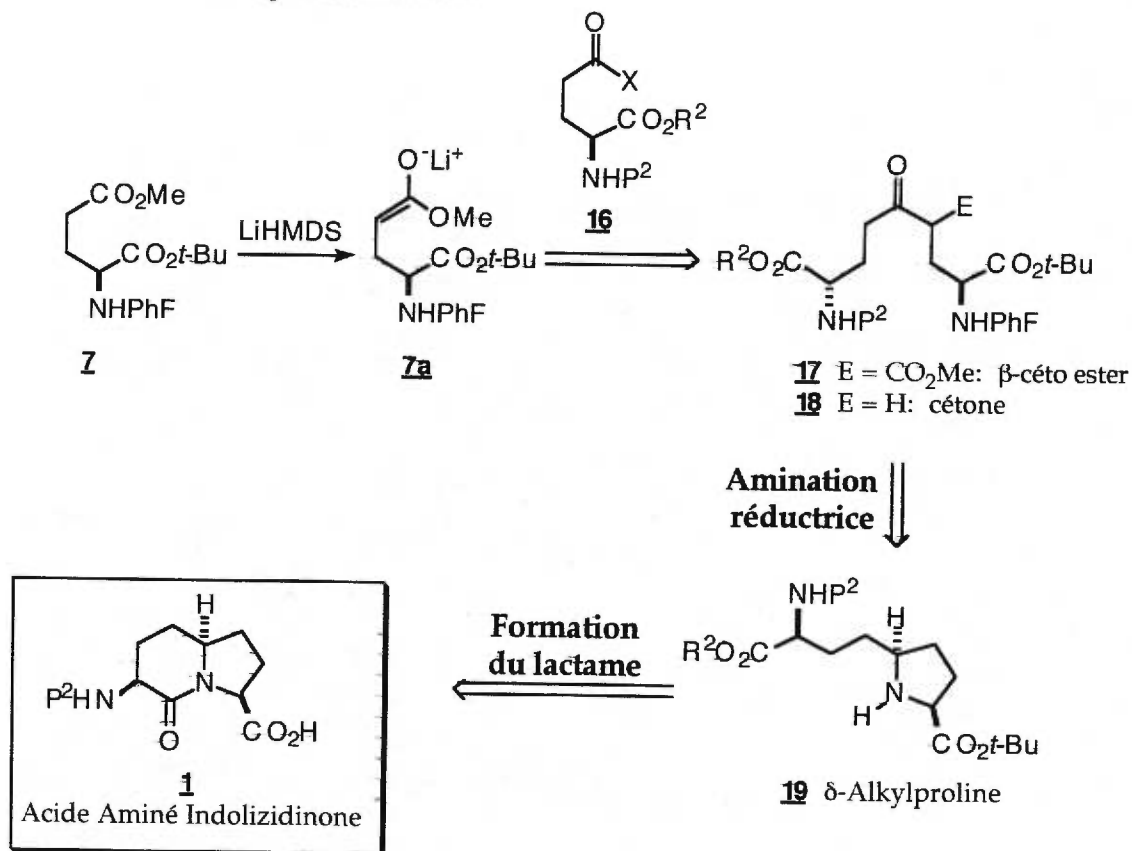
3.4 Stratégie considérée.

La stratégie considérée est présentée sur le schéma 4. Elle repose sur une réaction clé qui est la condensation de deux dérivés de l'acide glutamique **7** et **16** pour conduire au β -céto ester **17**, qui possède le squelette et les fonctions nécessaires à la synthèse de la cible désirée. D'après les précédents décrits, elle prend en compte:

- le choix du groupe 9-(9-phénylfluorényle) comme protection de l'amine du synthon nucléophile, évitant donc la racémisation du centre stéréogène en α ;
- un ester méthylique de l'acide γ du synthon nucléophile, du fait de sa facilité d'hydrolyse lors de la décarboxylation;
- un ester *tert*-butylique de l'acide α du synthon nucléophile, pour induire une diastéréosélectivité lors de l'amination réductrice;

- une liberté dans le choix du synthon électrophile, pour nous donner un éventail de possibilités pour la condensation des deux synthons.

Schéma 4. Stratégie considérée.



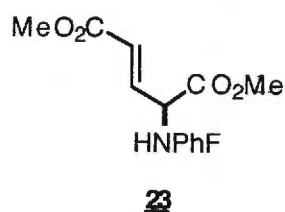
3.5 Préparation des acides α -aminés dicarboxyliques "nucléophiles".

3.5.1 Protection de l'amine.

Le choix du groupe protecteur de l'amine s'est porté sur le groupe 9-(9-phénylfluorényle) (PhF), qui a été développé par Rapoport.⁸ Son précurseur **22** est obtenu en deux étapes à partir de la fluorénone avec un rendement global de 71% (équation 8).^{8c,d}



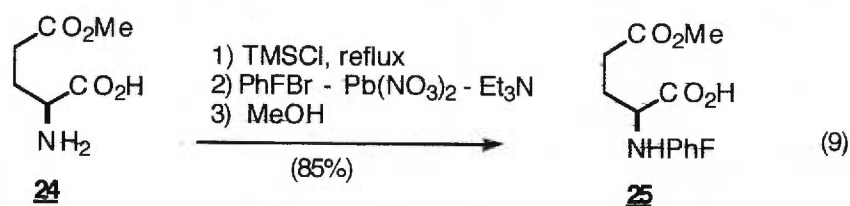
Il permet une énolisation régiosélective de l'ester γ du glutamate **7** sans racémisation du centre α -aminé. Même dans le cas d'un hydrogène plus acide, c'est-à-dire enclin à racémiser, comme celui présent dans le dérivé déhydroglutamate **23**, cet hydrogène est protégé et permet des réactions avec une complète rétention de l'intégrité configurationnelle.⁵



L'encombrement stérique du groupe 9-(9-phénylfluorényle) est aussi pressenti pour protéger l'amine d'une acylation. La modélisation

moléculaire a indiqué que pour des dérivés acides aminés *N*-phénylfluorénylés, l'encombrement du groupe 9-(9-phénylfluorényle) force le carbonyle C₁ à adopter une conformation dans laquelle l'angle dièdre entre l'hydrogène α et le groupe carbonyle est environ 0 ou 180° (donc les orbitales π du groupe carbonyle et les orbitales σ de l'hydrogène α ne sont pas alignées), ce qui pourrait diminuer l'acidité de l'hydrogène en α .⁵ Cette hypothèse a été supportée par des données de rayons X de composés ayant le groupe 9-(9-phénylfluorényle) comme protection de l'amine.^{6b,9} Le développement de ce groupe protecteur a permis la réalisation de synthèses élégantes et efficaces de dérivés du glutamate substitué en position 4.

La protection d'une amine avec le groupe 9-(9-phénylfluorényle) procède d'abord par la protection *in situ* de l'acide avec le chlorure de triméthylsilane (équation 9).^{8e}

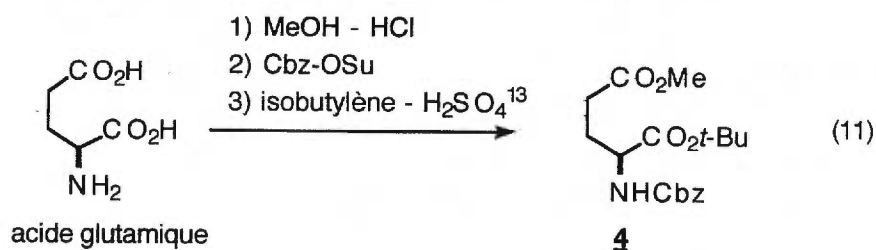
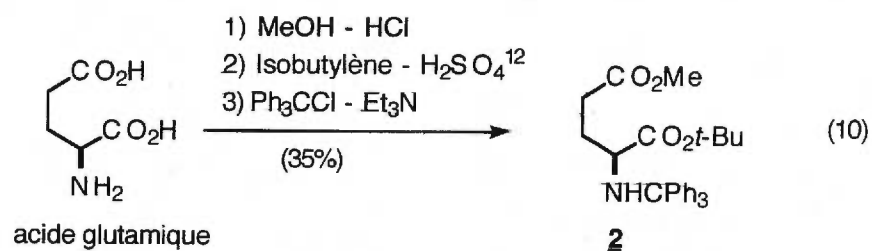


En présence d'une base (triéthylamine), de nitrate de plomb, qui sert à piéger les ions halogénures, et du bromure de 9-(9-phénylfluorényle), l'amine **24** est protégée avec des bons rendements.

Le groupe 9-(9-phénylfluorényle) se déprotège par hydrogénation ou avec l'utilisation d'acides forts tels que l'acide bromhydrique ou l'acide trifluoroacétique.^{8f}

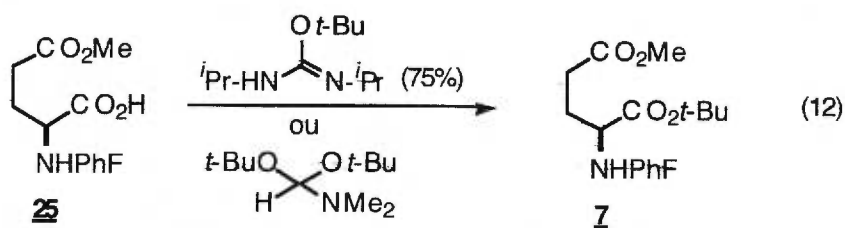
3.5.2 Protection de l'acide carboxylique par un groupe *tert*-butyle et synthèse du *N*-(9-(9-phénylfluorényle)) *L*-glutamate d' α -*tert*-butyle et de γ -méthyle (7).

Tandis qu'il existe de nombreuses méthodes pour introduire un ester *tert*-butylique,¹⁰ l'isobutylène en présence d'acide sulfurique concentré est la méthode la plus utilisée pour la protection des acides aminés.¹¹ Par exemple, les dérivés de l'acide glutamique **2** et **4**^{3a} ont été préparés en trois étapes avec cette méthode pour la formation de l'ester *tert*-butylique (équation 10 et 11).

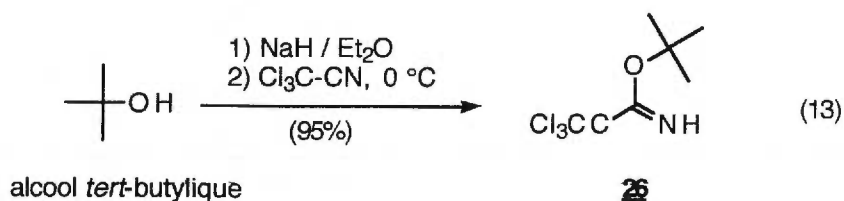


Cependant, entre nos mains, l'estérification du glutamate **25** en utilisant l'isobutylène en présence d'acide sulfurique ou l'acétate de *tert*-butyle en présence d'acide perchlorique¹⁴ n'a donné aucun diester **7**.

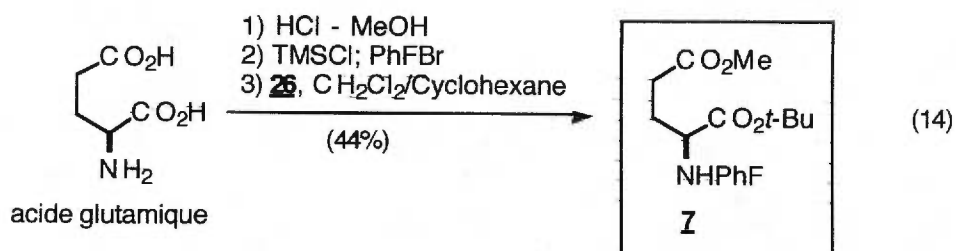
Ces méthodes requièrent soit des acides forts, soit l'isolation des dérivés acyles intermédiaires ou soit le chauffage. Des procédures d'estérification douces ont donc présenté des intérêts importants en synthèse.¹⁵ La formation de l'ester *tert*-butylique **7** a été accomplie en utilisant le *O-tert*-butyl *N,N'*-diisopropylisourée¹⁶ avec un rendement de 75% (équation 12^{3c}). En utilisant le *N,N*-diméthylformamide di-*tert*-butyl acétal¹⁷ pour l'estérification de **25**, des rendements comparables ont été obtenus.^{6a}



Nous avons développé une méthode plus efficace avec l'utilisation du trichloroacétimidate de *tert*-butyle (**26**).¹⁸ Le trichloroacétimidate **26** a été obtenu avec un rendement de 95% (équation 13). En utilisant 400 mol % de **26**, nous avons converti **25** au glutamate **7** avec un rendement de 95% (équation 14, réaction 3).



Ainsi l'acide glutamique est converti au synthon nucléophile choisi, le *N*-(9-(9-phénylfluorényl)) L-glutamate d' α -*tert*-butyle et de γ -méthyle (**7**) en trois étapes avec un rendement global de 44% (équation 14).

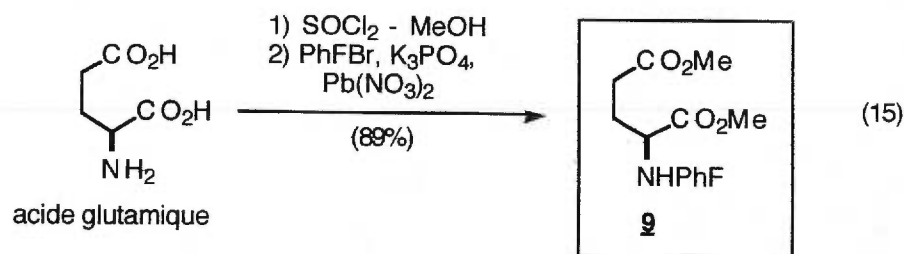


L'acide glutamique est en premier converti à l'ester méthylique en position γ ¹⁹ avec un rendement de 54% (il est à noter qu'un rendement plus élevé (95%) pour la monométhylation est rapporté en utilisant l'acide chlorhydrique gazeux dans le méthanol²⁰). La protection de l'amine est effectuée avec le bromure du 9-(9-phénylfluorényl) (85%) tandis que l'estérification en α est réalisée sur une échelle de 16 g avec un rendement de 81% en utilisant le trichloroacétimide **26**.

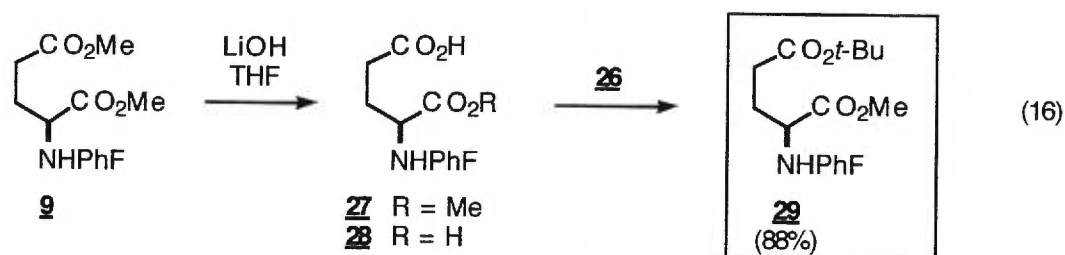
3.5.3 Préparation des autres synthons nucléophiles, dérivés protégés de l'acide L-glutamique.

Si le synthon nucléophile *N*-(9-(9-phénylfluorényl)) L-glutamate d' α -*tert*-butyle et de γ -méthyle (**7**) doit le premier à être pris en considération lors d'une condensation, quatre autres dérivés de l'acide L-glutamique ont été examinés.

Le *N*-(9-(9-phénylfluorényl)) L-glutamate de diméthyle (**9**)^{5,21} a été préparé en deux étapes à partir de l'acide glutamique avec un rendement global de 88% (équation 15).



Le *N*-(9-(9-phénylfluorényl)) L-glutamate de γ -*tert*-butyle α -méthyle (**29**) a été préparé en deux étapes à partir du glutamate de diméthyle **9** (équation 16).

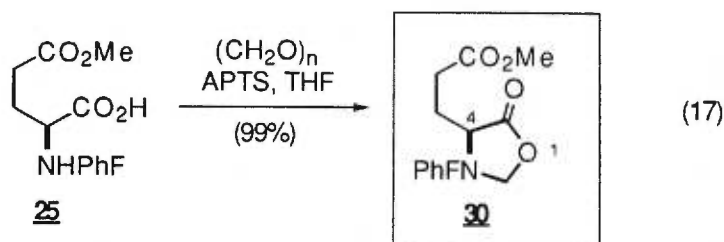


Une hydrolyse régiosélective de l'ester méthylique en position γ de **9** avec 1.2 équivalents d'hydroxyde de lithium dans le tétrahydrofurane conduit à l'acide *N*-(9-(9-phénylfluorényle)) L-glutamate d' α -méthyle (**27**) avec un rendement de 65% (93%) (tableau 1, entrée 2). L'acide **27** est facilement séparé du glutamate de diméthyle **9** de départ par extraction et est ensuite converti à l'ester *tert*-butylique **29** avec le trichloroacétimide de *tert*-butyle **26**¹⁸ avec un bon rendement.

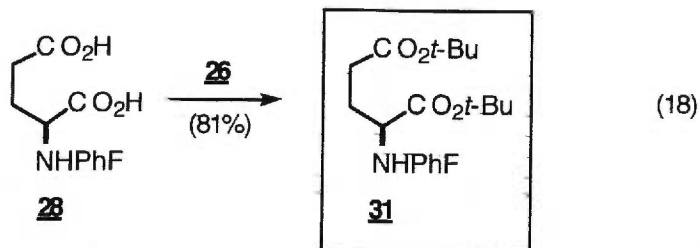
Tableau 1. Hydrolyse du *N*-(9-(9-phénylfluorényle)) L-glutamate de diméthyle (**9**).

entrée	n _{eq.} LiOH	Rendements		
		9	27	28
1	1	68	32	-
2	1.2	30	65	-
3	1.5	30	60	5
4	2	10	60	20

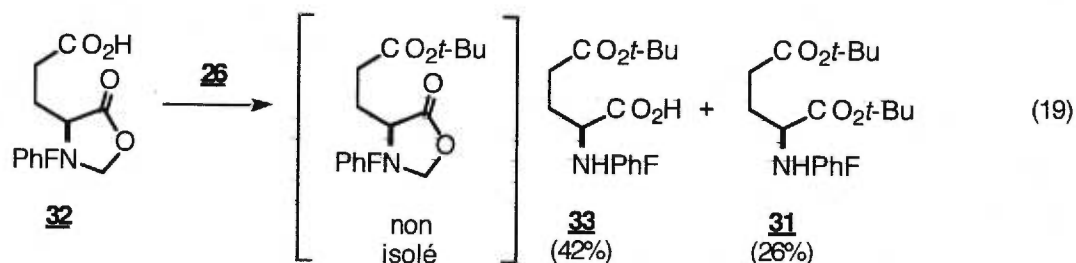
Le (4*S*) 4-(propionate de méthyl-3') 3-*N*-(9-(9-phénylfluorényle)) 5-oxo oxazolidine (**30**) a été préparé à partir du glutamate d' α -méthyle **25** avec un rendement quantitatif en utilisant la paraformaldéhyde aqueuse ((CH₂O)_n) et une quantité catalytique d'acide *p*-toluènesulfonique²² (équation 17).



Le *N*-(9-(9-phénylfluorényl)) L-glutamate de di-*tert*-butyle (**31**) a été préparé à partir de l'acide *N*-(9-(9-phénylfluorényl)) L-glutamique (**28**) avec un rendement de 81% en utilisant l'acétimide **26** (équation 18).



Le *N*-(9-(9-phénylfluorényl)) L-glutamate de di-*tert*-butyle (**31**) a également été obtenu lors du traitement de l'oxazolidine **32**²³ avec l'acétimide **26** (équation 19).



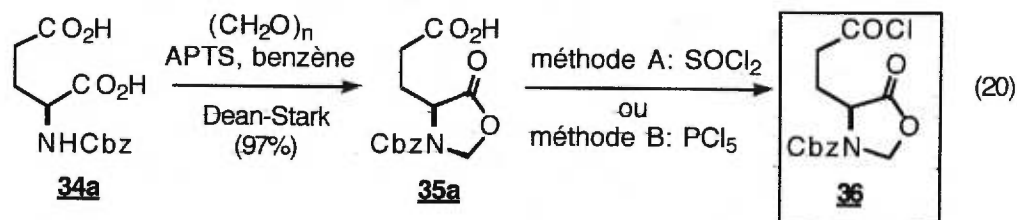
3.6 Préparation des acides α -aminés dicarboxyliques "électrophiles".

Pour le synthon électrophile, plusieurs dérivés de l'acide L-glutamique ont été pris en considération. Trois fonctions ont été retenues pour les dérivés **16** (schéma 4 de la section 3.4) où X peut être

- un chlorure d'acide;
- un imidazolide;
- un anhydride (avec le carboxylate α);
- un ester.

3.6.1 Les chlorures d'acides comme synthon électrophile.

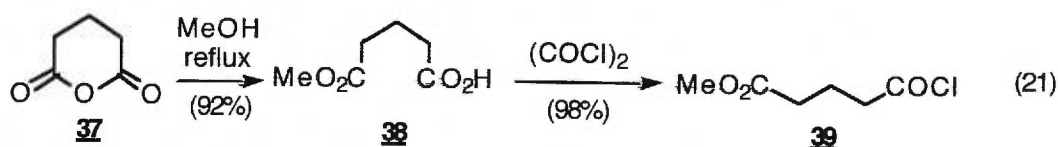
Le premier dérivé électrophile considéré est le (4S) 4-(chlorure de propanoyl-3') 3-N-benzyloxycarbonyl 5-oxo oxazolidine (**36**)²⁴ (équation 20).



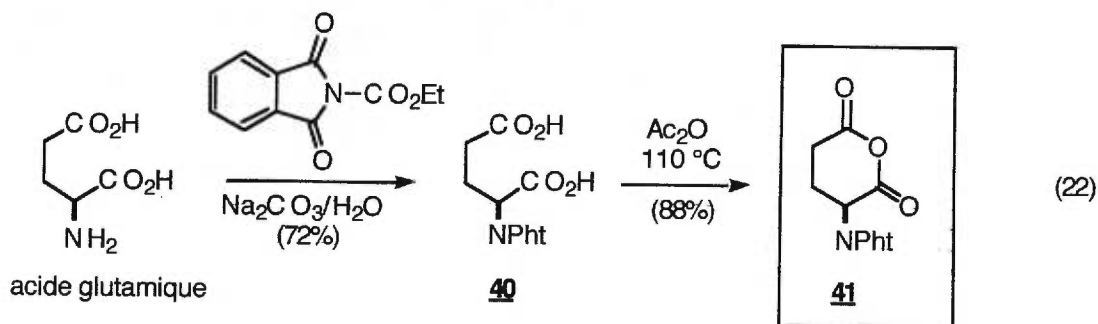
L'oxazolidine cristalline **35a** est préparée avec un haut rendement avec la paraformaldéhyde^{24a} et une quantité catalytique d'acide *p*-toluènesulfonique sous enlèvement azéotropique de l'eau à partir de **34a**.^{25a} Deux méthodes peuvent être employées pour la formation du chlorure d'acide: le chlorure de thionyle^{24d} (méthode A) ou le pentachlorure de phosphore^{24b} (méthode B). Dans les deux cas, le (4S) 4-

(chlorure de propanoyl-3') 3-*N*-benzyloxycarbonyl 5-oxo oxazolidine (**36**) est obtenu quantitativement sous forme cristalline. Comme le composé **36** est instable et très hygroscopique, il a été directement utilisé sans purification.

Afin d'étudier la condensation d'un chlorure d'acide sur le glutamate **7**, le 4-(chloroformyl) butanoate de méthyle (**39**) a été choisi comme modèle. Le chlorure d'acide **39** a été obtenu en deux étapes à partir de l'anhydride glutarique (**37**) avec un rendement de 90% (équation 21). Le glutarate de monométhyle **38**, obtenu par ouverture et monoestérification de **37** dans le méthanol à reflux,²⁶ a été converti au chlorure d'acide désiré **39** par réaction avec le chlorure d'oxalyle.²⁷



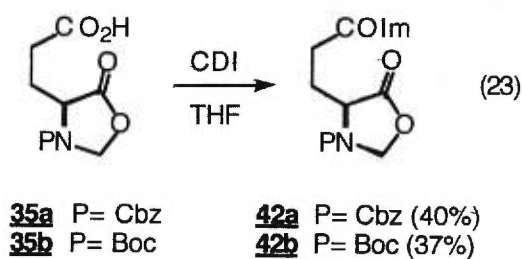
3.6.2 Les anhydrides comme synthon électrophile.



Utilisé par Nagai²⁸ lors de sa synthèse du thiazabicyclic BTB (voir la synthèse présentée dans le chapitre 1 dans la section 1.6.1), l'anhydride

N,N-phtalimido L-glutamique (**41**) est très réactif et facile à obtenir et à manipuler. L'anhydride **41** a été obtenu en deux étapes à partir de l'acide glutamique avec un rendement de 63% (équation 22). L'acide *N,N*-phtalimido L-glutamique **40**, obtenu par réaction de l'acide L-glutamique avec le *N*-carboéthoxy phtalimide en présence de carbonate de sodium^{29a} a été converti à l'anhydride désiré par réaction avec l'anhydride acétique à 110 °C.^{30a} De plus, afin d'étudier la condensation d'un anhydride sur le glutamate **7**, l'anhydride glutarique **37** a été choisi comme modèle.

3.6.3 Les imidazolides comme synthon électrophile.



Les dérivés imidazolides ont été également considérés comme synthon électrophile. Les dérivés imidazolides **42a** et **42b**^{31a} sont obtenus par traitement des oxazolidines **35a** et **35b** avec le carbonyle diimidazole³² (équation 23). Les faibles rendements semblent s'expliquer par l'instabilité de l'imidazole sur la silice avec laquelle ils ont été purifiés.

3.6.4 Les esters comme synthon électrophile.

La dernière famille de dérivés électrophiles qui peut être considérée est celle des esters avec l'utilisation des dérivés "nucléophiles" eux-mêmes.

3.7 La condensation des dérivés "nucléophiles" et "électrophiles".

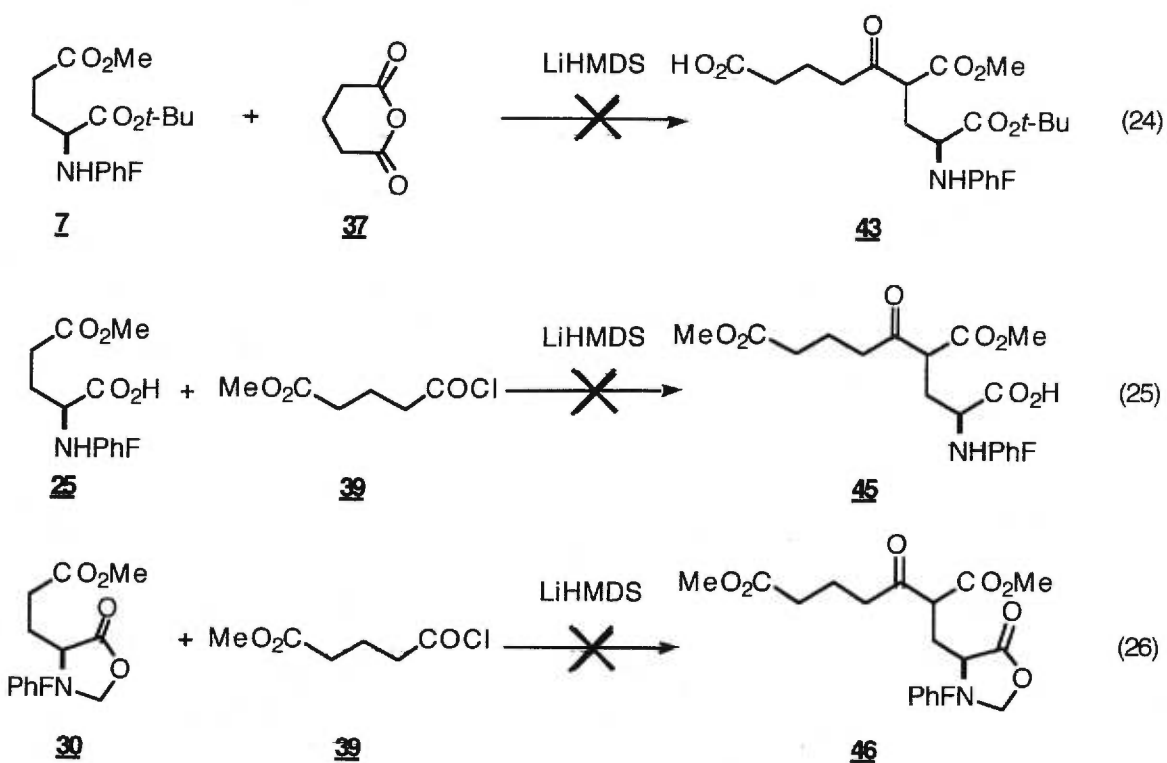
Ayant en main des synthons nucléophiles et électrophiles, modèles ou désirés, la condensation des deux fragments pouvait être essayée.

3.7.1 *Approche modèle.*

La première condensation essayée fut entre le glutamate **7** et l'anhydride glutarique **37** (équation 24). L'énolate γ -régiospécifique est généré par traitement de **7** avec la base LiHMDS dans le THF à une concentration de 0.2 molaire pendant 1 heure à -78 °C. L'énolate ainsi formé est ajouté lentement sur l'anhydride **37** (addition inverse). Après traitement de la réaction, une chromatographie sur couche mince (CCM) a révélé la présence d'un mélange complexe de produits de la réaction dont trois d'entre eux semblaient majoritaires. La purification sur gel de silice a permis d'isoler ces trois produits. L'examen par la spectroscopie de la résonance magnétique nucléaire (RMN) a indiqué que le premier produit était le glutamate **7** (18%), que le deuxième, **44** (34%), ne correspondait pas au produit attendu **43**, tandis que la RMN du dernier n'apportait aucune information intéressante (20%).

L'acylation du glutamate **7** avec le chlorure de pivaloyle donne d'excellents résultats.^{7b} Cependant, l'application des mêmes conditions expérimentales avec le 4-(chloroformyle) butanoate de méthyle (**39**), que ce

soit avec le glutamate **25** (équation 25) ou avec l'oxazolidine **30** (équation 26), n'a pas conduit à des résultats interprétables.

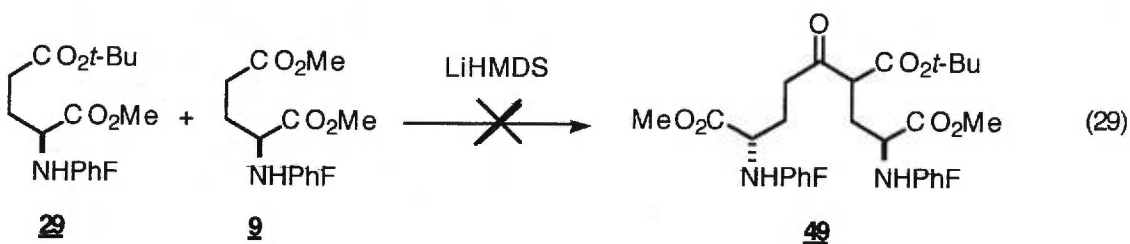
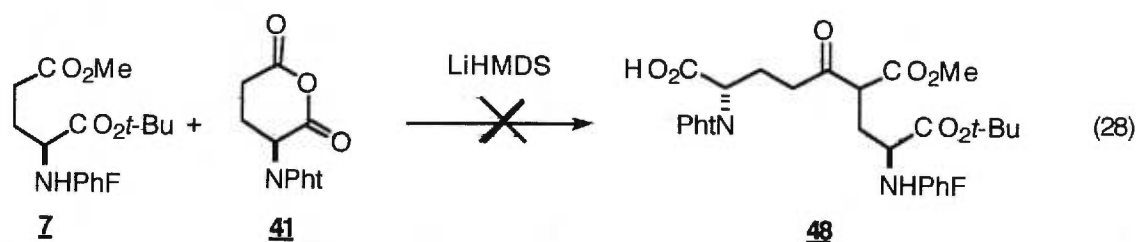
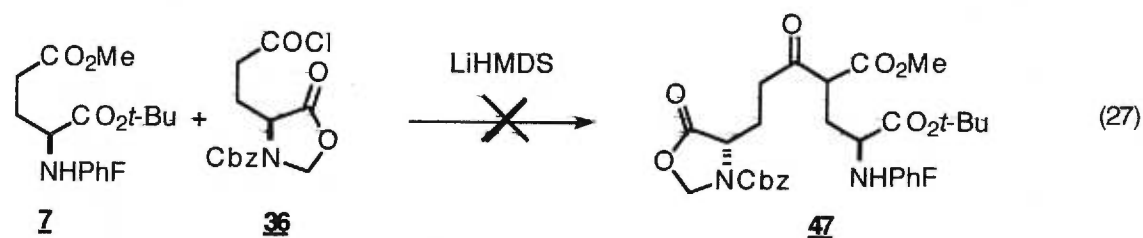


3.7.2 Condensation mixte.

Pas plus que les réactions modèles, les trois condensations mixtes essayées n'ont donné de résultats concrets au niveau des produits désirés de réactions.

Trois condensations ont été faites en suivant la procédure utilisée lors de la condensation entre le glutamate **7** et l'anhydride glutarique **37** (équation 24). Les mêmes résultats expérimentaux ont été observés lors des

condensations entre **7** et **37** ou entre **7** et **41** (équations 27 et 28): la chromatographie sur couche mince (CCM) a révélé la présence d'un mélange complexe de produits de la réaction dont trois d'entre eux semblaient majoritaires; parmi ceux-ci, le second produit majoritaire, **44**, (~30%) correspondait de façon identique à celui obtenu dans la réaction entre **7** et **37** (équation 24).



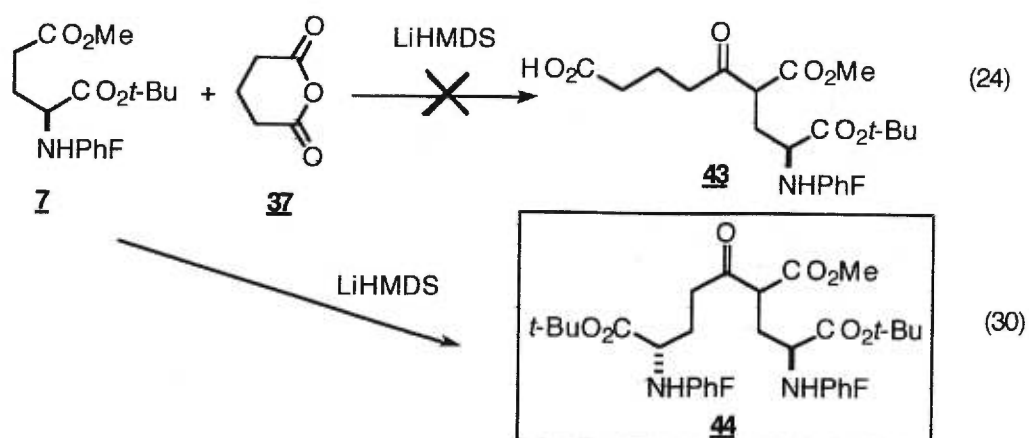
Lors de la troisième condensation (équation 29), aucune réaction n'a été observée par CCM. A cette étape, et malgré les succès, une constatation importante et intéressante s'impose: le même dérivé nucléophile réagit de la même manière et dans les mêmes conditions de réaction avec trois électrophiles différents pour donner un même

composé **44** (équations 24, 27 et 28). Il semble donc que seul le glutamate **7**, en présence de la base, réagisse pour donner un nouveau produit, **44**.

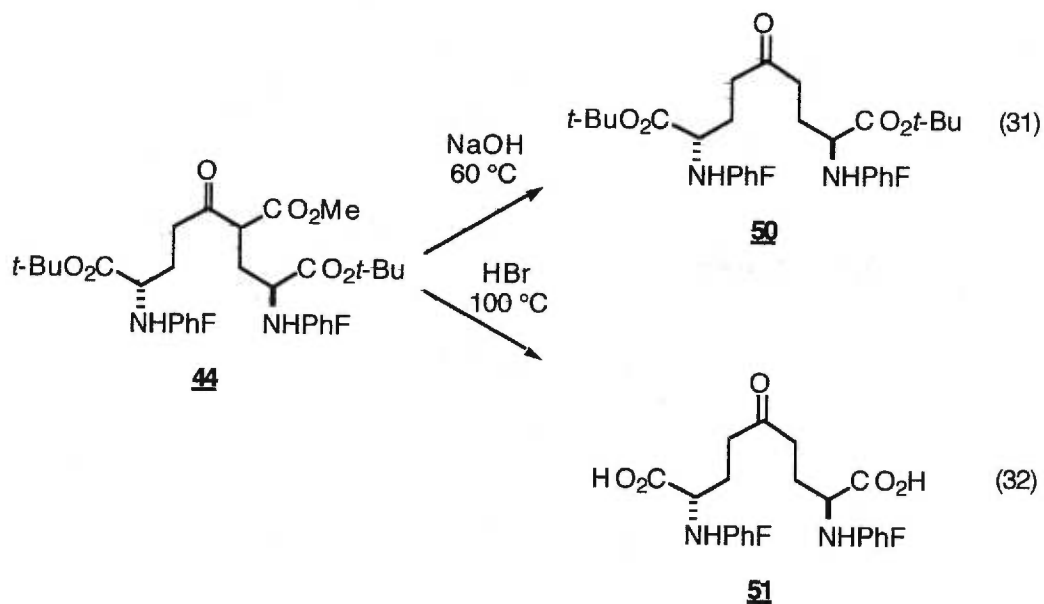
3.7.3 Interprétations.

Afin de tenter d'interpréter les résultats obtenus, des réactions dérivées ont été essayées sur le produit majoritaire, **44**, isolé de la réaction entre le glutamate **7** et l'anhydride **37** (équation 24). Dans l'hypothèse que le produit attendu **43** était un acide, la protection en ester *tert*-butylique fut essayée. Aucun nouveau produit ne fut détecté par CCM lors de la réaction de **44** avec l'acétimidate de *tert*-butyle (**26**). Le composé **44** ne possédant pas de fonction acide, cette expérience démontrait qu'il n'y avait pas eu de condensation entre le dérivé glutamate et l'anhydride. Une expérience complémentaire a confirmé cette hypothèse. La même procédure de condensation a été utilisée avec l'anhydride succinique. Le spectre RMN du produit majoritaire isolé fut identique à celui obtenu lors de la réaction avec l'anhydride glutarique.

Après un examen plus approfondi des spectres RMN du proton et du carbone de **44** et tenant compte du résultat précédent, une hypothèse fut avancée: le glutamate **7**, en présence de la base et lors de la formation de l'énolate, se condensait sur lui-même pour donner le β -céto ester (2*S*, 4*R,S*, 8*S*)-4-carbométhoxy-5-oxo-2,8-di-[*N*-(9-phényl-9-fluorényl)amino] azélate de di-*tert*-butyle (**44**, équation 30).



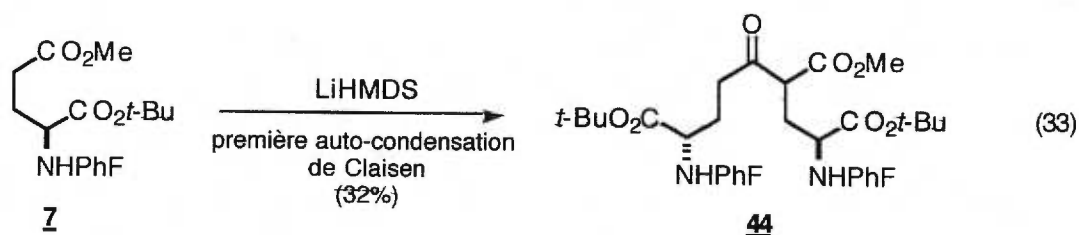
Pour confirmer cette hypothèse, deux réactions ont été faites sur le mélange réactionnel donnant le β -céto ester **44**. La décarboxylation de **44** avec l'hydroxyde de sodium à reflux dans le méthanol a donné le (2*S*, 8*S*)-5-oxo-2,8-di-[*N*-(9-phényl-9-fluorényl)amino]azélate de di-*tert*-butyle (**50**) avec un rendement modeste de 15% (équation 31). En présence d'acide bromhydrique à 100 °C, l'hydrolyse de **44** a donné le (2*S*, 8*S*) 5-oxo-2,8-di-[*N*-(9-phényl-9-fluorényl)amino]azélate (**51**, équation 32).



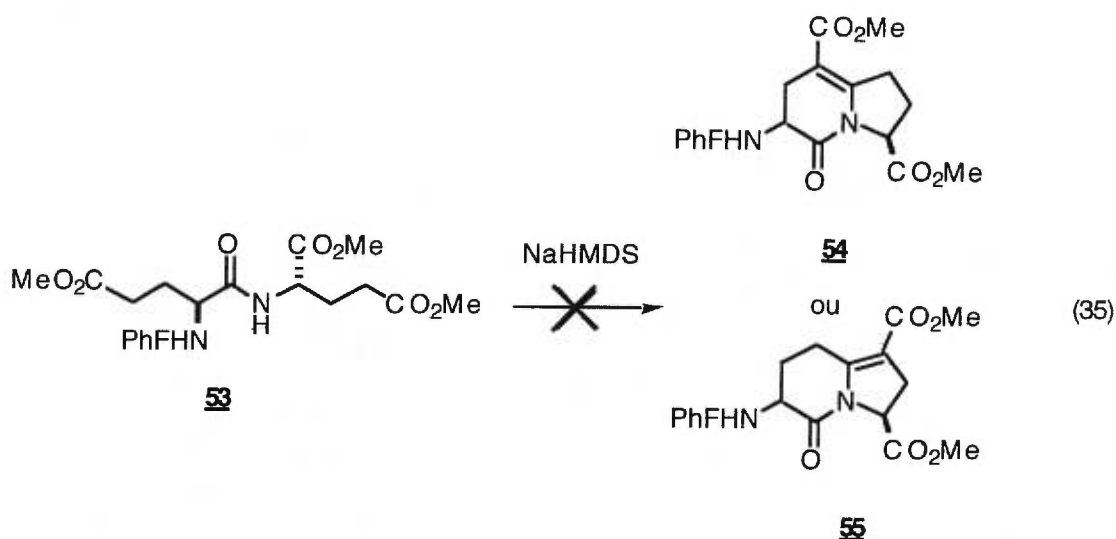
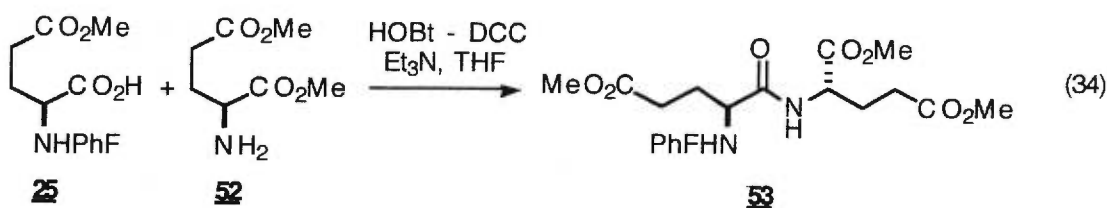
Ces expériences ont donné la preuve de la synthèse du β -céto ester **44**, composé qui s'intègre parfaitement dans la stratégie prévue. Il restait à démontrer qu'il pouvait s'obtenir directement avec la simple addition de la base.

3.7.4 Modification.

La première auto-condensation du glutamate **7**, à une concentration de 0.15 molaire dans le THF et à $-78\text{ }^\circ\text{C}$, a été effectuée en ajoutant **7** à la base (LiHMDS) (équation 34). Après traitement de la réaction, la CCM a révélé la présence du composé désiré **44** (32% après purification) qui a été caractérisé par RMN.



Dans l'espoir d'effectuer cette condensation de façon intramoléculaire, le dipeptide γ -méthyl *N*-(9-(9-phénylfluorényl)) L-glutamyl de γ -méthyl L-glutamate de diméthyle (**53**) a été préparé avec un rendement de 81% (équation 35).^{25b} La condensation intramoléculaire de **54** en présence de LiHMDS n'a pas donné les résultats espérés. Aucune réaction n'a été observée par CCM.



3.8 Conclusion.

Avec cette dernière réaction, impliquant l'auto-condensation du *N*-(9-(9-phénylfluorényle)) L-glutamate d' α -*tert*-butyle et de γ -méthyle sur lui-même, la réaction la plus délicate vient d'être élégamment contournée à notre profit. De plus, la stratégie considérée vient de s'améliorer car il n'est plus nécessaire de synthétiser deux dérivés acides aminés protégés différents. Disposant donc du composé ayant le squelette et les fonctions désirées, la synthèse de la cible désirée, c'est-à-dire l'acide aminé azabicyclique (3*S*, 6*S*, 9*S*)-méthyl 2-oxo-3-*N*-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylique, a donc été entreprise avec un bon espoir de réussite. Elle est présentée dans le chapitre suivant.

3.9 Partie expérimentale.

Notes générales.

Toutes les réactions et les distillations nécessitant des conditions anhydres ont été effectuées sous atmosphère d'azote ou d'argon. Les solvants distillés ou les réactifs ont été transférés par seringue. Le 1,1,1,3,3,3-hexaméthylidisilazane, le dichlorométhane et l'acétonitrile ont été distillés sur de l'hydrure de calcium. Le tétrahydrofurane (THF), l'éther d'éthyle (Et₂O) et le toluène ont été séchés et distillés sur sodium en présence de benzophénone. La pyridine et la triéthylamine ont été distillées sur oxyde de barium et conservées sur hydroxyde de potassium. Le chloroforme a été séché et distillé sur pentoxyde de phosphore (P₂O₅). Le méthanol a été séché et distillé sur tournures de magnésium. Le DMF a été distillé et conservé sur tamis moléculaire 4Å. Les autres solvants utilisés étaient de qualité "réactif". Le bromobenzène, le chlorotriméthylsilane (TMSCl), le chlorure d'acétyle, le chlorure de thionyle, l'alcool *tert*-butylique, l'anhydride acétique et le trichloroacétonitrile ont été distillés avant utilisation. Les solvants employés dans les procédures d'isolement, de chromatographie et de recristallisation comme l'acétate d'éthyle, l'hexane, le dichlorométhane et le chloroforme ont été distillés avant utilisation. Les autres solvants, tels que l'acétone, le méthanol et l'éther éthylique, étaient de qualité dite spectroscopique.

La chromatographie sur couche mince (CCM) a été effectuée à l'aide de plaques d'aluminium (2 x 6 cm) recouvertes de gel de silice imprégné

d'un indicateur de fluorescence (Merck 60 F254, 0.2 mm). Après élution, les produits ont été détectés à l'aide des révélateurs suivants: la lumière ultraviolette, l'iode et une solution de ninhydrine dans l'éthanol. La chromatographie sur colonne, effectuée comme décrite par Still,³³ a été de type "flash" et a utilisé un gel de silice Merck 9385 (40-63 μm ; 230-240 mesh). Tous les composés purifiés par chromatographie étaient suffisamment purs (par RMN ^1H) pour être utilisés dans les réactions suivantes.

Les points de fusion des composés solides ont été mesurés sur un appareil Thomas Hoover et n'ont pas été corrigés. Le pouvoir rotatoire spécifique ($[\alpha]_D^{20}$) des composés optiquement actifs a été enregistré sur un polarimètre Perkin Elmer 241 à une longueur d'onde de 589 nm (raie D du sodium). Toutes les mesures ont été effectuées à la température ambiante et la concentration a été exprimée en g/100 mL.

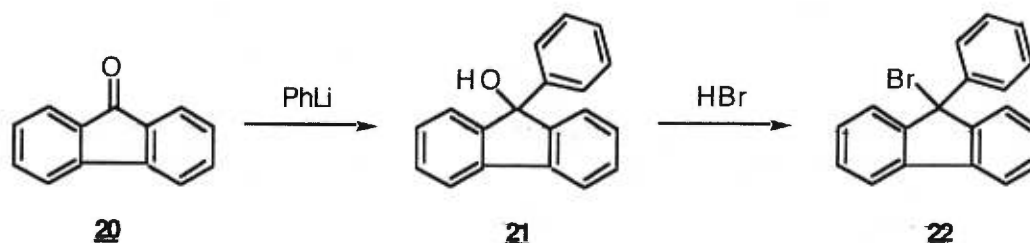
Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton (^1H) et du carbone (découplé des protons) (^{13}C) ont été enregistrés sur les appareils Bruker AMX-300 (300 MHz et 75 MHz) et Bruker ARX-400 (400 MHz et 100 MHz). Sans indication notée, les spectres proton et carbone ont été enregistrés dans du chloroforme deutéré. Tous les déplacements chimiques ont été exprimés en ppm (échelle δ) par rapport à une référence interne provenant du solvant résiduel non deutéré (chloroforme: δ 7.27 et 77 ppm; méthanol: δ 3.31 et 49.15 ppm; acétone δ 2.05 et 29.92 ppm) ou provenant de l'addition d'un faible pourcentage de tétraméthylsilane ($(\text{CH}_3)_4\text{Si}$). Les déplacements chimiques des protons aromatiques du

groupe protecteur 9-(9-phénylfluorényle) n'ont pas été rapportés en ^{13}C . L'analyse des spectres RMN a été présentée en spécifiant le déplacement chimique du système suivi de la multiplicité, de l'intégration, de la constante de couplage et de l'assignation. Tous les systèmes ont été analysés en première approximation comme des systèmes de premier ordre. Les symboles employés pour décrire l'apparence des signaux en RMN du proton ont été les suivants: *s*: singulet, *d*: doublet, *t*: triplet, *q*: quadruplet, *m* : multiplet, *dd*: doublet de doublets, *ddd*: doublet de doublets dédoublé, *dddd*: doublet de doublets de doublets dédoublé, *dm*: doublet de multiplets, *dt* doublet de triplets dédoublé, *qd* quadruplet dédoublé, *td*: triplet dédoublé, *l*: signal large. Les spectres DEPT ("Differentially Enhanced Polarization Transfer" DEPT- 135° - ^{13}C) ont été obtenus aux mêmes fréquences que celles employées pour la RMN du carbone et les déplacements chimiques exprimés de la même façon. Les signaux obtenus employant cette technique sont positifs (+) dans le cas des méthyles (CH_3) et des méthynes (CH), négatifs (-) dans le cas des méthylènes (CH_2) ou absents (0) dans le cas des carbones quaternaires.

Les spectres de masse ont été effectués par le laboratoire régional de spectrométrie de masse du Département de Chimie de l'Université de Montréal. Les spectres de masse de basse résolution (SM) ont été enregistrés sur les spectromètres VG Micromass 1212 et AEI-MS 902 par les techniques d'ionisation chimique (IC), d'impact électronique (IE) ou de "Fast Atom Bombardment" (FAB). Les masses exactes, obtenues à haute résolution (SMHR), ont été mesurées à l'aide des techniques d'IE à 70 eV ou de FAB sur les spectromètres AEI-MS 902 et Kratos MS-50 TCTA. Les

masses exactes employées pour les calculs de masses moléculaires ont été les suivantes: H = 1.0078246, C= 12.000, N= 14.0037032, O = 15.9949141.

Bromure du 9-(9-phénylfluorényle) (22).^{8d}

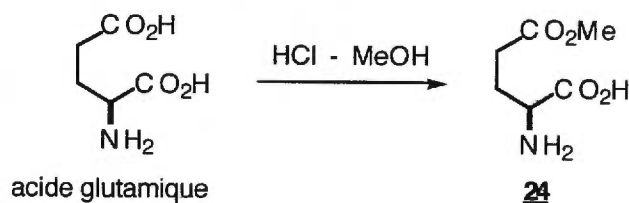


Le composé **22** a été préparé en deux étapes comme décrit dans la référence 8d.

9-(9-Phénylfluorénol) (21): pf 107-108 °C (lit.: 107-108 °C^{8d}).

Bromure du 9-(9-phénylfluorényle) (22, 45.7 g, 71% depuis 20); pf 99 °C (lit.: 99 °C^{8d}).

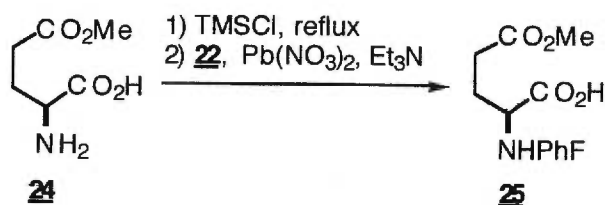
Acide L-glutamate de γ -méthyle ((2S)-24).¹⁹



Le composé **24** a été préparé comme décrit dans la référence 19.

Acide L-glutamate de γ -méthyle ((2S)-24, 21.6 g, 54%): $R_f = 0.2$ (4:1:1 *n*-BuOH:AcOH:H₂O); pf 185 °C (lit.: 182 °C¹⁵); $[\alpha]_D^{20} +13.4^\circ$ (*c* 1.0, H₂O).

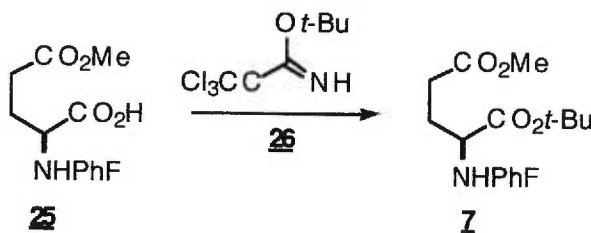
Acide N-(9-(9-phénylfluorényle)) L-glutamate de γ -méthyle ((2S)-25).^{8b}



Le composé **25** a été préparé comme décrit dans la référence 8b.

Acide N-(9-(9-phénylfluorényle)) L-glutamate de γ -méthyle ((2S)-25, 10.4 g, 85%): $R_f = 0.65$ (2:1 AcOEt:hexane); pf 144 °C (lit.: 142-143 °C^{9b}); $[\alpha]_D^{20} -77^\circ$ (*c* 0.7, CHCl₃).

N-(9-(9-phénylfluorényle)) L-glutamate d' α -*tert*-butyle et de γ -méthyle ((2S)-7).^{18b,c}



Trichloroacétimidate de *tert*-butyle (26).^{18a} Dans de l'éther éthylique anhydre (10 mL), on ajoute l'hydrure de sodium (0.410 g, 10.5 mmol, 60%

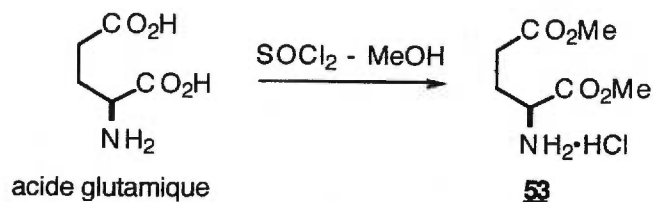
dans l'huile). L'alcool *tert*-butylique (10.4 mL, 110 mmol) est ensuite additionné goutte à goutte sous agitation et atmosphère inerte. Après 20 minutes, le solide s'est dissout et la solution est refroidie à 0 °C. Le trichloroacétonitrile (10 mL, 100 mmol) est additionné goutte à goutte pendant 15 minutes, puis le milieu réactionnel est agité pendant 1 heure à la température de la pièce. Il est ensuite concentré jusqu'à une huile et du pentane (10 mL) contenant du méthanol anhydre (0.4 mL, 10 mmol) est additionné suivi d'une agitation vigoureuse. La solution est alors filtrée puis évaporée. Le filtrat obtenu est lavé avec du pentane (2 × 10 mL). Le trichloroacétimide est obtenu comme un liquide clair et il est conservé au réfrigérateur dans du cyclohexane (2 mL / 1mmol).

Trichloroacétimide de *tert*-butyle (**26**, 20.65 g, 95%); $R_f = 0.26$ (1:5 AcOEt:hexane); $^1\text{H RMN}$: δ 1.58 (s, 9 H).

A une solution d'acide *N*-(9-(9-phénylfluorényle) L-glutamate de γ -méthyle (**25**, 16.1 g, 40 mmol) dans du dichlorométhane (40 mL, 1 mL/mmol) est additionné le trichloroacétimide de *tert*-butyle (**26**, 17.5 g, 80 mmol, 200 mol %) dans du cyclohexane (160 mL, 2 mL / mmol). La solution est agitée pendant trois jours à la température de la pièce. Le précipité formé est éliminé par filtration. On ajoute de nouveau 200 mol % de trichloroacétimide de *tert*-butyle (**26**, 17.5 g, 80 mmol, 200 mol %) dans du cyclohexane (160 mL, 2 mL/mmol) et la solution est agitée pendant deux jours. Le précipité formé est éliminé par filtration. Le filtrat obtenu est concentré sous pression réduite pour donner un solide jaune. Le résidu obtenu est chromatographié sur gel de silice (éluant: 1:9 acétate d'éthyle:hexane) pour obtenir un solide blanc qui est alors recristallisé dans de l'isooctane.

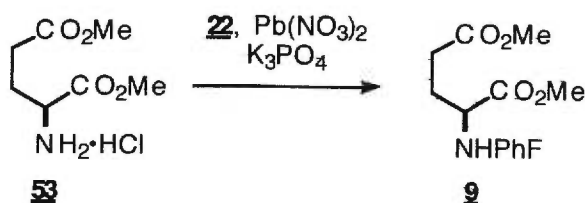
N-(9-(9-phénylfluorényl)) L-glutamate d' α -tert-butyle et de γ -méthyle ((2S)-7, 14.8 g, 81%): $R_f = 0.55$ (1:5 AcOEt:hexane), $R_f = 0.50$ (1:9 AcOEt:hexane); pf 99-100 °C (lit.: 100 °C^{8b}); $[\alpha]_D^{20} -246^\circ$ (c 1.1, CHCl₃); SMHR: masse calculée pour C₂₉H₃₂NO₄ (MH⁺) 458.2331, trouvée 458.2352.

Chlorhydrate du L-glutamate de diméthyle ((2S)-53).^{21a}



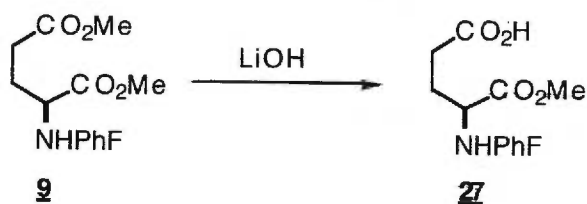
Le composé **53** a été préparé en suivant la procédure décrite pour la synthèse du chlorhydrate du L-aspartate de diméthyle décrite dans la référence 21a en utilisant l'acide L-glutamique (100 mmol, 14.7 g). Le produit obtenu est trituré dans un mélange éther éthylique:hexane pour obtenir un solide blanc. Il est alors filtré et séché.

Chlorhydrate du L-glutamate de diméthyle ((2S)-53, 21.2 g, 98%): $R_f = 0.59$ (4:1:1 *n*-BuOH:AcOH:H₂O); pf 89 °C (lit.: 89-90 °C^{34a}); $[\alpha]_D^{20} +27.0^\circ$ (c 5.0, H₂O) (lit.^{34a}: $[\alpha]_D^{20} +26^\circ \pm 0.5$ (c 5.0, H₂O)).

***N*-(9-(9-phénylfluorényl)) L-glutamate de diméthyle ((2*S*)-9).^{21a}**

Le composé **9** a été préparé en suivant la procédure décrite pour la synthèse du *N*-(9-(9-phénylfluorényl)) L-asparte de diméthyle décrite dans la référence 21a en utilisant le chlorhydrate du L-glutamate de diméthyle (**53**, 10.7 g, 50.3 mmol). Le produit obtenu est chromatographié sur gel de silice (éluant: 1:8 acétate d'éthyle:hexane) pour obtenir un solide blanc qui est alors recristallisé dans un mélange chloroforme:hexane.

***N*-(9-(9-phénylfluorényl)) L-glutamate de diméthyle ((2*S*)-9**, 18.9 g, 90%): $R_f = 0.55$ (1:5 AcOEt:hexane), $R_f = 0.35$ (1:9 AcOEt:hexane); pf 62 °C; $[\alpha]_D^{20} -293.3^\circ$ (c 1.1, CHCl_3); $^1\text{H RMN}$: δ 1.72-1.89 (m, 2 H, CH_2 β), 2.39-2.57 (m, 2 H, CH_2 γ), 2.68 (m, 1 H, CH α), 3.04 (s, 1 H, NH), 3.29 (s, 3 H, OMe α), 3.66 (s, 3 H, OMe γ), 7.10-7.70 (m, 13 H, CH Ar PhF); $^{13}\text{C RMN}$ δ 29.6 (CH_2 β), 30.1 (CH_2 γ), 51.2 (OMe), 51.3 (OMe), 54.6 (CH α), 72.6 (C_q PhF), 173.3 (CO_2Me α), 176.1 (CO_2Me γ); SMHR: masse calculée pour $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{NO}_4$ (MH^+) 416.1878, trouvée 416.1862.

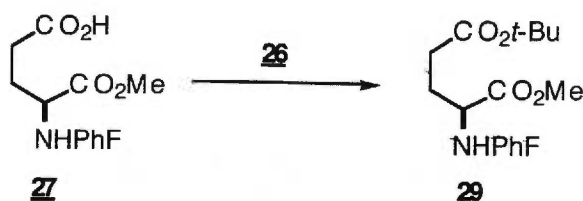
Acide *N*-(9-(9-phénylfluorényl)) L-glutamate d' α -méthyle ((2*S*)-27).

A une solution de *N*-(9-(9-phénylfluorényl)) L-glutamate de diméthyle (**9**, 3.93 g, 9.46 mmol) dans du tétrahydrofurane (40 mL) est ajouté l'hydroxyde de lithium (1 N, 120 mol %, 272 mg, 11.4 mL d'eau). Le mélange est ainsi agité pendant 2 heures à la température ambiante. La solution est alors lavée avec de l'acétate d'éthyle (3 × 20 mL). Les phases organiques réunies sont lavées avec une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (1 N, 2 × 20 mL), puis une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. Elles sont séchées sur sulfate de sodium anhydre et concentrées sous pression réduite pour donner le composé de départ comme un solide blanc (**9**, 1.2 g, 32%). Les phases aqueuses réunies sont acidifiées jusqu'à pH = 6 avec une solution aqueuse à 5% d'acide citrique, puis extraites avec de l'acétate d'éthyle (5 × 20 mL). Les phases organiques réunies sont lavées avec une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium, séchées sur sulfate de sodium anhydre et concentrées sous pression réduite pour donner un solide blanc qui est alors recristallisé dans un mélange éther éthylique:hexane.

Acide *N*-(9-(9-phénylfluorényl)) L-glutamate d' α -méthyle ((2*S*)-27, 2.50 g, 66% (93%)): $R_f = 0.02$ (1:5 AcOEt:hexane), $R_f = 0.53$ (2:1 AcOEt:hexane); p_f 140-141 °C; $[\alpha]_D^{20} -109.2^\circ$ (c 1.1, CHCl_3); $^1\text{H RMN}$: δ 1.63-1.85 (m, 2 H, CH_2 β), 2.48-2.53 (m, 2 H, CH_2 γ), 2.71 (dd, 1 H $J = 4.1, 9.0$ Hz, CH α), 3.33 (s, 3 H,

OMe), 7.20-7.80 (m, 13 H, CH_{Ar} PhF); ¹³C RMN δ 29.1 (CH₂ β), 30.8 (CH₂ γ), 51.6 (OMe), 54.8 (CH α), 72.8 (C_q PhF), 175.8 (CO₂Me), 178.6 (CO₂H); SMHR: masse calculée pour C₂₅H₂₃NO₄ (MH⁺) 402.1728, trouvée 402.1705.

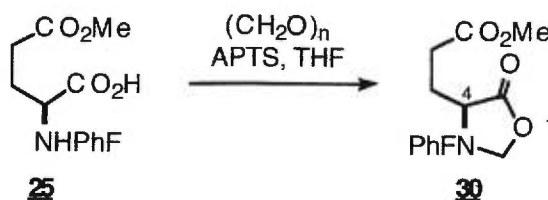
***N*-(9-(9-phénylfluorényle)) L-glutamate de γ-*tert*-butyle et d'α-méthyle ((2*S*)-29).^{18b,c}**



Le composé **29** a été préparé en suivant la procédure décrite pour la synthèse de **7** en utilisant l'acide *N*-(9-(9-phénylfluorényle)) L-glutamate d'α-méthyle (**27**, 1 g, 2.5 mmol). Le produit obtenu est purifié par chromatographie (éluant: 1:9 acétate d'éthyle:hexane) pour donner à un solide blanc qui est alors recristallisé dans un mélange éther éthylique:hexane.

***N*-(9-(9-phénylfluorényle)) L-glutamate de γ-*tert*-butyle et d'α-méthyle ((2*S*)-29**, 0.99 g, 88%): *R_f* = 0.51 (1:9 AcOEt:hexane); pf 109-110 °C; [α]_D²⁰ -181.3° (c 1.6, MeOH); ¹H RMN: δ 1.40 (s, 9 H, CH₃ *t*-Bu), 1.62-1.77 (m, 2 H, CH₂ β), 2.17-2.25 (dm, 2 H, CH₂ γ), 2.60 (dd, 1 H, *J* = 5.0, 8.4 Hz, CH α), 2.98 (s l, 1 H, NH), 3.25 (s, 3 H, OMe), 7.20-7.80 (m, 13 H, CH_{Ar} PhF); ¹³C RMN δ 28 (CH₃ *t*-Bu), 30 (CH₂ β), 31.8 (CH₂ γ), 51.4 (OMe), 54.9 (CH α), 72.7 (C_q PhF), 80.2 (C_q *t*-Bu), 172.4 (CO₂*t*-Bu γ), 176.4 (CO₂Me); SMHR: masse calculée pour C₂₉H₃₂NO₄ (MH⁺) 458.2331, trouvée 458.2347.

(4S) 4-(Propionate de methyl-3') 3-N-(9-(9-phénylfluorényle)) 5-oxo oxazolidine ((4S)-30).²²

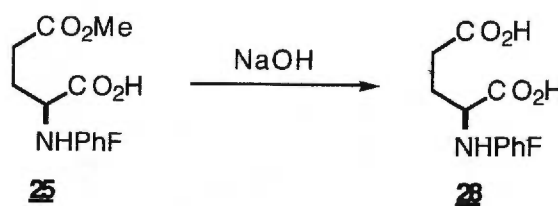


A une solution de paraformaldéhyde (30% en solution dans l'eau, 11.2 mL, 150 mmol, 150 mol %) et d'acide *p*-toluènesulfonique monohydraté (110 mg, 0.6 mmol, 6 mol %) dans du tétrahydrofurane (80 mL) est ajouté l'acide *N*-(9-(9-phénylfluorényle)) *L*-glutamate de γ -méthyle (**25**, 4.01 g, 10 mmol) en une portion. La solution est agitée pendant 20 heures à la température ambiante. Elle est alors lavée avec une solution aqueuse saturée de bicarbonate de sodium (75 mL) puis une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (50 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre et concentrée sous pression réduite pour donner un solide blanc qui est recristallisé dans un mélange chloroforme:hexane.

(4S) 4-(Propionate de methyl-3') 3-N-(9-(9-phénylfluorényle)) 5-oxo oxazolidine ((4S)-30, 4.1 g, 99%): $R_f = 0.76$ (1:1 AcOEt:hexane); pf 151-152 °C; $[\alpha]_D^{20} -207.7^\circ$ (c 1.0, CHCl₃); ¹H RMN: δ 1.81-2.02 (dm, 2 H, CH₂ β), 2.29-2.44 (m, 2 H, CH₂ γ), 2.92 (dd, 1 H, $J = 6.6, 8.2$ Hz, CH α), 3.65 (s, 3 H, OMe), 5.32 (d, 1 H, $J = 7.8$ Hz, CH₂ oxazolidine), 5.39 (d, 1 H, $J = 7.8$ Hz, CH₂ oxazolidine), 7.20-7.80 (m, 13 H, CH_{Ar} PhF); ¹³C RMN δ 25.1 (CH₂ β), 30 (CH₂ γ), 51.6 (OMe), 57.5 (CH α), 77.1 (C_q PhF), 83.6 (CH₂ oxazolidine), 172.8

(CO₂oxazolidine), 176.2 (CO₂Me); SMHR: masse calculée pour C₂₆H₂₄NO₄ (MH⁺) 414.1705, trouvée 414.1693.

Acide *N*-(9-(9-phénylfluorényle)) L-glutamique ((2*S*)-28).

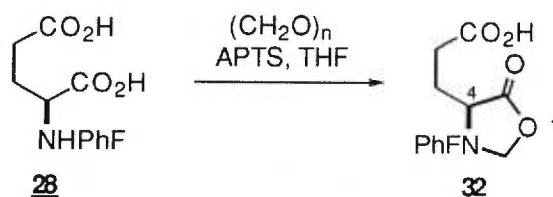


A une solution d'acide *N*-(9-(9-phénylfluorényle)) L-glutamate de γ-méthyle (**25**, 2.05 g, 5 mmol) dans du méthanol (50 mL) est ajoutée une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (2 N, 500 mol %, 1 g, 12.5 mL d'eau). Le mélange est ainsi agité pendant 2 heures à reflux du méthanol. La solution est acidifiée jusqu'à pH = 5 avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 1 N, puis extraite avec de l'acétate d'éthyle (3 × 50 mL). Les phases organiques réunies sont lavées avec une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (2 × 25 mL), puis séchées sur sulfate de sodium anhydre et concentrées sous pression réduite pour donner un solide blanc qui est alors recristallisé dans un mélange chloroforme:hexane.

Acide *N*-(9-(9-phénylfluorényle)) L-glutamique ((2*S*)-28, 1.92 g, 97%): $R_f = 0.02$ (2:1 AcOEt:hexane), $R_f = 0.49$ (1:1 MeOH:AcOEt); pf 136-138 °C; $[\alpha]_D^{20} -107^\circ$ (c 1.0, CHCl₃); ¹H RMN (CD₃OD) δ 1.56-1.76 (dm, 2 H, CH₂ β), 2.07-2.28 (dm, 2 H, CH₂ γ), 2.64 (m, 1 H, CH α), 7.20-7.80 (m, 13 H, CH_{Ar} PhF); ¹³C RMN (CD₃OD) δ 29 (CH₂ β), 31.5 (CH₂ γ), 57.6 (CH α), 75.0 (C_q PhF),

175.3 (CO₂H α), 177.8 (CO₂H γ); SMHR: masse calculée pour C₂₄H₂₂NO₄ (MH⁺) 388.1549, trouvée 388.1539.

(4S) 4-(Acide propanoïque-3') 3-N-(9-(9-phénylfluorényle)) 5-oxo oxazolidine ((4S)-32).²³

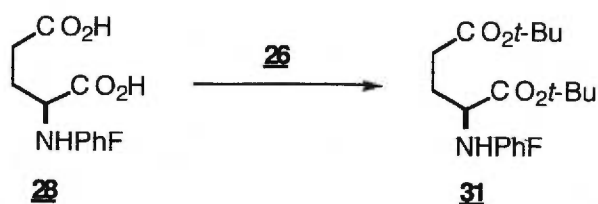


Dans une solution de paraformaldéhyde (30% dans l'eau, 4.5 mL, 60 mmol, 1500 mol %), d'acide *p*-toluènesulfonique monohydraté (0.030 g, 0.24 mmol, 6 mol %) est ajouté en une fois l'acide *N*-(9-(9-phénylfluorényle)) L-glutamique (**28**, 1.55 g, 4 mmol). Le mélange est agité pendant 20 heures à la température ambiante. La solution est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3 × 50 mL), puis la phase organique est lavée avec de l'eau (2 × 25 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre et concentrée sous pression réduite pour donner un solide blanc qui est purifié par sublimation.

(4S) 4-(Acide propanoïque-3') 3-N-(9-(9-phénylfluorényle)) 5-oxo oxazolidine ((4S)-32, 1.41 g, 88%): $R_f = 0.69$ (1:1 AcOEt:Et₂O); pf 160-162 °C; $[\alpha]_D^{20} -200^\circ$ (c 1.0, CHCl₃); ¹H RMN δ 1,74-2,04 (dm, 2 H, CH₂ β), 2,40 (m, 2 H, CH₂ γ), 2,90 (m, 1 H, CH α), 5,33 (d, 1 H, $J = 7.9$ Hz, CH₂ oxazolidine), 5,38 (d, 1 H, $J = 7.9$ Hz, CH₂ oxazolidine), 7,20-7,80 (m, 13 H, CH_{Ar} PhF); ¹³C RMN δ 24,9 (CH₂ β), 30,0 (CH₂ γ), 57,3 (CH α), 77,2 (C_q PhF), 83,7 (CH₂ oxazolidine),

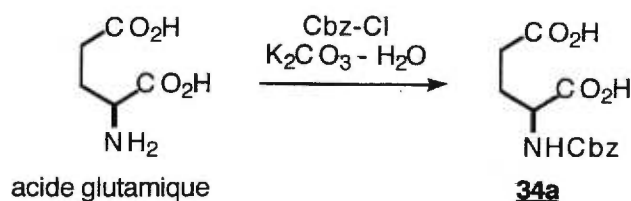
176.3 (CO₂oxazolidine), 178.2 (CO₂H γ); SMHR: masse calculée pour C₂₅H₂₂NO₄ (MH⁺) 400.1549, trouvée 400.1533.

***N*-(9-(9-phénylfluorényl)) L-glutamate de di-*tert*-butyle ((2*S*)-31).^{18b,c}**



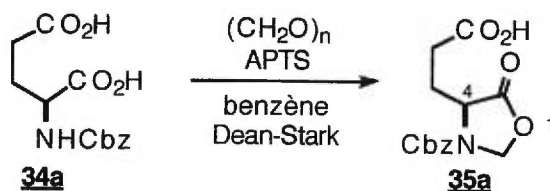
Le composé **31** a été préparé en suivant la procédure décrite pour la synthèse de **7** en utilisant l'acide *N*-(9-(9-phénylfluorényl)) L-glutamique (**28**, 0.994 g, 2.5 mmol)). Le produit obtenu est purifié par chromatographie (éluant: 1:9 acétate d'éthyle:hexane) pour donner à un solide blanc qui est alors recristallisé dans un mélange éther éthylique:hexane.

***N*-(9-(9-phénylfluorényl)) L-glutamate de di-*tert*-butyle ((2*S*)-31, 1 g, 81%):** $R_f = 0.65$ (1:5 AcOEt:hexane); pf 79-80 °C; $[\alpha]_D^{20} -188^\circ$ (c 1.0, CHCl₃); ¹H RMN: δ 1.17 (s, 9 H, CH₃ *t*-Bu α), 1.41 (s, 9 H, CH₃ *t*-Bu γ), 1.61-1.66 (m, 2 H, CH₂ β), 2.19-2.35 (m, 2 H, CH₂ γ), 2.52 (m, 1 H, CH α), 2.81 (s l, 1 H, NH), 7.10-7.70 (m, 13 H, CH_{Ar} PhF); ¹³C RMN δ 27.8 (CH₃ *t*-Bu α), 28.1 (CH₃ *t*-Bu γ), 30.6 (CH₂ β), 31.9 (CH₂ γ), 55.3 (CH α), 72.9 (C_qPhF), 80.0 (C_q *t*-Bu γ), 80.6 (C_q *t*-Bu α), 172.8 (CO₂*t*-Bu γ), 175 (CO₂*t*-Bu α); SMHR: masse calculée pour C₃₂H₃₈NO₄ (MH⁺) 500.2801, trouvée 500.2784.

Acide N-benzyloxycarbonyl L-glutamique ((2S)-34a).^{25a}

Le composé **34a** a été préparé comme décrit dans la référence 25a.

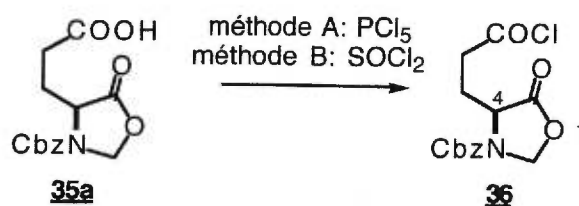
Acide N-benzyloxycarbonyl L-glutamique ((2S)-34a, 18.2 g, 95%): $R_f = 0.36$ (8:1:0.5 CHCl_3 :MeOH:AcOH); pf 119-120 °C (lit.: 117-119 °C^{34b}); $[\alpha]_D^{20} -7.2^\circ$ (c 4.0, AcOH) (lit.: $[\alpha]_D^{20} -7.5 \pm 0.5^\circ$ (c 4.0, AcOH)^{34b}).

(4S) 4-(Acide propanoïque-3') 3-N-benzyloxycarbonyl 5-oxo oxazolidine ((4S)-35a).^{24a}

Le composé **35a** a été préparé comme décrit dans la référence 24a.

(4S) 4-(Acide propanoïque-3') 3-N-benzyloxycarbonyl 5-oxo oxazolidine ((4S)-35a, 2.84 g, 97%): $R_f = 0.76$ (AcOEt); pf 67 °C (lit.: 68-69 °C^{24a}); $[\alpha]_D^{20} +30.6^\circ$ (c 1.0, MeOH) (lit.: $[\alpha]_D^{20} +78.4^\circ$ (c 3.05, MeOH)^{24a}; $[\alpha]_D^{20} +77.6^\circ$ (c 1.0, MeOH)^{24b}; $[\alpha]_D^{20} +73^\circ$ (c 2.35, MeOH)^{24c}).

(4S) 4-(Chlorure de propanoyl-3') 3-N-benzyloxycarbonyle 5-oxo oxazolidine ((4S)-36).



Méthode A:

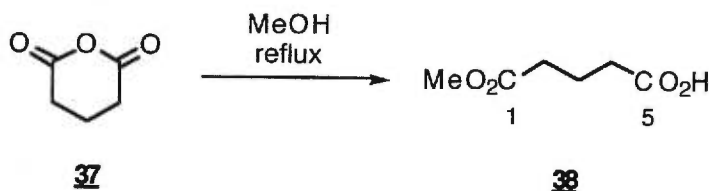
Le composé **36** a été préparé comme décrit dans la référence 24b.

Méthode B:

Le composé **36** a été préparé comme décrit dans la référence 24d.

(4S) 4-(Chlorure de propanoyl-3') 3-N-benzyloxycarbonyle 5-oxo oxazolidine ((4S)-36): pf 71 °C (lit.: 72-74 °C^{24d}; 64-65 °C^{24b}; 76-78 °C^{24c}); $[\alpha]^{20}_{\text{D}} +87.8^\circ$ (c 0.5, CH_2Cl_2) (lit.: $[\alpha]^{20}_{\text{D}} +88^\circ$ (c 0.5, CH_2Cl_2)^{24d}; $[\alpha]^{20}_{\text{D}} +69.3^\circ$ (c 1.0, benzène)^{24b}; $[\alpha]^{20}_{\text{D}} +93^\circ$ (c 1.56, CHCl_3)^{24c}); $^1\text{H RMN } \delta$ 2.10-2.30 (m, 2 H, $\text{CH}_2\beta$), 3.00 (m, 2 H, $\text{CH}_2\gamma$), 4.15 (m, 1 H, CH_α), 5.10 (m, 3 H, CH_2Cbz , CH_2 oxazolidine), 5.25 (s, 1 H, CH_2 oxazolidine), 7.20 (m, 5 H, $\text{CH}_{\text{Ar Cbz}}$).

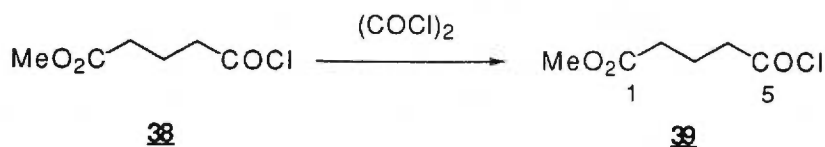
Glutarate de monométhyle (38).²⁶



Le composé **38** a été préparé en suivant la procédure décrite pour la synthèse du succinate de monométhyle dans la référence 26 en utilisant l'anhydride glutarique (**37**, 2.28 g, 20 mmol).

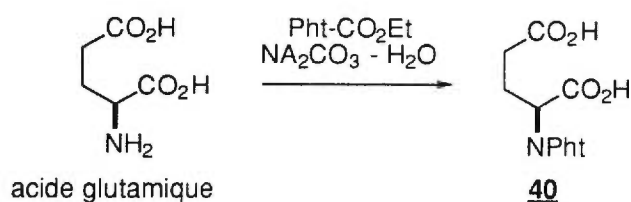
Glutarate de monométhyle (38, 2.68 g, 92%): ^1H RMN: δ 1.96 (m, 2 H, CH_2 3), 2.35 (m, 4 H, CH_2 2, CH_2 4), 3.65 (s, 3 H, OMe); ^{13}C RMN δ 20.0 (CH_2 3), 33.0 (CH_2 2), 33.0 (CH_2 4), 51.7 (OMe), 173.8 (CO_2Me), 178.7 (CO_2H).

4-(Chloroformyle) butanoate de méthyle (**39**).²⁷



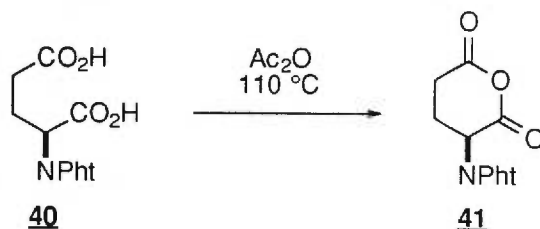
Le composé **39** a été préparé en suivant la procédure décrite pour la synthèse du 3-(chloroformyle) propanoate de méthyle dans la référence 27 en utilisant le glutarate de monométhyle (**38**, 2.2 g, 15 mmol).

4-(Chloroformyle) butanoate de méthyle (39, 2.44 g, 98%): ^1H RMN δ 1.90 (m, 2 H, CH_2 3), 2.35 (m, 2 H, CH_2 2), 3.00 (m, 2 H, CH_2 4), 3.69 (s, 3 H, OMe); ^{13}C RMN δ 20.4 (CH_2 3), 32.2 (CH_2 4), 46.1 (CH_2 2), 51.7 (OMe), 172.8 (COCl), 173.5 (CO_2Me).

Acide *N,N*-phtalimido L-glutamique ((2*S*)-40).^{29a}

Le composé **40** a été préparé comme décrit dans la référence 29a.

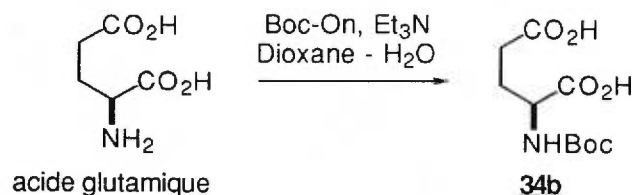
Acide *N,N*-phtalimido L-glutamique ((2*S*)-40, 3 g, 72%): $R_f = 0.5$ (8:1:0.5 CHCl₃:MeOH:AcOH); pf 160 °C (lit.: 160 °C^{29a}); $[\alpha]^{20}_D -48.2^\circ$ (*c* 1.75, dioxane) (lit.: $[\alpha]^{20}_D -48.3^\circ$ (*c* 1.75, dioxane)^{29a}); ¹H RMN ((CD₃)₂CO) δ 2.46-2.71 (m, 4 H, CH₂ β , CH₂ γ), 5.05 (dd, 1 H, *J* = 4.6, 10.3 Hz, CH α), 7.87-7.92 (m, 4 H, CH_{Ar} Pht), 10.7 (s 1, 2 H, OH CO₂H); ¹³C RMN ((CD₃)₂CO) δ 24.8 (CH₂ β), 30.8 (CH₂ γ), 51.8 (CH α), 124.1 (C₂ Pht), 132.6 (C_q Pht), 135.3 (C₃ Pht), 168.4 (CO Pht), 170.9 (CO₂H γ), 174.8 (CO₂H α); SMHR: masse calculée pour C₁₃H₁₂NO₆ (MH⁺) 278.0665, trouvée 278.0658.

Anhydride *N,N*-phtalimido L-glutamique ((2*S*)-41).^{30a}

Le composé **41** a été préparé comme décrit dans la référence 30a.

Anhydride *N,N*-phthalimido L-glutamique ((2*S*)-41, 0.823 g, 88%, $R_f = 0.8$ (AcOEt); pf 196-197 °C (lit.: 195-196 °C^{30a}); $[\alpha]^{20}_D -43^\circ$ (c 1.75, dioxane) (lit.: $[\alpha]^{20}_D -43.1^\circ$ (c 1.75, dioxane)^{30b,c}); 1H RMN ((CD₃)₂CO) δ 2.30-2.37 (dtd, 1 H, $J = 3.0, 5.7, 13.2$ Hz, CH₂ β), 2.79-2.90 (qd, 1 H, $J = 4.9, 13.2$ Hz, CH₂ β), 3.11-3.31 (m, 2 H, CH₂ γ), 5.45 (dd, 1 H, $J = 5.8, 12.8$ Hz, CH α), 7.90-7.96 (m, 4 H, CH_{Ar} Pht), 10.7 (s 1, 2 H, OH CO₂H); ^{13}C RMN ((CD₃)₂CO) δ 21.9 (CH₂ β), 30.4 (CH₂ γ), 49.0 (CH α), 124.4 (CH_{Ar} 2-Pht), 132.6 (C_q Pht), 135.8 (C₃ Pht), 166.0 (CO_{Pht}), 166.7 (CO₂H γ), 167.7 (CO₂H α); SMHR: masse calculée pour C₁₃H₁₀NO₅ (MH⁺) 260.0559, trouvée 260.0553.

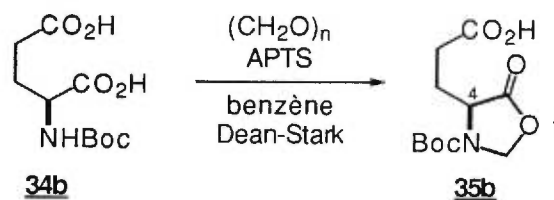
Acide *N-tert*-butoxycarbonyl L-glutamique ((2*S*)-34b).^{31a}



Le composé **34b** a été préparé comme décrit dans la référence 31a.

Acide *N-tert*-butoxycarbonyl L-glutamique ((2*S*)-34b, 21 g, 85%): $R_f = 0.54$ (8:1:0.5 CHCl₃:MeOH:AcOH); pf 110-112 °C (lit.: 110-112 °C^{31c}; 103-105(dec) °C^{31a}; 101-104 °C^{19b}); $[\alpha]^{20}_D -16.2^\circ$ (c 1.0, MeOH) (lit.: $[\alpha]^{20}_D -16.5^\circ$ (c 1.0, MeOH)^{31c,d}); $[\alpha]^{20}_D -16.6^\circ$ (c 1.0, MeOH)^{31d}).

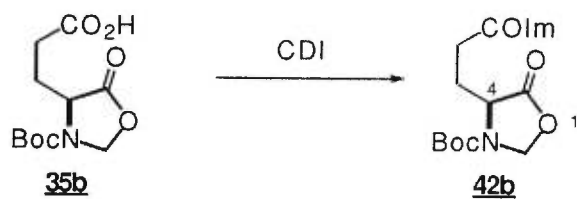
(4S) 4-(Acide propanoïque-3') 3-*N*-*tert*-butyloxycarbonyl 5-oxo oxazolidine ((4S)-35b).²⁴



Le composé **35b** a été préparé en suivant la procédure décrite pour la synthèse de **35a** dans la référence 24a en utilisant l'acide *N*-*tert*-butyloxycarbonyl L-glutamique (**34b**, 2.47 g, 10 mmol). Le solide blanc obtenu est recristallisé dans un mélange chloroforme:hexane.

(4S) 4-(Acide propanoïque-3') 3-*N*-*tert*-butyloxycarbonyl 5-oxo oxazolidine ((4S)-35b, 1 g, 39%): $R_f = 0.67$ (2:1 AcOEt:hexane); $[\alpha]^{20}_D -67.7^\circ$ (c 1.0, CHCl_3); $^1\text{H RMN}$: δ 1.39 (s, 9 H, CH_3 Boc), 2.07 (m, 1 H, CH_2 β), 2.18 (m, 1 H, CH_2 β), 2.39-2.43 (m, 2 H, CH_2 γ), 4.25 (t, 1 H, $J = 5.9$ Hz, CH α), 5.08 (d, 1 H, $J = 4.5$ Hz, CH_2 oxazolidine), 5.40 (s l, 1 H, CH_2 oxazolidine), 9.92 (s l, 1 H, OH CO_2H γ); $^{13}\text{C RMN}$ δ 25.5 (CH_2 β), 27.9 (CH_3 Boc), 28.9 (CH_2 γ), 53.8 (CH α), 77.7 (C_q Boc), 82.3 (CH_2 oxazolidine), 152.2 (CO Boc), 172.1 (CO_2 oxazolidine), 177.1 (CO_2H γ); SMHR: masse calculée pour $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{NO}_6$ (MH^+) 260.1134, trouvée 260.1123.

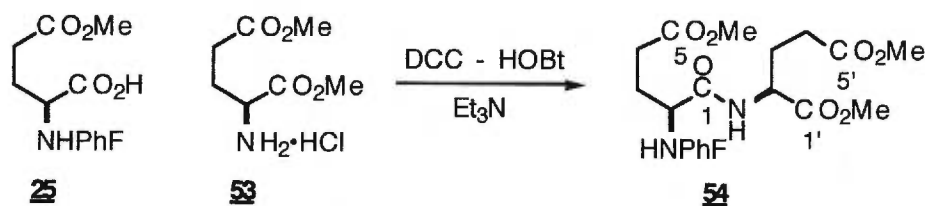
(4S) 4-(Imidazolide de l'acide propanoïque-3') 3-*N*-*tert*-butyloxycarbonyl 5-oxo oxazolidine ((4S)-42b).³²



Le carbonyle diimidazole (0.195 g, 1.2 mmol) est additionné à une solution de (4S) 4-(acide propanoïque-3') 3-*N*-*tert*-butyloxycarbonyle 5-oxo oxazolidine (**35b**, 0.260 g, 1 mmol) dans du tétrahydrofurane anhydre (2 mL). La solution est agitée à la température de la pièce pendant 12 heures. Le solvant est évaporé. Le résidu est filtré à travers une couche de silice (éluant: 1:1 acétate d'éthyle:hexane) pour obtenir, après évaporation, une huile incolore qui est utilisée directement.

(4S) 4-(Imidazolide de l'acide propanoïque-3') 3-*N*-(9-(9-phénylfluorényle)) 5-oxo oxazolidine ((4S)-42b, 0.115 g, 37% (en dépit d'une réaction quantitative au vue de la CCM, le faible rendement peut s'expliquer par l'instabilité de l'imidazole sur la silice)): $R_f = 0.46$ (2:1 AcOEt:hexane); ^1H RMN: δ 1.41 (s, 9 H, CH_3 Boc), 2.35 (m, 1 H, CH_2 β), 2.43 (m, 1 H, CH_2 β), 3.08 (t, 2 H, $J = 7.0$ Hz, CH_2 γ), 4.25 (t, 1 H, $J = 6.6$ Hz, CH α), 5.16 (d, 1 H, $J = 4.7$ Hz, CH_2 oxazolidine), 5.44 (s l, 1 H, CH_2 oxazolidine), 7.07 (s, 1 H, CH Ar Im), 7.46 (s, 1 H, CH Ar Im), 8.21 (s, 1 H, CH Ar Im); ^{13}C RMN: δ 25.1 (CH_2 β), 28.0 (CH_3 Boc), 29.4 (CH_2 γ), 53.5 (CH α), 77.8 (C_q Boc), 82.6 (CH_2 oxazolidine), 116 (CH Ar Im), 130.4 (CH Ar Im), 136.1 (CH Ar Im), 152.3 (CO Boc), 168.1 (CO Im), 172 (CO₂ oxazolidine); SMHR: masse calculée pour $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_5$ (MH^+) 310.1403, trouvée 310.1432.

***N*-(9-(9-phénylfluorényle)) L-glutamyle de γ -méthyl - L-glutamate de diméthyle (54).**^{25b}



A une solution de chlorhydrate du L-glutamate de diméthyle (**53**, 0.318 g, 1.5 mmol, 150 mol %) et de triéthylamine (0.21 mL, 1.5 mmol, 150 mol %) dans du tétrahydrofurane (10 mL), est ajouté le 1-hydroxy-benzotriazole hydraté (HOBt, 0.298 g, 2.2 mmol, 220 mol %) et l'acide *N*-(9-(9-phénylfluorényle)) L-glutamate de γ -méthyle (**25**, 0.402 g, 1 mmol). La solution est refroidie à 0 °C puis la dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 0.454mg, 2.2 mmol, 220 mol %) est additionnée. La solution est placée au réfrigérateur (4 °C) et est agitée pendant 12 heures. Le précipité formé est éliminé par filtration. Le filtrat obtenu est concentré sous pression réduite pour donner un solide blanc. Le résidu obtenu est chromatographié sur gel de silice (éluant: 1:1 éther éthylique:hexane) pour obtenir un solide blanc.

***N*-(9-(9-phénylfluorényle)) L-glutamyle de γ -méthyl - L-glutamate de diméthyle (**54**, 0.450 0g, 81%):** $R_f = 0.41$ (1:1 hexane:Et₂O); $[\alpha]_D^{20} -114^\circ$ (*c* 1, CHCl₃); ¹H RMN δ 1.68-1.73 (m, 2 H), 1.79 (m, 1 H), 1.91 (m, 1 H), 2.04-2.39 (m, 4 H), 2.45 (t, 1 H, *J* = 6.4 Hz, CH₃), 3,23 (s l, 1 H, NH₆), 3.52 (s, 3 H, OMe₁), 3.649 (s, 3 H, OMe), 3.654 (s, 3 H, OMe), 4,24 (m, 1 H, CH₂), 6.85 (d, 1 H, *J* = 4.8 Hz, NH₆), 7.10-7.70 (m, 13 H, CH_{Ar} PhF); ¹³C RMN δ 26.8 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.8 (CH₂), 29.9 (CH₂), 50.9 (OMe), 51.2 (OMe), 51.4 (OMe), 52.0 (CH _{α} 2), 55.5 (CH _{α} 2), 72.7 (C_q PhF), 171.8, 172.7, 173.6, 174.5 (CO); SMHR: masse calculée pour C₃₂H₃₅N₂O₇ (MH⁺) 559.2444, trouvée 559.2427.

3.10 Références.

- 1 Zee-Cheng, R. K. Y.; Olson, R. E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *94*, 1128.
- 2 (a) Baldwin, J. E.; North, M.; Flinn, A.; Moloney, M. G. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1988**, 828; (b) Baldwin, J. E.; North, M.; Flinn, A.; Moloney, M. G. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 1453; (c) Baldwin, J. E.; North, M.; Flinn, A.; Moloney, M. G. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 1465.
- 3 (a) Johnstone, A. N. C.; Lopatriello, S., North, M. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 6335; (b) Del Bosco, M; Johnstone, A. N. C.; Bazza, G.; Lopatriello, S.; North, M. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 8545; (c) Koskinen, A. M. P.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 1859.
- 4 Hanessian, S.; Vanasse, B. *Can. J. Chem.* **1993**, *71*, 1401.
- 5 Paz, M. M.; Sardina, F. J. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 6990.
- 6 (a) Ibrahim H. H.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 6438; (b) Atfani, M.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 3184.
- 7 (a) Shiosaki, K.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 1229; (b) Ho, T. L.; Gopalan, B.; Nestor Jr, J. J. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2405.
- 8 (a) Jamison, T. F.; Rapoport, H. *Org. Synth.* **1992**, *71*, 226; (b) Koskinen, A. M. P.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 1859; (c) Christie, B. D.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 1239; (d) Jamison, T. F.; Lubell, W. D.; Dener, J. M.; Krisché, M. J.; Rapoport, H. *Org. Synth.* **1992**, *71*, 220; (e) Lubell, W. D.; Rapoport, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 236; (f) Jamison, T. F.; Rapoport, H. *Org. Synth.* **1992**, *71*, 226 et les références contenues.

- 9 Humphrey, J. M.; Bridges, R. J.; Hart, J. A.; Chamberlin, A. R. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2467.
- 10 Pour des exemples choisis, voir: (a) Turner, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 3489; (b) Vowinkel, E. *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 16; (c) Staab, H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1962**, *1*, 351; (d) Tedder, J. M. *Chem. Rev.* **1955**, *55*, 787; (e) Brechbuehier, H.; Buchi, H.; Hatz, E.; Schreiber, J.; Eschenmoser, A. *Helv. Chim. Acta* **1965**, *48*, 1746; (f) Masamune, S.; Kamata, S.; Schilling, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 3515; (g) Corey, E. J.; Brunelle, D. J. *Tetrahedron Lett.* **1976**, *17*, 3409; (h) Mukaiyama, T.; Usui, M.; Saigo, K. *Chem. Lett.* **1976**, 49.
- 11 Anderson, G. W.; Callahan, F. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 3359.
- 12 Roeske, R. *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 1251.
- 13 Taschner, E.; Wasieleski, C.; Sokowska, T.; Biernat, J. F. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1961**, *646*, 127.
- 14 Tashner, E.; Chimiak, A.; Bator, B.; Sokplowska, T. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1961**, *646*, 134.
- 15 Citons l'utilisation de carbodiimide (DCC) qui, en présence de 4-pyrrolidinopyridine comme catalyseur, donne des estérifications sur des acides aminés avec des rendements autour de 80%: Hassner, A.; Alexanian, V. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 4475.
- 16 Mathias, L. *Synthesis* **1979**, 561.
- 17 Widmer, U. *Synthesis* **1983**, 135.
- 18 (a) Wessel, H. P.; Iversen, T.; Bundle, D. R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1985**, 2247; (b) Yue, C.; Thierry, J.; Potier, P. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 323; (c) Armstrong, A.; Brackenridge, I.; Jackson, R. F. W.; Kirk, J. M. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 2483.

- 19 Hanby, W. E.; Waley, S. G.; Watson, J. J. *Chem. Soc.* **1950**, 3239.
- 20 Coleman, D. J. *Chem. Soc. (C)* **1951**, 2294.
- 21 (a) Gmeiner, P.; Feldman, P. L.; Chu-Moyer, M. Y.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3068; (b) Référence 3c.
- 22 Rita Paleo, M.; Castedo, L.; Dominguez, D. *J. Org. Chem.* **1992**, *58*, 2763.
- 23 Freidinger, R. M.; Hinkle, J. S.; Perlow, D. S.; Arison, B. H. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 77.
- 24 (a) Scholtz, J. M.; Bartlett, P. A. *Synthesis* **1989**, 542; (b) Bloemhoff, J. W.; Kerling, K. E. T. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* **1975**, *94*, 182; (c) Hyun Lee, B.; Miller, M. J. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 927; (d) Bolos, J.; Perez, A.; Gubert, S.; Anglada, L.; Sacristan, A.; Ortiz, J. A. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 3535; (e) Le groupe protecteur de l'amine est un tosyle: Rudinger, J.; Farasova, H. *Coll. Czech. Chem. Comm.* **1963**, *28*, 2941.
- 25 (a) Bergmann, M.; Zervas, L. *Chem. Ber.* **1932**, *65*, 1192; (b) Bodansky, M.; Bodansky, A. "The Practice of Peptide Synthesis" Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York Ed., 1984, p. 12; (c) Wunch, E., Zwick, A. *Chem. Ber.* **1964**, *97*, 2497.
- 26 Cason, J. *Org. Synth.* **1945**, *26*, 19.
- 27 Ku, T. W.; McCarthy, M. E.; Weichman, B. M.; Gleason, J. G. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 1847.
- 28 (a) Nagai, U.; Sato, K. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 647; (b) Nagai, U.; Sato, K.; Nakamura, R.; Kato, R. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3577.
- 29 (a) Nefkens, G. H. L.; Tesser, G. I.; Nivard, R. J. F. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* **1960**, *79*, 688; (b) Nefkens, G. H. L. *Nature* **1960**, *185*, 309; (c) Le N-éthoxycarbonyl phtalamide est acheté chez Fluka et utilisé sans purification.

- 30 (a) King, F. E.; Kidd, D. A. *J. Chem. Soc.* **1949**, 3315; (b) Tipson, R. S. *J. Org. Chem.* **1956**, *21*, 1353; (c) Clark-Lewis, J. W.; Fruton, J. S. *J. Biol. Chem.* **1954**, *207*, 477.
- 31 (a) Itoh, M.; Hagiwara, D.; Kamiya, T. *Bull. Chem. Soc. Japan* **1977**, *50*, 718; (b) Référence 14b; (c) Schroder, E.; Klieger, E. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1964**, *973*, 196; (d) Itoh, M. *Bull. Chem. Soc. Japan* **1973**, *46*, 1269.
- 32 Bergmeier, S. C.; Cobas, A. A.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 2369.
- 33 Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A.; Watson, J. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923.
- 34 (a) Beil. *4, IV*, 3033; (b) Beil. *6, IV*, 2402;

CHAPITRE 4

Synthesis of Enantiopure α,ω -Diamino Dicarboxylates and Azabicycloalkane Amino Acids by Claisen Condensation of α -N-(Phenylfluorenyl)amino Dicarboxylates

Henry-Georges Lombart and William D. Lubell*

Journal of Organic Chemistry, 1994, 59, 6147-6149.

4.1.1 Abstract.

A novel strategy has been developed to synthesize α,ω -diamino dicarboxylates and azabicycloalkane amino acids from readily available, configurationally stable α -N-(phenylfluorenyl)amino dicarboxylates via a sequence featuring Claisen condensation, reductive amination, and lactam cyclization. The potential of this approach was demonstrated by the synthesis of >99% enantiomerically pure (3*S*, 6*S*, 9*S*)-2-oxo-3-N-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic acid ((3*S*, 6*S*, 9*S*)-1) in 39% overall yield from α -*tert*-butyl γ -methyl N-(9-(9-phenylfluorenyl))glutamate (5). The Claisen condensation of glutamate 5 in the presence of lithium bis(trimethylsilyl)amide provided β -keto ester 6 as a mixture of diastereomers. Subsequent γ -methyl ester hydrolysis and decarboxylation of 6 with lithium hydroxide gave δ -oxo α,ω -

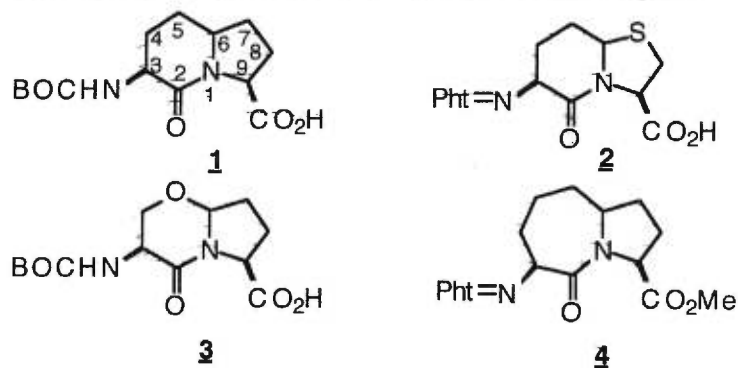
diaminoazelaate **8**. Symmetrical diaminoazelaate **8** was converted to a separable 8:1 mixture of diastereomeric *N*-(BOC)amino indolizidin-2-one esters **9** by hydrogenolysis of the *N*-PhFl protecting group with intramolecular reductive amination followed by ester exchange, lactam cyclization, and amine protection. Hydrolysis of the methyl ester of major diastereomer (3*S*, 6*S*, 9*S*)-**9** with lithium hydroxide then provided enantiomerically pure **1**. Conformational analysis of (3*S*, 6*S*, 9*S*)-*N*'-methyl 2-oxo-3-*N*-(acetyl)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide and its (6*R*)-stereoisomer predicts that both diastereomers can function as peptidomimetic surrogates of the *i* + 1 and *i* + 2 residues of ideal type II' β -turn conformations.

4.1.2 Summary.

Enantiomerically pure (3*S*, 6*S*, 9*S*)-2-oxo-3-*N*-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic acid ((3*S*, 6*S*, 9*S*)-**1**) was prepared in 39% overall yield from α -*tert*-butyl γ -methyl *N*-(9-(9-phenylfluorenyl))glutamate (**5**) using a Claisen condensation / reductive amination / lactam cyclization sequence.

4.1.3 Results and Discussion.

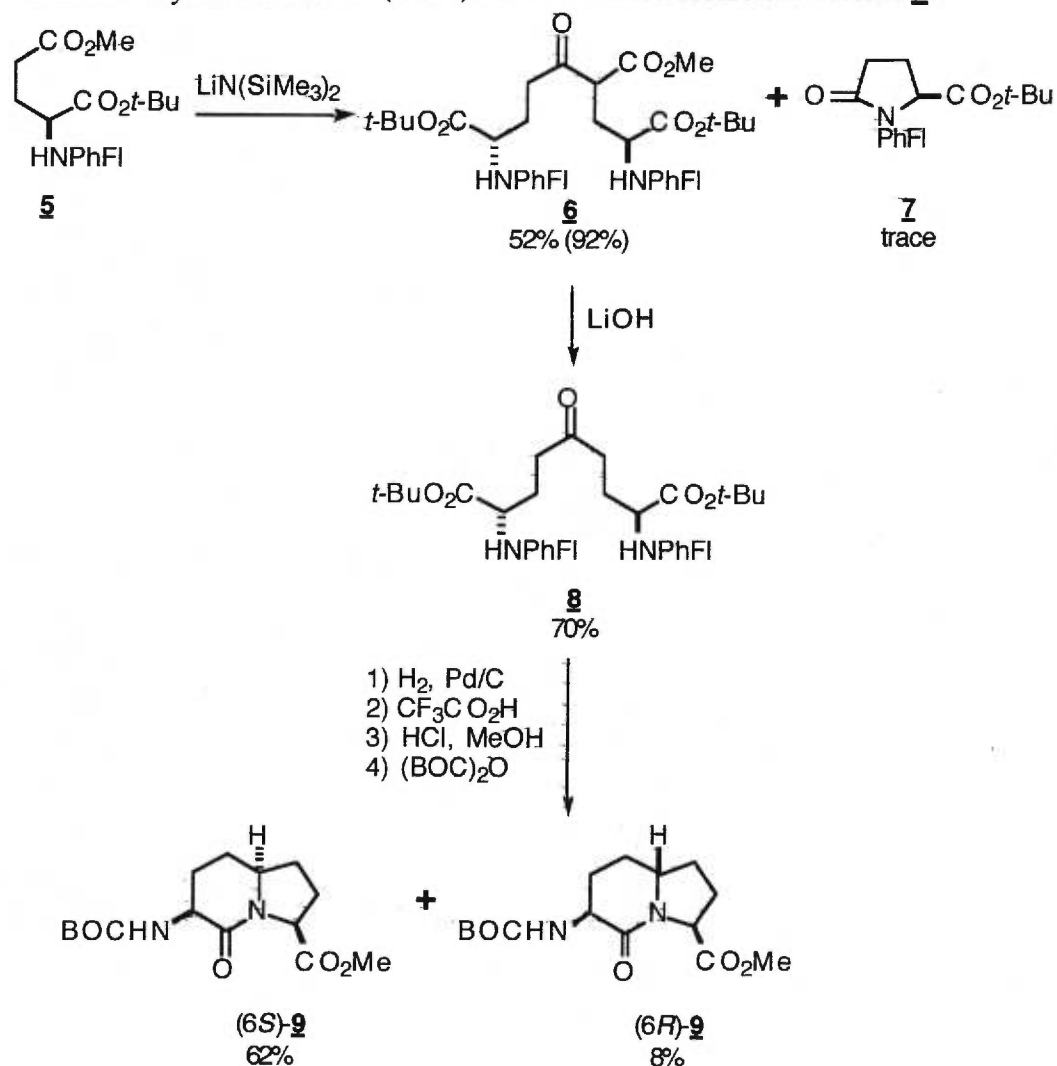
Peptidomimetics, rationally designed conformationally rigid analogues of natural peptides, have emerged as important tools for studying the central roles peptides and proteins play in the communication, regulation and replication of biological systems.¹ Azabicyclo[X.Y.0]alkane amino acids are particularly attractive targets to those engaged in the rational design and synthesis of peptidomimetics because of their ability to serve as conformationally fixed surrogates of peptide turn secondary structures.¹⁻⁹ Pioneered by the preparation of 2-oxo-3-phthalimido-7-thia-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic acid (**2**, Figure 1) and its use to prepare peptidomimetics of the $i + 1$ and $i + 2$ residues of type II' β -turn conformations,³ efforts have intensified to synthesize azabicycloalkane amino acids in order to develop optimal peptidomimetics of different biologically active peptide turn conformations.⁴⁻⁹ Recent reports on the synthesis of 2-oxo-3-*N*-(BOC)amino-5-oxa-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic acid (**3**) and methyl 2-oxo-3-phthalimido-1-azabicyclo[5.3.0]decane-10-carboxylate (**4**) have prompted us to reveal our approach to prepare azabicyclo[X.Y.0]alkane amino acid derivatives.⁵⁻⁷

Figure 1. 1-Azabicyclo[X.3.0]alkane Amino Acid Analogues²

Our strategy to synthesize azabicyclo[X.Y.0]alkane amino acids employs configurationally stable α -N-(phenylfluorenyl)amino dicarboxylates in a Claisen condensation / reductive amination / lactam cyclization sequence (Scheme 1). This strategy expands on our previously reported route to synthesize enantiopure δ -oxo α -amino esters and 5-alkylprolines via acylation of the γ -ester enolate of α -*tert*-butyl γ -methyl N-(9-(9-phenylfluorenyl))glutamate (5) and subsequent reductive amination.¹⁰ By employing readily available, natural α -amino dicarboxylates as chiral educts for azabicycloalkane amino acid synthesis, this method avoids complications associated with previous approaches that have required amination after heterocycle synthesis,^{7a,8} as well as the preparation of optically active allylglycine starting materials.^{6a} The synthesis of α,ω -diamino dicarboxylates by Claisen condensation of α -amino dicarboxylates adds value to our approach in light of their importance as anti-bacterials,¹¹ as well as replacements for cystine in macrocyclic peptides in which a reducible disulfide linkage is converted into an ethylene chain.¹² In addition, azabicycloalkane amino acids such as 1 are not susceptible to degradation by mechanisms that may ring-open

the masked aldehydes present in derivatives **2** and **3**. This strategy is also designed to allow for side-chain functionality to be added to different positions of the α,ω -diamino dicarboxylate and azabicycloalkane amino acid peptidomimetics via subsequent alkylations and additions on *N*-(PhFI)amino ketone intermediates.¹³

Scheme 1. Synthesis of *N*-(BOC)Amino Indolizidinone Esters **9**.



We have demonstrated the potential of our approach by the synthesis of >99% enantiomerically pure (3*S*, 6*S*, 9*S*)-2-oxo-3-*N*-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic acid ((3*S*, 6*S*, 9*S*)-**1**) in 39% overall yield from glutamate **5**. Slow addition of lithium bis(trimethylsilyl)amide (110 mol %) to a -78 °C solution of glutamate **5** in THF (0.3 M) gave rise to Claisen condensation of the γ -methyl esters to produce after extraction and chromatography a 1:1 mixture of diastereomeric β -keto esters **6** (52%) and recovered **5** (45%). At elevated temperatures intramolecular cyclization competed with the condensation and minor amounts of *tert*-butyl *N*-(PhFl)pyroglutamate (**7**) were isolated from the mixture. Hydrolysis and decarboxylation of the γ -methyl ester of **6** with 2 M lithium hydroxide (1500 mol %) in THF at reflux for 12 h furnished symmetrical δ -oxo α,ω -diaminoazelate **8** in 70% yield after chromatography.

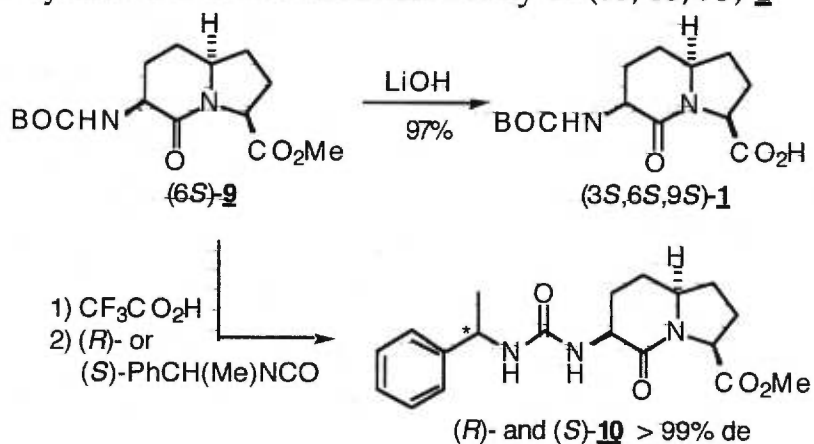
The fully protected azabicycloalkane, methyl 2-oxo-3-*N*-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate (**9**), was synthesized from azelate **8** in four steps and a single purification in 70% overall yield. Hydrogenation of **8** with palladium-on-carbon (10 mol % of 10 wt %) in a 10:1 ethanol:acetic acid solution at 5 atm of hydrogen provided the 5-substituted proline as an 8:1 mixture of *cis:trans* diastereomers. Treatment of the proline mixture with trifluoroacetic acid (20 vol %) in CH₂Cl₂ for 5 h at room temperature removed the *tert*-butyl esters and esterification in methanolic HCl proceeded with lactam cyclization giving the desired indolizidinone ring system. The amino ester hydrochloride was then protected with di-*tert*-butyldicarbonate (500 mol %) and triethylamine (200

mol %) in CH₂Cl₂ (0.06 M) to furnish the *N*-(BOC)amino indolizidinone methyl esters **9** that were readily separable by purification using column chromatography on silica gel with 1:1 ethyl acetate:hexane as eluant. Concave (3*S*, 6*S*, 9*S*)-**9** (62%; *R_f* = 0.23, 1:1 EtOAc:hexane) eluted first from the column followed by convex (3*S*, 6*R*, 9*S*)-**9** (8%; *R_f* = 0.08).

Observation of Ruhemann's purple after removal of the *N*-BOC group by heating **9** on a silica gel coated TLC plate with ninhydrin indicated the presence of a primary amine and demonstrated that the 6-membered lactam had formed instead of an 8-membered lactam resulting from cyclization of the proline ester onto the primary amine.¹⁴ The 6-membered lactam structure was further elucidated by a series of ¹H and ¹³C NMR two-dimensional experiments.¹⁵ The bridge-head stereochemistry of major product (6*S*)-**6** was assigned based on analogy with previous work,¹⁰ and on NMR experiments in which irradiation of the bridge-head proton produced a significant nuclear Overhauser effect on the C-3 proton. Enantiomeric purity of (6*S*)-**6** was determined after conversion to (*R*)- and (*S*)-*N*- α -methylbenzylureas **10**. Trifluoroacetic acid in CH₂Cl₂ quantitatively removed the *N*-BOC protecting group and the TFA salt was then acylated with either (*R*)- or (*S*)- α -methylbenzylisocyanate in THF with triethylamine.¹⁰ Observation of the diastereomeric methyl ester singlets by 400 MHz ¹H NMR spectroscopy in C₆D₆ during incremental additions of the opposite isomer demonstrated **10** to be of >99 % de. Hence esters **9**, azelate **8**, and 2-oxo-3-*N*-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic acids (**1**) are all presumed to be of >99% enantiomeric purity.

Hydrolysis of the methyl ester of (6*S*)-**9** using 2 M lithium hydroxide (1500 mol %) in THF (0.5 M) at reflux for 12 h provided an 81% yield of a 1.8:1 mixture of (3*S*, 6*S*, 9*S*)- and (3*S*, 6*S*, 9*R*)-2-oxo-3-*N*-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic acids ((3*S*, 6*S*, 9*S*)- and (3*S*, 6*S*, 9*R*)-**1**) which were readily separable by chromatography on silica gel with 20:1 ethyl acetate:acetic acid as eluant. Since epimerization of (6*S*)-**9** during ester hydrolysis was presumed to provide (3*S*, 6*S*, 9*R*)-**1**, the hydrolysis was next performed under milder conditions. Methyl ester (6*S*)-**9** was thus subjected to 1 M lithium hydroxide (200 mol %) in THF (0.12 M) at room temperature for 16 h and acid (3*S*, 6*S*, 9*S*)-**1** was isolated in 97% yield and >95% diastereomeric purity after aqueous extraction.

Scheme 2. Synthesis and Enantiomeric Purity of (3*S*, 6*S*, 9*S*)-**1**



Conformational analysis of (3*S*, 6*S*, 9*S*)-*N*'-methyl 2-oxo-3-*N*-(acetyl)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide and its (6*R*)-stereoisomer predicts that both diastereomers exhibit ϕ and ψ torsion angles similar to the $i + 1$ and $i + 2$ residues of ideal type II' β -turn

conformations.^{16,17} We are now working to incorporate amino acid **1** into peptides in order to explore its ability to induce type II' β -turn conformations and β -hairpin structures.^{16,18} Alkylation of ketone **8** and related intermediates is also under investigation to add side chains with stereocontrol at different positions on these peptidomimetic analogues. Having recently reported an enantioselective hydrogenation approach to synthesize both L- and D- α -amino dicarboxylates of six to eight carbon chain-lengths with high enantiomeric purities,¹⁹ we are now employing these different length α -amino dicarboxylates in our strategy in order to synthesize and study the conformations of a series of azabicyclic dipeptide analogues.

Acknowledgment: This research was supported in part by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, and the Ministère de l'Éducation du Québec. W. D. L. thanks Bio-Méga/Boehringer Ingelheim Recherche Inc. for a Young Investigator Award. We thank Sylvie Bilodeau and Dr. M. T. Phan Viet of the Regional High-Field NMR Laboratory for their assistance in establishing the configurations of lactam **9**.

Supplementary Material Available: Experimental details as well as ^1H and ^{13}C NMR spectra of **5-9** and ^1H NMR spectra of **10** (38 pages). This material is contained in many libraries on microfiche, immediately follows this article in the microfilm version of the journal, and can be ordered from the ACS; see any current masthead page for ordering information.

4.1.4 References.

- 1 Recent reviews on peptidomimetics include: (a) Adang, A. E. P.; Hermkens, P. H. H.; Linders, J. T. M.; Ottenheijm, H. C. J.; van Staveren, C. J. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1994**, *113*, 63. (b) Liskamp, R. M. J. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1994**, *113*, 1. (c) Giannis, A.; Kolter, T. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1244. (d) Olson, G. L.; Bolin, D. R.; Bonner, M. P.; Bös, M.; Cook, C. M.; Fry, D. C.; Graves, B. J.; Hatada, M.; Hill, D. E.; Kahn, M.; Madison, V. S.; Rusiecki, V. K.; Sarabu, R.; Sepinwall, J.; Vincent, G. R.; Voss, M. E. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3039. (e) "Peptide Secondary Structure Mimetics" *Tetrahedron*, Symposia-in-print # 50, M. Kahn editor, **1993**, *49*, 3433-3689. (f) Kahn, M. *Synlett* **1993**, 821. (g) Hölzemann, G. *Kontakte (Darmstadt)* **1991**, 3. (h) Ball, J. B.; Alewood, P. F. *J. Mol. Recogn.* **1990**, *3*, 55.
- 2 We have adopted the nomenclature and ring system numbering previously used in references 3e and 5 in order to maintain clarity and consistency when comparing these different heterocyclic systems.
- 3 (a) Nagai, U.; Sato, K. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 647. (b) Nagai, U.; Sato, K.; Nakamura, R.; Kato, R. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3577. (c) Bach, II, A. C.; Markwalder, J. A.; Ripka, W. C. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, *38*, 314. (d) Sato, K.; Hotta, M.; Dong, M.-H.; Hu, H.-Y.; Taulene, J. P.; Goodman, M.; Nagai, U.; Ling, N. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, *38*, 340. (e) Sato, K.; Nagai, U. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1986**, 1231.
- 4 The design of potent angiotensin-converting enzyme inhibitors has also led to the synthesis of some azabicycloalkane amino acid derivatives. Examples include: (a) Flynn, G. A.; Giroux, E. L.; Dage, R.

- C. J. *Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 7914. (b) Flynn, G. A.; Beight, D. W.; Mehdi, S.; Koehl, J. R.; Giroux, E. L.; French, J. F.; Hake, P. W.; Dage, R. C. J. *Med. Chem.* **1993**, *36*, 2420. (c) Attwood, M. R.; Hassall, C. H.; Kröhn, A.; Lawton, G.; Redshaw, S. J. *Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1986**, 1011. (d) Thomas, W. A.; Whitcombe, I. W. A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* **1986**, 747.
- 5 Baldwin, J. E.; Hulme, C.; Schofield, C. J.; Edwards, A. J. J. *Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 935.
- 6 (a) Robl, J. A. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 393. This work also describes preparation of methyl 2-oxo-3-phthalimido-1-azabicyclo[5.4.0]undecane-11-carboxylate. (b) Thorsett, E. D. *Actual. Chim. Théor.* **1986**, *13*, 257. This work also describes preparation of methyl 2-oxo-3-amino-8-thia-1-azabicyclo[5.3.0]decane-10-carboxylate. (c) A radical cyclization approach to 2-oxo-3-*N*-(acetyl)amino-1-azabicyclo[5.3.0]decane-10-carboxylate is presented in: Colombo, L.; Di Giacomo, M.; Papeo, G.; Carugo, O.; Scolastico, C.; Manzoni, L. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 4031.
- 7 Three examples of azabicyclo[4.3.0]nonane derivatives related to **1** were reported during the preparation of this manuscript. (a) Hanessian, S.; Ronan, B.; Laoui, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 1397. (b) de la Figuera, N.; Rozas, I.; García-López, M. T.; González-Muñiz, R. J. *Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 613. (c) Mueller, R.; Revesz, L. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 4091.
- 8 (a) Moeller, K. D.; Hanau, C. E.; d'Avignon, A. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 825. (b) Moeller, K. D.; Hanau, C. E. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 6041. (c) Moeller, K. D.; Rothfus, S. L. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2913.

- 9 Some recent syntheses of alternative azabicycloalkane mimetics include: a type II β -turn peptidomimetic described in: (a) Genin, M. J.; Johnson, R. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8778, as well as type VI β -turn peptidomimetics described in: (b) Dumas, J.-P.; Germanas, J. P. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 1493; (c) Gramberg, D.; Robinson, J. A. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 861.
- 10 Ibrahim, H. H.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 6438.
- 11 Williams, R. M.; Yuan, C. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6519 and reference 3 therein.
- 12 (a) Nutt, R. F.; Veber, D. F.; Saperstein, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 6539. (b) Nutt, R. F.; Strachan, R. G.; Veber, D. F.; Holly, F. W. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 3078.
- 13 (a) Lubell, W. D.; Rapoport, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7447. (b) Lubell, W. D.; Jamison, T. F.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3511.
- 14 McCaldin, D. *J. Chem. Rev.* **1960**, *60*, 39.
- 15 The structures of lactam **9** were confirmed by H,H-COSY, H,C-COSY, DEPT, NOE difference, NOESY, ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy (see Supplementary Material).
- 16 Reviews and leading articles on β -turns include: (a) Wilmot, C. M.; Thornton, J. M. *J. Mol. Biol.* **1988**, *203*, 221. (b) Rose, G. D.; Gierasch, L. M.; Smith, J. A. *Advan. Protein Chem.* **1985**, *37*, 1. (c) Richardson, J. S. *Advan. Protein Chem.* **1981**, *34*, 167. (d) Lewis, P. N.; Momany, F. A.; Scheraga, H. A. *Biochem. Biophys. Acta* **1973**, *303*, 211. (e) Venkatachalam, C. M. *Biopolymers* **1968**, *6*, 1425.
- 17 Conformational analyses were performed with Macromodel version 3.5x and the AMBER force field using solvent (water) treatment

according to McDonald, D. Q.; Still, W. C. *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 7743. The torsion angles for the minimum energy conformer of (3*S*, 6*S*, 9*S*)-*N*'-methyl 2-oxo-3-*N*-(acetyl)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide were $\phi_2 = -113^\circ$ and $\psi_3 = -56^\circ$. The torsion angles for the minimum energy conformer of its (6*R*)-stereoisomer were $\phi_2 = -137^\circ$ and $\psi_3 = -69^\circ$.

- ¹⁸ The importance of type II' β -turns in the formation of β -hairpins is presented in Haque, T. S.; Little, J. C.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 4105 and references therein.
- ¹⁹ Pham, T.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 3676.

4.1.5 Experimental.

General: Unless otherwise noted all reactions were run under argon atmosphere and distilled solvents were transferred by syringe. Tetrahydrofuran (THF) and ether were distilled from sodium / benzophenone immediately before use; 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane and CH_2Cl_2 were distilled from CaH_2 ; Et_3N was distilled from BaO . Final reaction mixture solutions were dried over Na_2SO_4 . Chromatography was on 230-400 mesh silica gel; TLC on aluminum-backed silica plates. The following solvent systems were used: eluant A, EtOAc / hexanes (10:90); eluant B, EtOAc / hexanes (50:50); eluant C, *n*-BuOH/AcOH/ H_2O (4:1:1); eluant D, EtOAc/AcOH (20:1). Melting points are uncorrected. Mass spectral data, HRMS (EI), were obtained by the Université de Montréal Mass Spec. facility. ^1H NMR (300/400 MHz) and ^{13}C NMR (75/100 MHz)

spectra were recorded in CDCl₃. Chemical shifts are reported in ppm (δ units) downfield of internal tetramethylsilane ((CH₃)₄Si). Chemical shifts for aromatic carbons are not reported.

β -Keto Esters 6 A solution of *n*-butyllithium in hexanes (3.1 mL, 2.1 M, 110 mol %) was added to a -5 °C solution of 1,1,1,3,3-hexamethyldisilazane (2.2 mL, 10.5 mmol, 180 mol %) in THF (12 mL), stirred for 20 min, cooled to -78 °C, and added over 1 h to a -78 °C solution of α -*tert*-butyl γ -methyl *N*-(9-(9-phenylfluorenyl))glutamate (**5**, 2.74 g, 6 mmol, 100 mol %)¹⁰ in THF (6 mL). The reaction mixture was stirred for an additional 3 h at -78 °C and then partitioned between EtOAc (15 mL) and 1 M NaH₂PO₄ (25 mL). The aqueous phase was extracted with EtOAc (3 \times 15 mL). The organic layers were combined, washed with brine, dried, and evaporated to a foam that was purified by chromatography on silica gel using a gradient of 10-30% Et₂O in hexanes as eluant. First to elute from the column was recovered **5** (1.18 g, 45%) followed by a 1.2:1 mixture of diastereomeric β -keto esters **6** (1.38 g, 52%). **β -Keto Esters 6:** ¹H NMR δ 1.2 (s, 36 H), 1.6-1.75 (m, 4 H), 1.9 (t, 2 H), 2.3-2.6 (m, 4 H), 2.7-2.95 (m, 2 H), 3.15 (s, 2 H), 3.6 (s, 3 H), 3.75 (s, 3 H), 3.95 (m, 2 H), 7.2-7.7 (m, 52 H); ¹³C NMR δ 27.78, 27.8, 29, 29.1, 33.3, 33.4, 38.4, 38.6, 52.1, 52.3, 54.9, 55, 55.6, 55.9, 72.85, 72.91, 80.7, 80, 169.6, 170.2, 174.82, 174.85, 204, 204.8; HRMS calcd for C₅₇H₅₉N₂O₇ (MH⁺) 883.4323, found 883.4327. At elevated temperatures minor amounts of **7** were isolated from the mixture. **(2S)-*tert*-Butyl *N*-(PhFl)pyroglutamate (7):** mp 203-205 °C; [α]_D²⁰ -120.6° (*c* 1.3, CHCl₃); ¹H NMR δ 1.23 (s, 9 H), 1.85 (m, 1 H), 2.15-2.4 (m, 2 H), 2.67 (m, 1 H), 3.9 (d, 1 H), 7.2-7.8 (m, 13 H); ¹³C

NMR δ 25, 27.4, 30.9, 61.5, 73, 81.2, 171.3, 176.3; HRMS calcd for $C_{28}H_{27}NO_3$ (M^+) 425.1991, found 425.1981.

(2*S*, 8*S*)-Di-*tert*-butyl 5-Oxo 2,8-Di-*N*-(PhFl)amino Azelate (8) β -Keto esters **6** (1.14 mg, 1.29 mmol) in THF (12 mL), was treated with 2 M lithium hydroxide (10 mL) and stirred at a reflux for 12 h when TLC showed complete disappearance of starting **6**. The mixture was partitioned between EtOAc (15 mL) and NaH_2PO_4 (1 M, 15 mL) and the aqueous phase was extracted with EtOAc (3x10 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried, and evaporated to a foam that was purified by chromatography using eluant A. Evaporation of the collected fractions gave 750 mg (70%) of **8**. **Azelate 8**: $[\alpha]_D^{20}$ -174.9° (c 2.2, MeOH); 1H NMR δ 1.05 (s, 9 H), 1.55 (m, 2 H), 2.25 (m, 1 H), 2.4 (m, 2 H), 3 (br s, 1 H), 7-7.6 (m, 13 H); ^{13}C NMR δ 27.8, 29.3, 38.9, 55.1, 72.9, 80.6, 174.9, 209.8; HRMS calcd for $C_{55}H_{57}N_2O_5$ (MH^+) 825.4267, found 825.4230.

(3*S*, 6*S*, 9*S*)- and (3*S*, 6*R*, 9*S*)-Methyl 2-Oxo-3-*N*-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylates (9). A solution of azelate **8** (420 mg, 0.51 mmol) in EtOH (15 mL) and AcOH (1.5 mL) was treated with palladium-on-carbon (10 wt%, 51.8 mg) and stirred under 5 atm of hydrogen for 24 h. The mixture was filtered on celite, the catalyst was washed with EtOH (10 mL), and the combined organic phase was evaporated to a solid that was dissolved in a solution of TFA (1.5 mL) and CH_2Cl_2 (7.5 mL) and stirred 5 h when TLC (eluant C) showed complete disappearance of the starting ninhydrin positive material (R_f = 0.46) and formation of a new ninhydrin positive product (R_f = 0.22). The volatiles

were removed under vacuum, the residue was dissolved in a 0 °C solution of CH₃COCl (0.7 mL) in MeOH (8 mL), and the solution was stirred at room temperature for 24 h when TLC (eluant C) showed complete conversion to a new ninhydrin positive product ($R_f = 0.38$). The volatiles were removed under vacuum. The amino ester hydrochloride residue was dissolved in CH₂Cl₂ (8 mL), cooled to 0 °C, treated with di-*tert*-butyldicarbonate (534 mg, 2.45 mmol) and triethylamine (0.71 mL, 0.98 mmol), and stirred at room temperature for 1.5 h. The mixture was partitioned between EtOAc (5 mL) and NaH₂PO₄ (1 M, 5 mL) and the aqueous phase was extracted with EtOAc (3 × 5 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried, and evaporated to an oil that was chromatographed with 1:1 hexanes:EtOAc as eluant. Evaporation of the collected fractions gave first concave (6*S*)-**9** (99 mg, 62%; $R_f = 0.23$, eluant B) followed by convex (6*R*)-**9** (12 mg, 8%; $R_f = 0.08$, eluant B). **Ester (6*S*)-9**: $[\alpha]_D^{20} -47.9^\circ$ (c 6.12, MeOH); ¹H NMR δ 1.45 (s, 9 H), 1.7 (m, 3 H), 2.1 (m, 4 H), 2.45 (m, 1 H), 3.7 (m, 1 H), 3.75 (s, 3 H), 4.15 (m, 1 H), 4.5 (d, 1 H), 5.5 (br s, 1 H); ¹³C NMR δ 26.8, 27.2, 28.3, 28.9, 32.0, 49.9, 52.2, 56.4, 58.1, 79.4, 155.6, 169.1, 172.1; HRMS calcd for C₁₅H₂₅N₂O₅ (MH⁺) 313.1764, found 313.1785. **Ester (6*R*)-9**: $[\alpha]_D^{20} -25.3^\circ$ (c 1.1, MeOH); ¹H NMR δ 1.4 (s, 9 H), 1.5-1.8 (m, 3 H), 1.9-2.1 (m, 4 H), 2.4 (m, 1 H), 3.56 (m, 1 H), 3.65 (s, 3 H), 3.86 (m, 1 H), 4.38 (d, 1 H), 5.17 (br s, 1 H); ¹³C NMR δ 27, 28, 28.5, 29, 32, 52, 52, 58, 60, 79, 156, 168, 172.

(3*S*, 6*S*, 9*S*)- and (3*S*, 6*S*, 9*R*)-2-Oxo-3-*N*-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic Acid ((3*S*, 6*S*, 9*S*)-1** and (3*S*, 6*S*, 9*R*)-**1**)**
(3*S*, 6*S*, 9*S*)-Methyl 3-*N*-(BOC)amino indolizidin-2-one-9-carboxylate **9**

(0.36 mmol, 113 mg) in THF (4 mL) was treated with 2 M lithium hydroxide (2 mL) and stirred at a reflux for 12 h when TLC (eluant B) showed complete disappearance of starting **9**. The mixture was partitioned between EtOAc (10 mL) and NaH₂PO₄ (1 M, 10 mL). The aqueous phase was extracted with EtOAc (5 × 10 mL). The organic layers were combined, washed with brine, dried, and evaporated to an oil that was chromatographed with 20:1 EtOAc:AcOH as eluant. Evaporation of the collected fractions gave first (3*S*, 6*S*, 9*S*)-**1** (56 mg, 52%; *R_f* = 0.46, eluant D) followed by (3*S*, 6*S*, 9*R*)-**1** (32 mg, 29%; *R_f* = 0.28, eluant D). **Acid** (3*S*, 6*S*, 9*S*)-**1**: [α]_D²⁰ -44.7° (*c* 0.8, CHCl₃); ¹H NMR δ 1.44 (s, 9 H), 1.65-1.75 (m, 3 H), 2.10-2.30 (m, 4 H), 2.42 (m, 1 H), 3.71 (m, 1 H), 4.22 (m, 1 H), 4.54 (d, 1 H), 5.66 (br s, 1 H); ¹³C NMR δ 26.4, 26.8, 28.1, 28.4, 31.8, 49.6, 56.8, 58.5, 79.6, 155.7, 170.3, 174.2; HRMS calcd for C₁₄H₂₃N₂O₅ (MH⁺) 299.1607, found 299.1596. **Acid** (3*S*, 6*S*, 9*R*)-**1**: [α]_D²⁰ -6.5° (*c* 1.7, CHCl₃); ¹H NMR δ 1.42 (s, 9 H), 1.65-1.8 (m, 2 H), 1.89 (m, 2 H), 2 (m, 3 H), 2.25 (m, 1 H), 3.6 (br s, 1 H), 3.95 (br s, 1 H), 4.35 (br s, 1 H), 5.86 (br s, 1 H); ¹³C NMR δ 27.4, 28.9, 29.1, 30.2, 31.3, 51.5, 60, 60.6, 79.4, 156, 169.7, 176.5; HRMS calcd for C₁₄H₂₃N₂O₅ (MH⁺) 299.1607, found 299.1619.

(3*S*, 6*S*, 9*S*)-2-Oxo-3-*N*-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic Acid ((3*S*, 6*S*, 9*S*)-1**)** (3*S*, 6*S*, 9*S*)-Methyl 3-*N*-(BOC)amino indolizidin-2-one-9-carboxylate **9** (0.12 mmol, 37 mg) in THF (2 mL) was treated with 1 M lithium hydroxide (0.25 mL) and stirred at room temperature for 16 h when TLC (eluant B) showed complete disappearance of starting **9**. The mixture was partitioned between EtOAc (5 mL) and 1 M NaH₂PO₄ (5 mL). The aqueous phase was extracted with EtOAc (3 × 5 mL). The organic

layers were combined, washed with brine, dried, and evaporated to an oil which gave 34.4 mg of (3*S*, 6*S*, 9*S*)-**1** (97%).

Determination of Enantiomeric Purity of (3*S*, 6*S*, 9*S*)-Methyl 2-Oxo-3-*N*-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate ((6*S*)-9**).** (3*S*, 6*S*, 9*S*)-3-*N*-(BOC)Amino indolizidin-2-one methyl ester **9** (0.06 mmol, 18 mg) in CH₂Cl₂ (1 mL) was treated with TFA (0.5 mL) and stirred for 4 h when TLC (eluant B) showed complete disappearance of starting **9**. The volatiles were removed under vacuum and the residue was dissolved in 1 mL of THF. The solution was treated with either (*R*)- or (*S*)- α -methylbenzylisocyanate (16 μ L, 0.12 mmol, 200 mol%) and Et₃N (8 μ L, 0.06 mmol, 100 mol%) and heated at a reflux for 3 h. The mixture was cooled and the volatiles were removed under vacuum to a residue which was directly examined by NMR. The limits of detection were determined by observation of the diastereomeric methyl ester singlets in the 400 MHz ¹H NMR in C₆D₆ during incremental doping experiments which demonstrated *S*- and *R*-**10** to be of >99% diastereomeric purity.

Urea R-10: ¹H NMR (C₆D₆) δ 1.21 (m, 3 H), 1.33 (d, 3 H, *J* = 6.9), 1.47 (m, 3 H), 1.6 (m, 1 H), 2.38 (m, 1 H), 2.83 (m, 1 H), 3.33 (s, 3 H), 4.21 (d, 1 H, *J* = 8.2), 4.34 (m, 1 H), 5.13 (m, 1 H), 5.5 (br s, 1 H), 6.05 (br s, 1 H), 7.15 (m, 5 H).

Urea S-10: ¹H NMR (C₆D₆) δ 1.23 (m, 2 H), 1.33 (m, 2 H), 1.39 (d, 3 H, *J* = 6.8), 1.47 (m, 1 H), 1.63 (m, 1 H), 2.3 (m, 1 H), 2.81 (m, 1 H), 3.3 (s, 3 H), 4.24 (d, 1 H, *J* = 8), 4.45 (m, 1 H), 5.16 (m, 1 H), 5.55 (br s, 1 H), 6.06 (br s, 1 H), 7.15 (m, 5 H).

CHAPITRE 4

*Rigid Dipeptide Mimetics.**Efficient Synthesis of Enantiopure Indolizidinone Amino Acids.*

Henry-Georges Lombart and William D. Lubell*

Journal of Organic Chemistry, 1996, 61, 9437-9446.

4.2.1 Abstract.

An effective means to synthesize indolizidinone amino acid has been developed and furnishes all possible stereoisomers of these conformationally rigid mimetics of peptide secondary structures. Inexpensive glutamic acid was employed as chiral educt in a Claisen condensation / reductive amination / lactam cyclization sequence that furnished stereoselectively azabicyclo[3.4.0]alkane amino acid **1**. Enantiopure (3*S*, 6*S*, 9*S*)- and (3*R*, 6*R*, 9*R*)-2-oxo-3-*N*-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic acids ((3*S*, 6*S*, 9*S*)- and (3*R*, 6*R*, 9*R*)-**1**) were respectively synthesized from L- and D-*N*-(PhF)glutamates **2** (PhF = 9-(9-Phenylfluorenyl)). Slow addition of sodium bis(trimethylsilyl)amide to **2** provided good to excellent yields of β -keto esters **3**, that were subsequently hydrolyzed and decarboxylated to give symmetric α,ω -di-[*N*-(PhF)amino]azelate δ -ketones **5**. Augmentation of hydrogen pressure

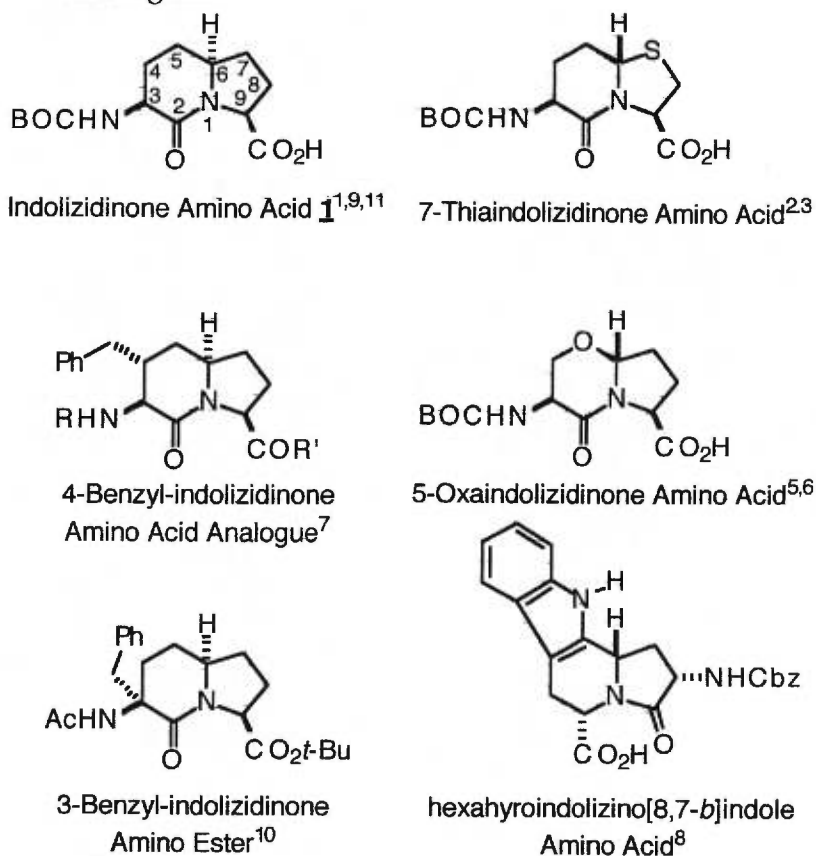
increased diastereoselectivity in reductive aminations with **5** and afforded 5-alkylprolines **8** and **10**. Lactam formation on exposure of **10** to triethylamine and *N*-protection with di-*tert*-butyldicarbonate gave methyl 2-oxo-3-*N*-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate **12** which on C-terminal ester hydrolysis with hydroxide ion gave enantiopure *N*-(BOC)amino indolizidinone acid **1**. Alternatively, hydride addition to ketone **5a** gave symmetric α,ω -di-[*N*-(PhF)amino]azelate δ -alcohol **7a** which upon mesylation and intramolecular S_N2 displacement by the PhF amine gave specifically *cis*-5-alkylproline **15** that was similarly converted to (3*S*, 6*S*, 9*S*)-**1**. In addition, epimerization of the C-9 stereocenter of (3*S*, 6*S*, 9*S*)-*N*-(BOC)amino indolizidinone methyl ester **12** with NaN(SiMe₃)₂ and ester hydrolysis gave (3*S*, 6*S*, 9*R*)-indolizidinone amino acid (3*S*, 6*S*, 9*R*)-**1**. By providing efficient methodology for synthesizing all of the possible stereoisomers of enantiopure indolizidinone amino acid **1**, our route is specifically designed to enhance the general use of these peptide mimetics in the exploration of conformation-activity relationships of various biologically active peptides.

4.2.2 Introduction.

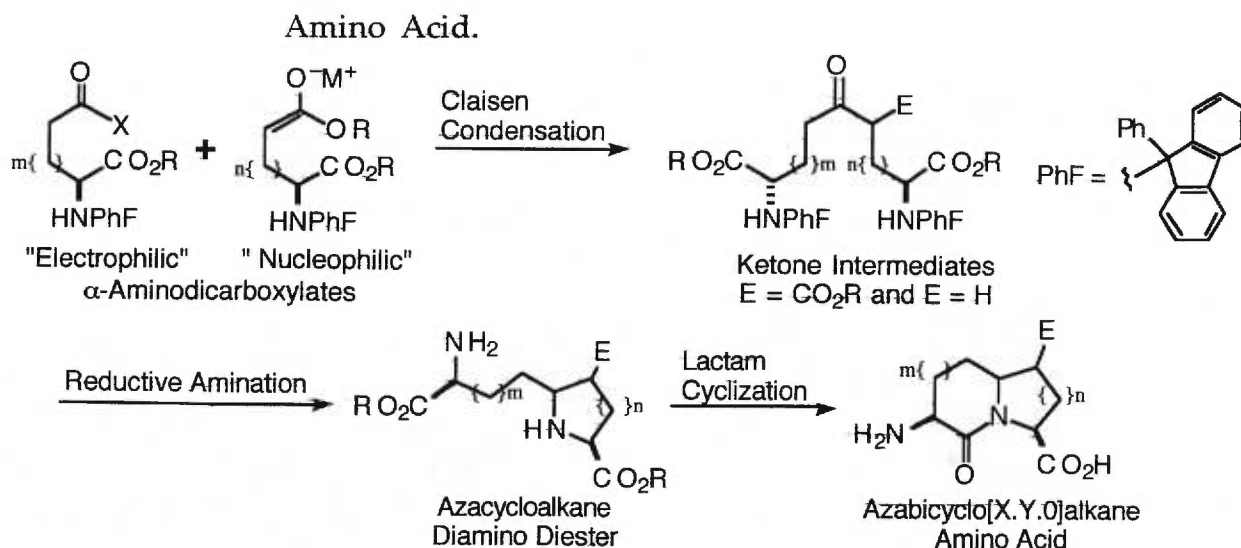
Azabicyclo[X.Y.0]alkane amino acids are an important class of dipeptide analogues having restrained back-bone and side-chain conformations (Figure 1).¹⁻¹⁷ The growing use of these dipeptide surrogates in the investigation of structure-activity relationships of various biologically active peptides has created a demand for new

methodology for synthesizing these peptide mimetics.¹⁻¹⁷ Ideally, approaches for making azabicycloalkane amino acid should overcome three important challenges. First, the fused azacycloalkane heterocycle should be synthesized unambiguously in a predictable manner. Second, chiral centers should be introduced with stereocontrol at the α and bridge-head carbons. Finally, the appendage of side-chains onto the heterocycle is desired in order to synthesize analogues that mimic both peptide backbone and side-chain geometries.^{4,7,8,10}

Figure 1. Representative Examples of Indolizidinone Amino Acid Analogues.



Scheme 1. General Approach for Synthesizing Azabicyclo[X.Y.0]alkane



By targeting initially on the synthesis of azabicyclo[3.4.0]alkane amino acids, we are developing a general approach in order to meet this criterion. Our method utilizes configurationally stable *N*-(9-(9-phenylfluorenyl))aminodicarboxylates in a Claisen condensation / reductive amination / lactam cyclization sequence in order to furnish stereoselectively azabicycloalkane amino acid (Scheme 1, PhF = 9-(9-phenylfluorenyl)).¹¹ Employment of different aminodicarboxylates, such as glutamate, aspartate and longer aminodicarboxylates, in this scheme is designed to provide a variety of heterocyclic ring-sizes. In theory, side-chains may be added to the heterocycle via alkylations and additions on the *N*-(PhF)amino ketone intermediates.¹⁸ By employing inexpensive glutamic acid as chiral educt in this approach, we have developed an efficient synthesis of enantiopure indolizidinone amino acid **1** that gives access to all of the possible stereoisomers of these interesting dipeptide mimetics.

Indolizidinone amino acid **1** was selected as our first target because azabicyclo[3.4.0]alkane amino acids have been well studied in peptide structures, and because their different configurational isomers have been used to illustrate the importance of particular conformations for peptide bioactivity.²⁻¹⁶ For example, a thiaindolizidinone amino acid with (3*S*, 6*R*, 9*R*)-stereochemistry was recently used to stabilize the active conformation in a potent analogue of cyclosporin A.^{3d} Indolizidinone amino acids with (3*S*, 6*R*, 9*S*)-stereochemistry have also been shown to adopt both type II' β -turn and γ -turn conformations in mimetics of different biologically active peptides.^{3a,b,e} The all carbon indolizidinone system was selected for synthesis,⁷⁻¹² instead of thia- and oxa-analogues,²⁻⁶ because of three reasons. First, the methylene protons add increased rigidity to the indolizidinone by creating additional gauche interactions. Side-chain functional groups may be appended at the ring carbons. Finally, analogues possessing saturated thiazo- and oxazo-ring systems are inherently more prone to degradation via processes that may hydrolyze the masked aldehyde during metabolism *in vivo* as well as during peptide synthesis.

We now provide full details of our method for synthesizing indolizidinone amino acid **1**.¹¹ Several observations have led to improvements in overall yield and efficiency. For example, a relationship between hydrogen pressure and diastereoselectivity in the reductive amination step was observed and employed to control the bridge-head carbon stereochemistry. A new route featuring the activation and intramolecular displacement of a symmetric alcohol has been explored to

stereospecifically synthesize (3*S*, 6*S*, 9*S*)-**1**. Regioselective enolization of indolizidinone amino ester now gives access to epimers at C-9. Moreover, the number of steps to synthesize **1** has been reduced via the employment of dimethyl *N*-(PhF)glutamate **2b** in the Claisen condensation / reductive amination / lactam cyclization sequence. Because indolizidinone amino acid **1** is suitable for incorporation into peptides using standard techniques,¹² our route is specifically designed to enhance the general use of these peptide mimetics in the exploration of conformation-activity relationships of various biologically active peptides.

4.2.3 Results and Discussion.

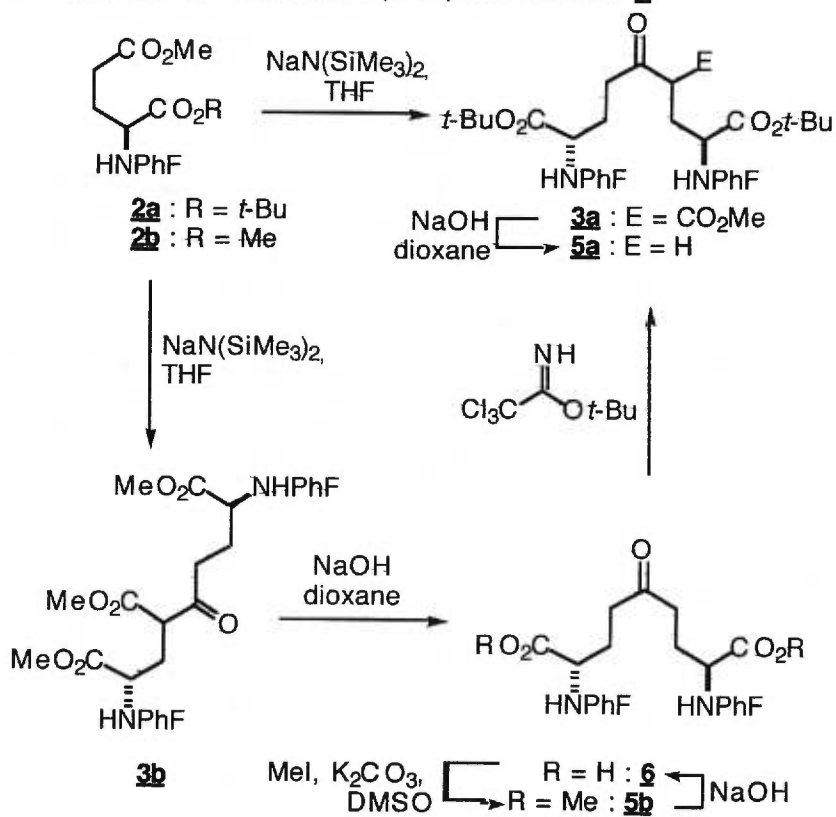
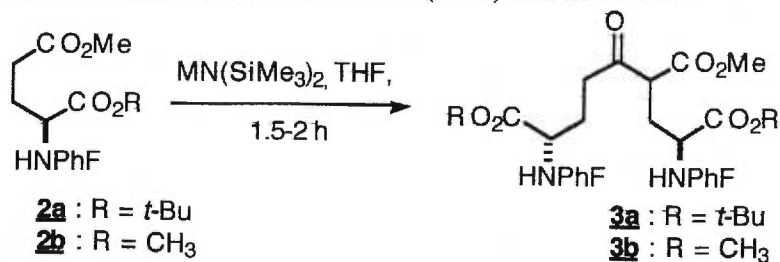
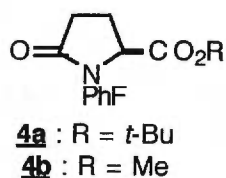
4.2.3.1 Synthesis of α,ω -Diaminodicarboxylate via Claisen Condensation of *N*-(PhF)Glutamates.Scheme 2. Synthesis of 5-Oxo-2,8-Di-[*N*-(PhF)amino]azelates **5** Via ClaisenCondensations of *N*-(PhF)Glutamates **2**.

Table 1. Claisen Condensation of *N*-(PhF)Glutamates.^a

entry	R	MN(SiMe ₃) ₂ (Mol %)	Temp (°C)	[2] M	% 3	% rcvd 2	% 4
a	<i>t</i> -Bu	Li (110)	-78°C	0.3	52	45	2
b	"	Na (110)	-78°C	0.5	69	27	2
c	"	K (110)	-78°C	0.3	-	100	-
d	"	Na (110)	-30°C	0.5	80	2	10
e	"	Na (110)	-20°C	0.5	77	-	15
f	"	Na (50)	-78°C	0.3	24	69	6
g	"	Na (220)	-78°C	0.7	52	42	6
h	"	Na (110)	-30°C	0.1	75	-	25
i	"	Na (110)	-30°C	1.0	69	5	25
j	Me	Na (110)	-50°C	0.45	65 ^b	13	22

^aIsolated yields.

The Claisen condensation of *N*-(PhF)aminodicarboxylates is an effective means for preparing functionalized α,ω -diaminodicarboxylates (Scheme 2). For example, slow addition of sodium bis(trimethylsilyl)amide (1 M in THF) to a solution of (2*S*)- α -*tert*-butyl γ -methyl *N*-(PhF)glutamate ((2*S*)-**2a**) in THF at -30 °C provided (2*S*, 4*RS*, 8*S*)-di-*tert*-butyl 4-carbomethoxy-5-oxo-2,8-di-[*N*-(PhF)amino]azelate ((2*S*, 4*RS*, 8*S*)-**3a**) in 80 % yield (Table 1, entry d). Like the alkylation,¹⁹

acylation,²⁰ aldol²¹ and Dieckmann²² reactions of aminodicarboxylates, this Claisen condensation proceeds via regioselective enolization of the ω -ester. Sodium enolates generated with $\text{NaN}(\text{SiMe}_3)_2$ as base gave the best yields of β -keto ester **3**. Lithium enolates were less reactive and potassium enolates gave no condensation products at all in reactions using bis-trimethylsilylamide bases. Although potassium enolates react well under alkylation conditions,¹⁹ we have yet to acylate the potassium enolate of *N*-(PhF)glutamate **2a**.^{20a} Attempts were also unsuccessful to effect Claisen condensation with methoxide in methanol. The Claisen condensation was usually complete after 2 h. Since enolization of the condensation product depletes base, and since excess base consumes electrophile, the stoichiometry and the rate of addition of $\text{NaN}(\text{SiMe}_3)_2$ to **2a** were both important for obtaining good yields of β -keto ester **3** (Table 1, entries b, f and g).

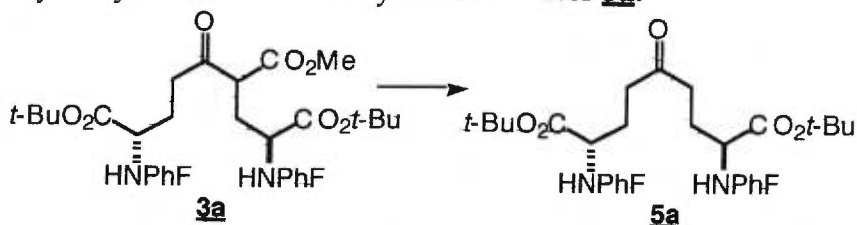
Dimethyl *N*-(PhF)glutamate (**2b**) was employed next in the Claisen condensation using conditions optimized with α -*tert*-butyl γ -methyl *N*-(PhF)glutamate (**2a**) at -50 °C (Table 1, entry j). Synthesis of **2b** proceeded in excellent yield by esterification of glutamate in methanolic HCl followed by phenylfluorenation.²³ Because the kinetic γ -esterification as well as the α -*tert*-butyl esterification steps are avoided, the preparation of **2b** is simpler and higher yielding than that for **2a** (**2a** = 3 steps, 44% yield; **2b** = 2 steps, 88% yield).^{23,24} With the conditions optimized on **2a**, the Claisen condensation of dimethyl ester **2b** gave lower yields than the reaction with **2a**; however, multi-gram quantities of β -keto ester **3b** could be obtained in 60% yield after chromatography.

N-(PhF)Pyroglutamate **4** was isolated from the Claisen condensation reaction mixtures. Pyroglutamate formation was favored at higher temperatures. For example, the condensation of dimethyl ester **2b** at 0 °C gave *N*-(PhF)pyroglutamate methyl ester (**4b**) as the major product. Glutamate **2** was destroyed when the Claisen condensation was run at room temperature leaving behind considerable amounts of base-line material on TLC. Pyroglutamate **4** most likely arises from decomposition of the enolate with loss of methoxide to form a ketene intermediate that undergoes intramolecular cyclization onto the phenylfluorenyl nitrogen. The steric bulk of the α -*tert*-butyl ester seems to retard the formation of *N*-(PhF)pyroglutamate **4a**, which was a minor component of the product from the condensation of α -*tert*-butyl γ -methyl *N*-(PhF)glutamate (**2a**).

(2*S*, 8*S*)-Di-*tert*-butyl 5-oxo-2,8-di-[*N*-(PhF)amino]azellate ((2*S*, 8*S*)-**5a**) was synthesized via hydrolysis and decarboxylation of β -keto ester **3a** (Table 2). When the hydrolysis was conducted in refluxing THF, pyroglutamate **4a** was again isolated. Its formation may result from a retro-Claisen reaction and subsequent cyclization via the mechanism described above. β -Keto ester **3a** remained unchanged after treatment with potassium trimethylsilanolate in ether for 24 h²⁵ and decomposed on heating in wet DMSO at 160 °C.²⁶ The best conditions for decarboxylation of β -keto ester **3a** employed 2N NaOH in dioxane and afforded quantitatively azelate **5a**. In addition, we found that isolation of β -keto ester **3a** was unnecessary and glutamate (2*S*)-**2a** could be converted to symmetric azelate (2*S*, 8*S*)-**5a** in 75% overall yield after Claisen condensation, hydrolysis, decarboxylation and chromatography. (2*R*, 8*R*)-

Di-*tert*-butyl diamino azelate (2*R*, 8*R*)-**5a** was prepared in similar yield by employing D-glutamate in the sequence described above (Scheme 2).

Table 2. Hydrolysis and Decarboxylation of Ester **3a**.^a



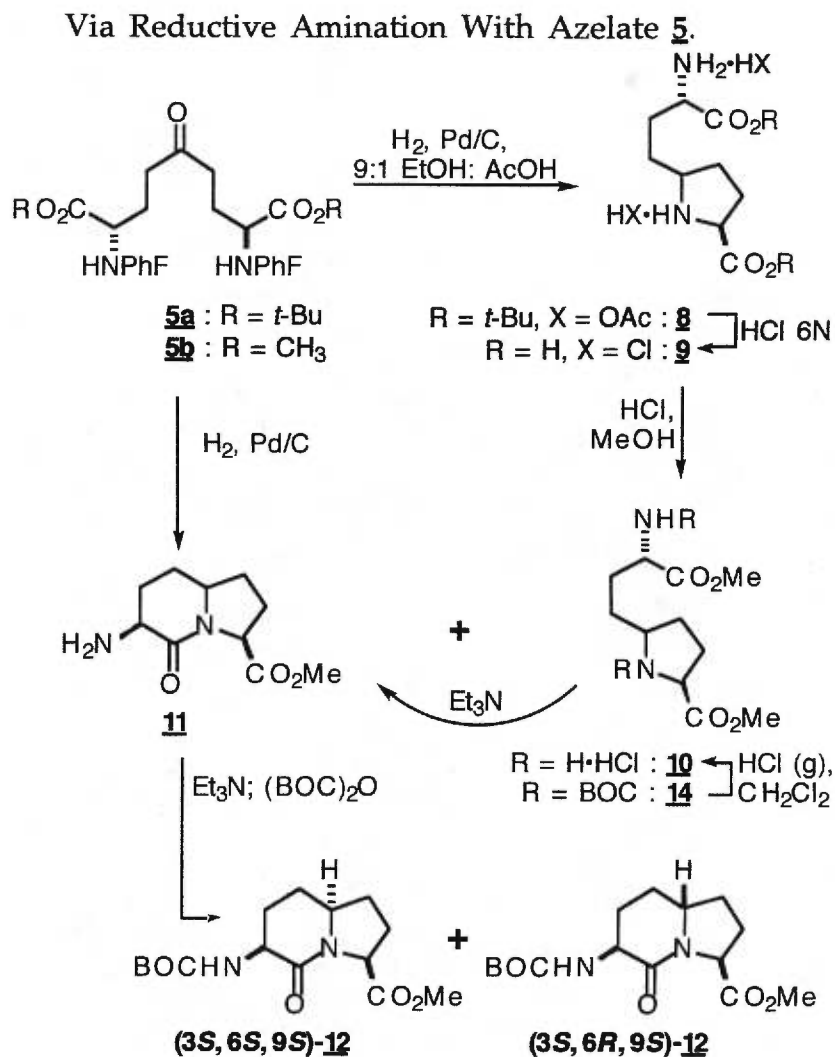
entry	Conditions	Temp (°C)	Solvent	n (mol %)	% 5a	% 4a
a	NaOH (2N)	66	THF	2000	52	12
b	NaOH (2N)	25	THF	1000	68	- ^e
c	LiOH (2N)	25	THF	2000	58	9
d	LiOH (2N)	25	THF	1000	67	4
e	LiOH (2N)	66	THF	1000	70	12
f	LiOH (2N)	66	THF	500	77	5
g	LiOH (2N)	66	THF	300	74	20
h	NaOH (2N)	25 ^b	Dioxane	500	99	-
i	NaOH (2N)	101	Dioxane	500	99	-
j	KO(SiMe ₃) ₂	25	Et ₂ O	150	- ^c	-
k	DMSO-H ₂ O	160	DMSO	-	- ^d	-

^aIsolated yields. ^bReaction time was 24 h. ^c**3a** was recovered unchanged. ^d**3a** decomposed. ^e**4a** was not isolated.

(2*S*, 8*S*)-dimethyl 5-oxo-2,8-di-[*N*-(PhF)amino]azelate ((2*S*, 8*S*)-**5b**, Scheme 2) was obtained in 81% overall yield after chromatography via hydrolysis and decarboxylation of β -keto ester **3b** followed by esterification of 2,8-diamino azelaic acid **6** with iodomethane and potassium carbonate in dimethyl sulfoxide. Hydrolysis of dimethyl azelate **5b** with NaOH in DMSO regenerated 2,8-diamino azelaic acid **6** in 95% yield after

precipitation and recrystallization. Treatment of azelaic acid **6** with *tert*-butyl trichloroacetimidate in dichloromethane:cyclohexane provided an alternative means to synthesize di-*tert*-butyl diaminoazelate **5a** which was furnished in 76% yield.^{24b-d}

A streamlined process gave 2,8-diamino azelate dimethyl ester **5b** in 51% overall yield from dimethyl *N*-(PhF)glutamate **2b** via a sequence in which β -keto ester **3b** and 2,8-diamino azelaic acid **6** were not isolated (Scheme 3). The added advantage was the ability to recoup 39% of starting dimethyl *N*-(PhF)glutamate (**2b**) as the other product isolated from chromatography of **5b**. Evidently, pyroglutamate **4b** was hydrolyzed to *N*-(PhF)glutamate during the decarboxylation of **3b** with NaOH in dioxane. Subsequent esterification of *N*-(PhF)glutamate provided **2b** for reuse in the Claisen condensation. Accounting for the recovery of starting **2b**, the overall yield of (2*S*, 8*S*)-**5b** from L-glutamic acid was 72%.

4.2.3.2 Synthesis of Indolizidinone Amino Acid **1**.**Scheme 3.** Synthesis of *N*-(BOC)Amino Indolizidinone Methyl Ester **12**

Indolizidinone amino acid **1** was synthesized from diamino azelate **5** via two different routes: one featuring reductive amination of symmetric δ -amino ketone **5** (Schemes 3), the other involving hydride reduction of **5** followed by activation and intramolecular displacement of symmetric δ -amino alcohol **7** (Scheme 5). In the reductive amination

sequence, hydrogenation of diamino azelate **5a** with palladium-on-carbon as catalyst in 9:1 EtOH:AcOH proceeded by cleavage of the phenylfluorenyl groups, intramolecular imine formation, protonation, and hydrogen addition to the iminium ion intermediate. Because of symmetry, either amine of azelate **5** can condense with the δ -ketone in order to furnish the same 5-alkylproline *tert*-butyl ester **8**. Diamino diester **8** was not isolated at this time; instead, the *tert*-butyl esters were removed by acid solvolysis with either TFA or 6N HCl to furnish diamino acid **9**. Methyl 2-oxo-3-*N*-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate **12** was then obtained in 60-70% overall yields from **5a** after esterification of **9** with methanolic HCl, lactam cyclization, *N*-acylation of ester **11** with di-*tert*-butyldicarbonate and Et₃N in CH₂Cl₂, and chromatography (Scheme 4).

Scheme 4. Synthesis of **12** Via Reductive Amination of **5a**.

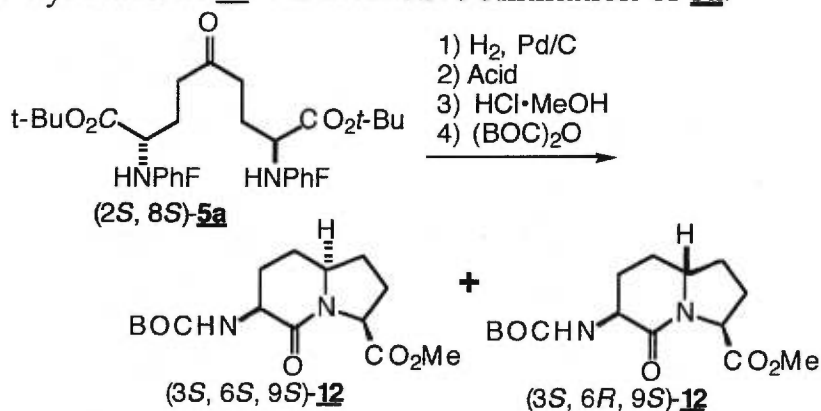


Table 3. Influence of H₂ Pressure on Reductive Amination of **5a**.^a

entry	H ₂ P (atm)	Acid	% (6 <i>S</i>)- 12	% (6 <i>R</i>)- 12	d.r.
a	1	TFA	41	22	65:35
b	6	TFA	52	10	84:16
c	11	TFA	54	6	90:10
d	1	6N HCl	45	22	67:33
e	6	6N HCl	64	8	89:11
f	11	6N HCl	66	3	96:4

^aIsolated yields.

A study of the influence of hydrogen pressure on the diastereoselectivity of the reductive amination was performed by measuring the ratio of (3*S*, 6*S*, 9*S*)- and (3*S*, 6*R*, 9*S*)-*N*-(BOC)amino indolizidinone methyl esters **12** after their isolation from the reaction sequence described above (Table 3). We used this indirect method for ascertaining the diastereoselectivity of hydrogenation because 5-alkylprolines **8** and **9** were inseparable by chromatography and because their NMR spectra lacked distinguishable diastereomeric signals. *N*-(BOC)Amino indolizidinone methyl esters **12** were conveniently separated by chromatography with 1:1 EtOAc:hexanes as eluant. Increased hydrogen pressure was found to augment the diastereoselectivity in the reductive amination step with (2*S*, 8*S*)-**5a** such that the ratio of (6*S*)-**12** to (6*R*)-**12** rose from 2:1 up to 24:1 as H₂ pressure was increased from 1 to 11 atm. In addition, we observed that *N*-(BOC)amino indolizidinone methyl esters **12** were obtained in higher yields when 6N HCl was used to deprotect **8** instead of TFA (Table 3). Employment of (2*R*, 8*R*)-**5a** in this

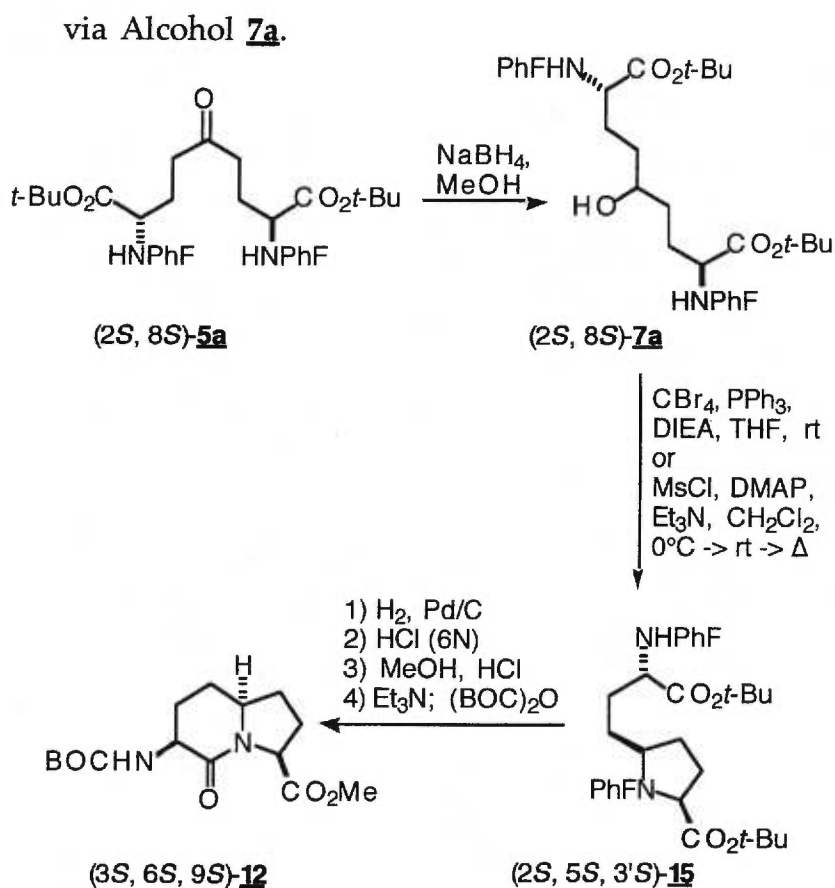
reaction sequence gave similar yields and diastereomeric ratios of (3*R*, 6*R*, 9*R*)- and (3*R*, 6*S*, 9*R*)-*N*-(BOC)amino indolizidinone methyl esters **12**.

Methyl 5-(3'-*N*-(BOC)amino-3'-methyloxycarbonylpropyl)-*N*-(BOC)prolinate (**14**) was isolated in varying yields from the reaction sequence to synthesize **12**. The formation of **14** is due to incomplete lactam formation and subsequent *N*-acylation of the secondary amine with di-*tert*-butyldicarbonate. In order to recycle **14** into *N*-(BOC)amino indolizidinone methyl ester **12**, the BOC groups were first removed with HCl gas in CH₂Cl₂ to provide 5-alkylproline **10** as the hydrochloride salt. Triethylamine in CH₂Cl₂ at room temperature was then used to liberate the amine and convert **10** into lactam **11** (Scheme 3). Conversion was monitored by proton NMR on examination of the disappearance of the methyl ester singlets for **10** (3.87 and 3.89 ppm) and the augmentation of the methyl ester singlet for **11** (3.73 ppm). By following lactam cyclization with ¹H NMR, we could time the addition of di-*tert*-butyldicarbonate to the reaction mixture in order to avoid formation of **14** and thereby enhance the overall yield of *N*-(BOC)amino indolizidinone methyl esters **12**.

(2*S*, 8*S*)-2,8-Diamino azelate dimethyl ester **5b** was next transformed into *N*-(BOC)amino indolizidinone methyl ester **12** using the experience gained with azelate **5a**. Treatment of (2*S*, 8*S*)-**5b** with palladium-on-carbon under 6 atm of H₂ in 10:1 EtOH:AcOH furnished primarily indolizidinone **11** with some 5-alkylproline **10** after removal of the catalyst by filtration and evaporation of solvent. Without further purification, the mixture

was first exposed to Et₃N in CH₂Cl₂ for 3 h at room temperature and then *N*-acylated with di-*tert*-butyldicarbonate. Purification by chromatography provide respectively (3*S*, 6*S*, 9*S*)- and (3*S*, 6*R*, 9*S*)-*N*-(BOC)amino indolizidinone methyl esters **12** in 81% and 2% overall yields (Scheme 3).

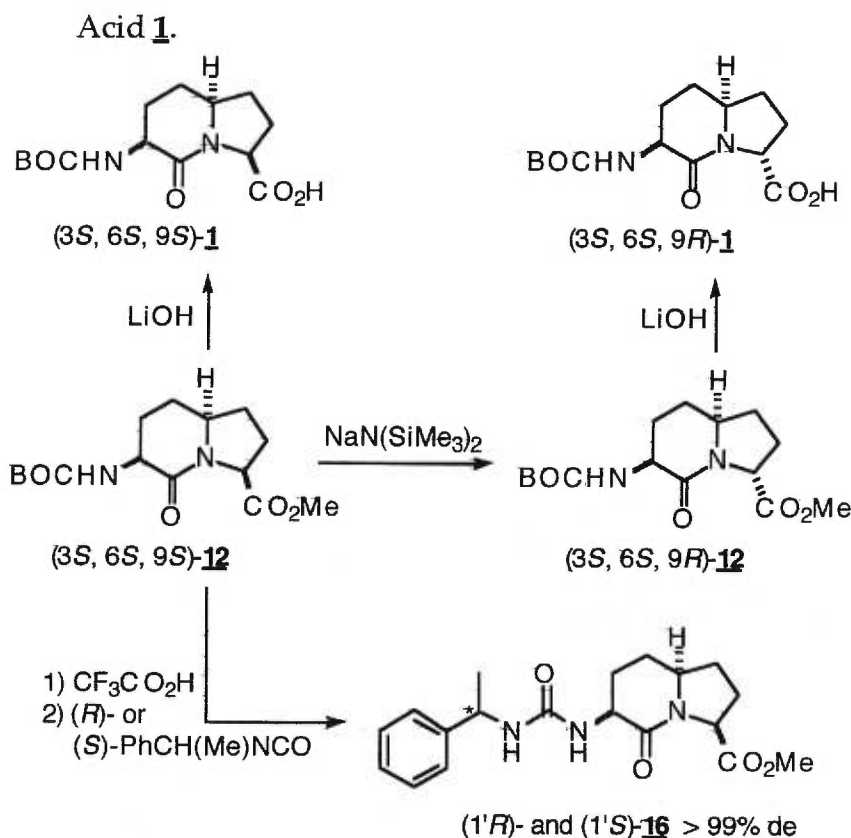
Scheme 5. Synthesis of *N*-(BOC)Amino Indolizidinone Methyl Ester **12**



An alternative method to prepare indolizidinone amino ester **12** was studied that featured activation and intramolecular displacement of symmetric alcohol **7**. The intramolecular S_N2 displacement was specifically examined with (2*S*, 8*S*)-di-*tert*-butyl 5-hydroxy-2,8-di-[*N*-(PhF)amino]azelate ((2*S*, 8*S*)-**7a**) which was synthesized in 89% yield from

reduction of diamino ketone **5a** with NaBH₄ in MeOH. Treatment of **7a** with carbon tetrabromide, triphenylphosphine and diisopropylethylamine in THF at 25 °C for 1 h provided stereospecifically (2*S*, 5*S*, 3'*S*)-*tert*-butyl 5-(3'-*N*-(PhF)amino-3'-methyloxycarbonylpropyl)-*N*-(PhF)prolinate ((2*S*, 5*S*, 3'*S*)-**15**) in 86% yield.^{19d} Stereospecific formation of *cis*-5-alkylproline (2*S*, 5*S*, 3'*S*)-**15** was also achieved in quantitative yield by mesylation of **7a** with methanesulfonyl chloride, Et₃N and DMAP in CH₂Cl₂ at 0 °C followed by heating at reflux. Since the steric effects of the nitrogen and carboxylate protecting groups may alter the relative energies of the diastereomeric transition states for intramolecular S_N2 displacement, we are presently examining other derivatives of **7** in order to prepare *trans*-5-alkylproline (2*S*, 5*R*, 3'*S*)-**15**. *N*-PhF-5-Alkylproline (2*S*, 5*S*, 3'*S*)-**15** was transformed into *N*-(BOC)amino indolizidinone methyl ester **12** by hydrogenolysis of the PhF groups with palladium-on-carbon as catalyst to give **8**, which was converted to **12** as previously described.

N-(BOC)Amino indolizidinone acid **1** was synthesized via hydrolysis of ester **12** (Scheme 6). Epimerization of the C-9 center competed with ester hydrolysis and afforded mixtures of (9*S*)- and (9*R*)-diastereomers **12** that were separated by chromatography on silica gel using AcOH in EtOAc as eluant.²⁷ By controlling the stoichiometry of hydroxide ion in the hydrolysis of (3*S*, 6*S*, 9*S*)-**12**, the amount of epimerization was significantly reduced and (3*S*, 6*S*, 9*S*)-**1** was furnished in >90% yields (Table 4).

Scheme 6. Synthesis and Enantiomeric Purity of Indolizidinone Amino

Furthermore, hydrolysis of (3*R*, 6*R*, 9*R*)- and (3*S*, 6*R*, 9*S*)-*N*-(BOC)amino indolizidinone methyl esters **12** with LiOH furnished respectively (3*R*, 6*R*, 9*R*)- and (3*S*, 6*R*, 9*S*)-**1** in similar yields. Alternatively, enolization of ester (3*S*, 6*S*, 9*S*)-**12** with NaN(SiMe₃)₂ in THF provided a 10 to 1 mixture of (3*S*, 6*S*, 9*R*)-**12** and (3*S*, 6*S*, 9*S*)-**12** in 92% yield. (3*S*, 6*S*, 9*R*)-Methyl 2-oxo-3-*N*-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate ((3*S*, 6*S*, 9*R*)-**12**) was then hydrolyzed quantitatively with LiOH in dioxane to afford (3*S*, 6*S*, 9*R*)-*N*-(BOC)amino indolizidinone acid ((3*S*, 6*S*, 9*R*)-**1**).

Table 4. Synthesis of **1** Via Hydrolysis of Methyl Ester **12**.^a

entry	12	Base (M)	Mol %	Solvent	% Yield ^b (9 <i>S</i>)- 1 : (9 <i>R</i>)- 1
a	(3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)	LiOH (2N)	1000	THF ^c	52 : 29
b	"	LiOH (2N)	2000	THF	64 : 36
c	"	LiOH (1N)	200	THF	97 : -
d	"	LiOH (2N)	200	THF	83 : 6
e	"	LiOH (1N)	120	THF	74 : 13
f	"	LiOH (2N)	200	dioxane	95 : 5
g	"	NaOH (2N)	1000	THF	60 : 30
h	"	NaOH (2N)	200	dioxane	92 : 5
i	(3 <i>R</i> , 6 <i>R</i> , 9 <i>R</i>)	LiOH (2N)	200	THF	10 : 84
j	(3 <i>S</i> , 6 <i>R</i> , 9 <i>S</i>)	LiOH (1N)	150	THF	82 : 5
k	"	LiOH (2N)	200	dioxane	86 : 6
l	(3 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 9 <i>R</i>)	NaOH (2N)	200	dioxane	- : 95

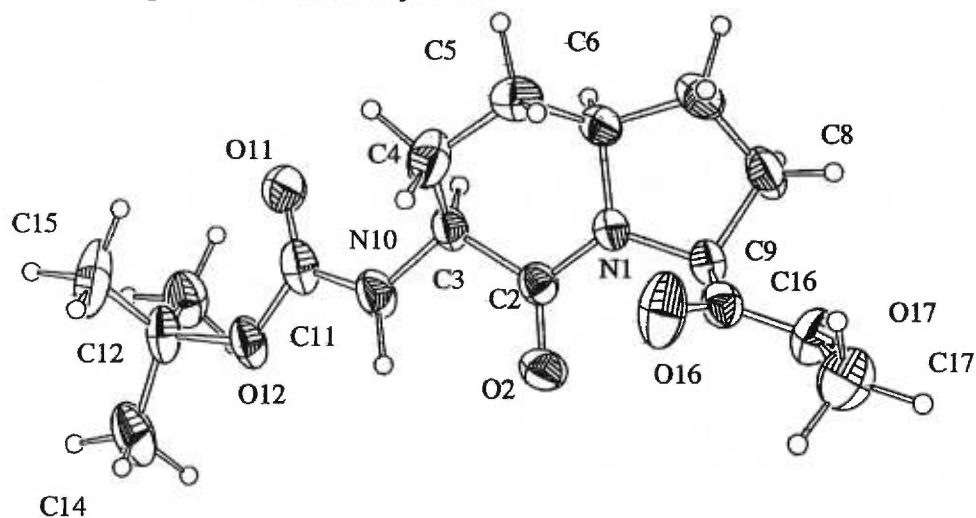
^aUnless noted, the reaction was conducted for 1-2 h at rt in 1:1 vol:vol base:solvent. ^bIsolated yields. ^cHeated at reflux.

4.2.3.3 Assignment of Stereochemistry and Enantiomeric Purity of Indolizidinone Amino Acid **1**.

The bridge-head stereochemistry of *N*-(BOC)amino indolizidinone acid **1** was originally assigned based on analogy with our previous work in which the reductive amination of δ -keto α -amino ester with hydrogen and palladium-on-carbon as catalyst gave predominantly 5-alkylprolines with *cis*-stereochemistry.^{20a} Configurational assignments were supported by NMR experiments in which the nuclear Overhauser effects were measured when the signals of the C-3, C-6 and C-9 protons were irradiated in methyl 2-oxo-3-*N*-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylates

12.^{11a} For example, irradiation of the bridge-head proton (C-6, $\delta = 3.7$) of (3*S*, 6*S*, 9*S*)-**12** produced significant nuclear Overhauser effects at the C-3 ($\delta = 4.15$) and C-9 ($\delta = 4.5$) protons. On the other hand, irradiation of the C-6 ($\delta = 3.64$) proton of (3*S*, 6*S*, 9*R*)-**12** produced a significant nuclear Overhauser effect only at the C-3 ($\delta = 3.93$) proton. Crystallization of (3*S*, 6*S*, 9*S*)-methyl 2-oxo-3-*N*-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate ((3*S*, 6*S*, 9*S*)-**12**) from methanol and X-ray crystallographic analysis confirmed the NMR assignments (Figure 2).²⁸

Figure 2. ORTEP view of Indolizidinone Methyl Ester **12**. Ellipsoids drawn at 40% probability level. Hydrogens represented by spheres of arbitrary size.²⁸



In the crystal structure of (3*S*, 6*S*, 9*S*)-indolizidinone **12**, the dihedral angles of the back-bone atoms constrained inside the heterocycle ($\psi = -176^\circ$ and $\phi = -78^\circ$) resemble the values of the central residues in an ideal type II' β -turn ($\psi_2 = -120^\circ$ and $\phi_3 = -80^\circ$).²⁹ Furthermore, these values compare well with those observed in the crystal structure of a (3*S*, 6*R*, 9*S*)-6-

thiaindolizidinone β -turn dipeptide analogue ($\psi = -161^\circ$ and $\phi = -69^\circ$).^{2b} The observed value of the ϕ dihedral angle of (3*S*, 6*S*, 9*S*)-**12** is also similar to that of an ideal inverse γ -turn conformation ($\psi_2 = -80^\circ$).³⁰

The enantiomeric purity of (6*S*)-**12**, produced from both α -*tert*-butyl γ -methyl *N*-(PhF)glutamate (**2a**) and dimethyl *N*-(PhF)glutamate (**2b**), was determined after conversion to (1'*R*)- and (1'*S*)-*N*- α -methylbenzylureas **16**. Trifluoroacetic acid in CH₂Cl₂ removed quantitatively the *N*-BOC protecting group and the TFA salt was acylated with either (*R*)- or (*S*)- α -methylbenzyl isocyanate in THF with triethylamine (Scheme 6).^{20a} Observation of the diastereomeric methyl ester singlets by 400 MHz ¹H NMR spectroscopy in C₆D₆ during incremental additions of the opposite isomer demonstrated **16** to be of >99% diastereomeric excess. Hence ester **12**, azelates **5**, and 2-oxo-3-*N*-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic acids (**1**) are all presumed to be of >99% enantiomeric purity.

4.2.4 Conclusion.

In the context of our research on general methods for making azabicyclo[X.Y.0]alkane amino acid, we have developed an efficient process for synthesizing enantiopure indolizidinone amino acid **1** (X = 4, Y = 3). (2*S*)-*N*-(PhF)Glutamates (2*S*)-**2a** and (2*S*)-**2b** were used in a Claisen condensation / reductive amination / lactam cyclization sequence to provide enantiopure (3*S*, 6*S*, 9*S*)-indolizidinone amino acid **1** in 61% (7

steps) and 41% (5 steps, 64% accounting for recovery of **2b**) respective overall yields. By employing D-glutamate, (3*R*, 6*R*, 9*R*)-**1** was synthesized in similar yield. The indolizidinone C-6 bridge-head center was created with stereocontrol in favor of the concave *cis*-isomer by augmenting hydrogen pressure in the reductive amination step as well as by mesylation of alcohol **7a** and intramolecular S_N2 displacement by the PhF amine. Convex (3*S*, 6*R*, 9*S*)-**1** was synthesized, albeit with less stereocontrol, by lowering hydrogen pressure in the reductive amination step. Regioselective enolization of indolizidinone amino ester **12** gave access to C-9 epimers and was specifically used to synthesize (3*S*, 6*S*, 9*R*)-**1**. All of the possible configurations of indolizidinone amino acid **1** can therefore be stereoselectively generated via this approach. Furthermore, because alkylation of amino ketones **3** and **5** may be used to add side chains with stereocontrol at different positions on the indolizidinone,¹⁸ and because different length α -aminodicarboxylates may be employed to make alternative heterocycles,³¹ our strategy has great potential for preparing a variety of azabicyclo[X.Y.0]alkane amino acids. This efficient method for synthesizing rigid dipeptide mimetics should thus be of general utility for the study of structure-activity relationships in peptide chemistry and biology.

4.2.5 Experimental.

General: Unless otherwise noted all reactions were run under argon atmosphere and distilled solvents were transferred by syringe. Tetrahydrofuran (THF) and ether were distilled from sodium / benzophenone immediately before use; 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane and CH_2Cl_2 were distilled from CaH; CHCl_3 from P_2O_5 ; triethylamine (Et_3N) was distilled from BaO. Final reaction mixture solutions were dried over Na_2SO_4 . The following solvent systems were used: eluant A, EtOAc / hexanes (1:5); eluant B, EtOAc / hexanes (1:9); eluant C, EtOAc / hexanes (1:2); eluant D, CHCl_3 / MeOH / AcOH (8:1:0.5); eluant E, EtOAc / hexanes (1:3); eluant F, *n*-BuOH / AcOH / H_2O (4:1:1); eluant G, EtOAc / hexanes (1:1); eluant H, EtOAc / hexanes (2:1); eluant I, EtOAc / AcOH (20:1). Melting points are uncorrected. Mass spectral data, HRMS and MS (EI and FAB), were obtained by the Université de Montréal Mass Spec. facility. Unless otherwise noted, ^1H NMR (300/400 MHz) and ^{13}C NMR (75/100 MHz) spectra were recorded in CDCl_3 . Chemical shifts are reported in ppm (δ units) downfield of internal tetramethylsilane ($(\text{CH}_3)_4\text{Si}$), residual CHCl_3 (δ 7.27 and 77 ppm) or residual MeOH (δ 3.31 and 49.15 ppm) and coupling constants are reported in hertz. Chemical shifts of PhF aromatic carbons are not reported for the ^{13}C NMR spectra. Analytical thin-layer chromatography (TLC) was performed by using 2 × 6 cm aluminum-backed silica plates coated with a 0.2 mm thickness of silica gel 60 F254 (Merck). Chromatography was performed using Kieselgel 60 (230-400 mesh).

(2S)- α -*tert*-Butyl γ -Methyl *N*-(PhF)Glutamate ((2S)-2a)²⁴ A solution of γ -methyl *N*-(PhF)glutamate (16.1 g, 40 mmol) in CH₂Cl₂ (40 mL) was treated with a solution of *O-tert*-butyl trichloroacetimidate [17.5 g, 80 mmol, 200 mol %, prepared as described for *O*-benzyl trichloroacetimidate in ref. 23d: R_f = 0.26 in eluant A; ¹H NMR δ 1.58 (s, 9 H)] in cyclohexane (160 mL). The mixture was stirred for 3 days, filtered and treated with a second solution of imidate (17.5 g, 80 mmol, 200 mol %) in cyclohexane (160 mL). After stirring for 2 days at room temperature (rt), the precipitate was removed by filtration and the solution was evaporated under vacuum leaving a residue that was purified by chromatography using 9:1 hexane:EtOAc as eluant. Evaporation of the collected fractions gave a white solid that was recrystallized from isooctane: (2S)-2a, 14.8 g (81%), R_f = 0.55 in eluant A, R_f = 0.50 in eluant B; mp 99-100 °C, lit.^{19d} mp 100 °C; [α]_D²⁰ -246° (c 1.08, CHCl₃); HRMS calcd for C₂₉H₃₂NO₄ (MH⁺) 458.2352, found 458.2331.

(2R)- α -*tert*-Butyl γ -Methyl *N*-(PhF)Glutamate ((2R)-2a) was synthesized from (2R)- γ -methyl *N*-(PhF)glutamate (2 g, 5 mmol) in the same way which gave 1.71 g (75%) of (2R)-2a: [α]_D²⁰ 248° (c 1.04, CHCl₃).

(2S, 8S)-Di-*tert*-butyl 5-Oxo-2,8-di-[*N*-(PhF)amino]azelate ((2S, 8S)-5a) A solution of Na(SiMe₃)₂ (5.95 mL, 5.95 mmol, 110 mol %, 1 M in THF) was added over 30 min to a -30 °C solution of (2S)-2a (2.44 g, 5.41 mmol, 100 mol %) in THF (5.5 mL). The reaction mixture was stirred for an additional 1.5 h at -30 °C and then partitioned between EtOAc (30 mL) and 1 M NaH₂PO₄ (50 mL). The aqueous phase was extracted with EtOAc (3 \times 30 mL) and the organic layers were combined and evaporated to a residue which was normally used in the next reaction without purification.

Purification by chromatography on silica gel using a gradient of 10-30% EtOAc in hexanes as eluant gave first recovered **2a** (25%, $R_f = 0.50$ in eluant B) followed by a 1.2:1 mixture of **(2S, 4RS, 8S)-di-tert-butyl 4-carbomethoxy-5-oxo-2,8-di-[N-(PhF)amino]azelate ((2S, 4RS, 8S)-3a)** (74%): $R_f = 0.44$ in eluant A; $R_f = 0.40$ in eluant B; $^1\text{H NMR } \delta$ 1.2 (s, 36 H), 1.6-1.75 (m, 4 H), 1.9 (t, 2 H), 2.3-2.6 (m, 4 H), 2.7-2.95 (m, 2 H), 3.15 (s, 2 H), 3.6 (s, 3 H), 3.75 (s br, 3 H), 3.95 (m, 2 H), 7.2-7.7 (m, 52 H); $^{13}\text{C NMR } \delta$ 27.78, 27.8, 29, 29.1, 33.3, 33.4, 38.4, 38.6, 52.1, 52.3, 54.9, 55, 55.6, 55.9, 72.85, 72.91, 80.7, 80, 169.6, 170.2, 174.82, 174.85, 204, 204.8; HRMS calcd for $\text{C}_{57}\text{H}_{59}\text{N}_2\text{O}_7$ (MH^+) 883.4323, found 883.4327. On larger scale and at elevated temperatures, we isolated **(2S)-tert-butyl N-(PhF)pyroglutamate ((2S)-4a)**: $R_f = 0.45$ in eluant C; mp 203-205 °C, lit.^{19d} mp 199-202 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -120.6^\circ$ (c 1.3, CHCl_3); $^1\text{H NMR } \delta$ 1.23 (s, 9 H), 1.85 (m, 1 H), 2.15-2.4 (m, 2 H), 2.67 (m, 1 H), 3.9 (d, 1 H), 7.2-7.8 (m, 13 H); $^{13}\text{C NMR } \delta$ 25, 27.4, 30.9, 61.5, 73, 81.2, 171.3, 176.3; HRMS calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{NO}_3$ (M^+) 425.1991, found 425.1981.

The crude condensation product was dissolved in dioxane (7 mL), treated with 2 M NaOH (6.75 mL, 500 mol %), and stirred at a reflux for 1 h when TLC (eluant B) showed complete disappearance of starting **2a**. The mixture was partitioned between EtOAc (15 mL) and NaH_2PO_4 (1 M, 15 mL) and the aqueous phase was extracted with EtOAc (3 × 10 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried, and evaporated to a foam that was purified by chromatography using a gradient of 10-20 % EtOAc in hexanes as eluant. Evaporation of the collected fractions gave 1.66 g (75%) of **(2S, 8S)-di-tert-butyl 5-oxo-2,8-di-[N-(PhF)amino]azelate ((2S, 8S)-5a)** which recrystallized from hexane / Et_2O : $R_f = 0.52$ in eluant A ($R_f = 0.48$ in eluant B); mp 129 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -174.9^\circ$ (c 2.2, MeOH); $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$

-224.1° (*c* 2.2, CHCl₃); ¹H NMR δ 1.05 (s, 9 H), 1.55 (m, 2 H), 2.25 (m, 1 H), 2.4 (m, 2 H), 3 (br s, 1 H), 7-7.6 (m, 13 H); ¹³C NMR δ 27.8, 29.3, 38.9, 55.1, 72.9, 80.6, 174.9, 209.8; HRMS calcd for C₅₅H₅₇N₂O₅ (MH⁺) 825.4267, found 825.4230; Anal. Calcd for C₅₅H₅₆N₂O₅: C, 79.96; H, 6.96; N, 3.39. Found: C, 79.97; H, 7.04; N, 3.40. When pure **3a** was used, (2*S*, 8*S*)-**5a** was obtained in 99% yield.

(2*R*, 8*R*)-Di-*tert*-butyl 5-Oxo-2,8-[di-*N*-(PhF)amino]azelate ((2*R*, 8*R*)-5a**)** was prepared from (2*R*)- α -*tert*-butyl γ -methyl *N*-(PhF)glutamate ((2*R*)-**2a**, 0.914 g, 2 mmol, 100 mol %) in a similar manner using a solution of NaN(Si(CH₃)₃)₂ (110 mol %) in THF at -78 °C for the condensation and 1 M LiOH (500 mol %) in refluxing THF for 12 h for hydrolysis and decarboxylation. Evaporation of the collected fractions gave first 315 mg (38%) of (2*R*, 8*R*)-**5a**: [α]_D²⁰ 224.4° (*c* 2.2, CHCl₃), followed by 310 mg (37%) of (2*R*)-**4a**.

(2*S*, 8*S*)-Dimethyl 5-Oxo-2,8-di-[*N*-(PhF)amino]azelate ((2*S*, 8*S*)-5b**)**. A solution of Na(SiMe₃)₂ (7.9 mL, 7.9 mmol, 110 mol %, 1 M in THF) was added over 30 min to a -50 °C solution of (2*S*)-dimethyl *N*-(PhF)glutamate ((2*S*)-**2b**, 2.97 g, 7.15 mmol, 100 mol %)²³ in THF (7.15 mL). The reaction mixture was stirred for 2 h at -50 °C then partitioned between EtOAc (30 mL) and 1 M NaH₂PO₄ (30 mL). The aqueous phase was extracted with EtOAc (3 × 30 mL). The organic layers were combined, washed with brine, dried, and evaporated to a residue that was directly used in the next reaction.

Purification of the residue by chromatography on silica gel using a gradient of 10-30% EtOAc in hexanes as eluant gave first recovered **2b**

(35%, $R_f = 0.55$ in eluant A) followed by **(2S, 4RS, 8S)-dimethyl 4-carbomethoxy-5-oxo-2,8-[di-N-(PhF)amino]azelate ((2S, 4RS, 8S)-3b, 65%)**: $R_f = 0.28$ in eluant A; $^1\text{H NMR } \delta$ 1.2 (s, 36 H), 1.6-1.75 (m, 4 H), 1.9 (t, 2 H), 2.3-2.6 (m, 4 H), 2.7-2.95 (m, 2 H), 3.15 (s, 2 H), 3.6 (s, 3 H), 3.75 (s br, 3 H), 3.95 (m, 2 H), 7.2-7.7 (m, 52 H); $^{13}\text{C NMR } \delta$ 28.2, 28.4, 32.4, 32.7, 37.8, 38.1, 51.3, 51.4, 51.5, 51.5, 52.1, 52.5, 53.4, 54.2, 54.5, 54.5, 54.9, 55.9, 72.85, 72.91, 169.2, 170.0, 175.6, 175.9, 176.0, 176.0, 204.0, 203.9; HRMS calcd for $\text{C}_{51}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{O}_7$ (MH^+) 799.3411, found 799.3383. Last to elute was **(2S)-methyl N-(PhF)pyroglutamate ((2S)-4b)** which was recrystallized from $\text{CHCl}_3 / \text{Et}_2\text{O}$: $[\alpha]_D^{20} -105^\circ$ (c 1, CHCl_3); mp 201-202 °C; $^1\text{H NMR } \delta$ 1.85 (m, 1 H), 2.18 (m, 1 H), 2.37 (m, 1 H), 2.71 (m, 1 H), 3.31 (s, 3 H), 3.65 (dd, 1 H, $J = 1.1, 9.3$) 7.1-7.7 (m, 13 H); $^{13}\text{C NMR } \delta$ 23.9, 30.5, 51.5, 60.1, 72.8, 172.6, 176; HRMS calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{NO}_3$ (MH^+) 384.1560, found 384.1586.

The crude condensation product was dissolved in dioxane (32 mL), treated with 2 M NaOH (32 mL, 64.4 mmol, 900 mol %), and stirred at a reflux for 2 h when TLC (eluant A) showed complete disappearance of starting **2b**. The mixture was acidified with NaH_2PO_4 (1 M, 15 mL) and the aqueous phase was extracted with EtOAc (4×15 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried, and evaporated to a solid that was directly used in the next reaction.

Purification of the hydrolysis product from pure **(2S, 4RS, 8S)-3b** (2.68 g, 3.36 mmol) using a gradient of 0-10% MeOH in CHCl_3 as eluant gave 1.86 g (78%) of **(2S, 8S)-5-oxo-2,8-di-[N-(PhF)amino]azelate (6)**, that recrystallized from $\text{CHCl}_3 / \text{Et}_2\text{O}$: $R_f = 0.77$ in eluant D; mp 158 °C (dec.); $[\alpha]_D^{20} -32.8^\circ$ (c 1, CHCl_3); $^1\text{H NMR } \delta$ 1.62 (m, 1 H), 1.74 (m, 1 H), 2.32-2.45

(m, 2 H), 2.66 (t, 1 H, $J = 5.5$), 7.1-7.8 (m, 13 H), 8.1 (s br, 1 H); ^{13}C NMR δ 27.2, 38.7, 55.8, 73.0, 175.4, 213.2; HRMS calcd for $\text{C}_{47}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_5$ (MH^+) 713.2984, found 713.3016.

The crude hydrolysis product was dissolved in dimethyl sulfoxide (33 mL), treated with K_2CO_3 (988 mg, 7.15 mmol, 100 mol %) and iodomethane (0.89 mL, 14.3 mmol, 200 mol %), and stirred at rt for 3 h. Brine (50 mL) was added, and the reaction mixture was extracted with EtOAc (3 \times 50 mL). The combined organic layers were washed with 0.65 M sodium thiosulfate and brine, dried, and evaporated to a foam that was purified by chromatography using a gradient of 10-30% EtOAc in hexanes as eluant. First to elute was recovered (2*S*)-**2b** (1.14 g, 39%) followed by (2*S*, 8*S*)-**5b** (1.34 g, 51%): $R_f = 0.38$ in eluant E; mp 135-136 °C; $[\alpha]_D^{20} -259.5^\circ$ (c 1, CHCl_3); ^1H NMR δ 1.61-1.66 (m, 2 H), 2.29-2.49 (m, 2 H), 2.53 (t, 1 H, $J = 6.5$), 2.95 (s br, 1 H), 3.26 (s, 3 H), 7.1-7.7 (m, 13 H); ^{13}C NMR δ 28.7, 38.7, 55.5, 54.8, 72.8, 176.4, 208.9; HRMS calcd for $\text{C}_{49}\text{H}_{45}\text{N}_2\text{O}_5$ (MH^+) 741.3328, found 741.3352. Esterification of pure **6** and chromatography gave (2*S*, 8*S*)-**5b**, which recrystallized from hexane / Et₂O in 86% yield.

(3*S*, 6*S*, 9*S*)- and (3*S*, 6*R*, 9*S*)-Methyl 2-Oxo-3-*N*-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0] nonane-9-carboxylates ((3*S*, 6*S*, 9*S*)- and (3*S*, 6*R*, 9*S*)-**12**). A solution of azelate (2*S*, 8*S*)-**5a** (1.78 g, 2.16 mmol) in anhydrous EtOH (60 mL) and AcOH (6 mL) was treated with palladium-on-carbon (10 wt %, 219 mg) and stirred under 6 atm of hydrogen for 24 h. The mixture was filtered on celite, the catalyst was washed with EtOH (60 mL), and the combined organic phase was evaporated to give (2*S*, 5*RS*, 3'*S*)-*tert*-butyl 5-(3'-amino-3'-*tert*-butyloxycarbonylpropyl)prolinate bis-acetate ((2*S*, 5*RS*,

3'S)-8): $R_f = 0.46$, eluant F; $^1\text{H NMR } \delta$ 1.50 (m, 18 H), 1.60-1.90 (m, 4 H), 2.0 (s, 6 H), 2.0-2.2 (m, 3 H), 2.3 (m, 1 H), 3.45 (m, 1 H), 3.55-3.70 (m, 2H), 4.10 (m, 1 H), 4.45 (d, 1 H); $^{13}\text{C NMR } \delta$ 21.9, 26.5, 27.8, 28.9, 30.9, 31.0, 31.7, 49.0, 57.5, 59.2, 69.1, 81.5, 170.6, 176.0. Ester **8** was dissolved in a solution of 6 N HCl (24 mL) and CH_2Cl_2 (24 mL). After stirring 15 h, TLC (eluant F) showed complete disappearance of the starting ninhydrin positive material ($R_f = 0.46$) and formation of a new ninhydrin positive product ($R_f = 0.22$). Removal of the volatiles under vacuum gave (2*S*, 5*RS*, 3'*S*)-5-(3'-*N*-amino-3'-hydroxycarbonylpropyl)-*N*-prolinate (2*S*, 5*RS*, 3'*S*)-9: $R_f = 0.22$, eluant F; $^1\text{H NMR (CD}_3\text{OD)} \delta$ 1.60 (m, 2 H), 1.60-1.80 (m, 2 H), 1.9 (m, 1 H), 2.05-2.25 (m, 4 H), 2.4 (m, 1 H), 3.65 (m, 1 H), 3.80 (m, 1 H), 4.35 (d, 1 H). The residue was dissolved in a premixed 0 °C solution of acetyl chloride (9.9 mL) in MeOH (46 mL), and the solution was stirred at rt for 24 h when TLC (eluant F) showed conversion to a new ninhydrin positive product. The volatiles were removed under vacuum. The crude amino ester hydrochloride residue was dissolved in CH_2Cl_2 (36 mL), treated with Et_3N (2.97 mL, 6.48 mmol, 300 mol%), and stirred at rt for 4 h. Di-*tert*-butyldicarbonate (2.3 g, 10.8 mmol, 500 mol%) was added and the solution was stirred at rt for 2 h. The mixture was partitioned between CHCl_3 (20 mL) and 1 M NaH_2PO_4 (20 mL) and the aqueous phase was extracted with CHCl_3 (3 × 20 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried, and evaporated to an oil that was chromatographed using eluant G. Evaporation of the collected fractions gave first (2*S*, 5*RS*, 3'*S*)-methyl 5-(3'-*N*-(BOC)amino-3'-methyloxycarbonylpropyl)-*N*-(BOC)prolinate ((2*S*, 5*RS*, 3'*S*)-14, 180 mg, 18%): $R_f = 0.56$, eluant G; $^1\text{H NMR } \delta$ 1.34 (s, 36 H), 1.58-1.63 (m, 4 H), 1.73-1.86 (m, 8 H), 2.13 (m, 2 H), 3.63 (s, 12 H), 4.11-4.18 (m, 3

H), 4.24 (m, 1 H), 5.11 (d br, 1 H), 5.16 (d, br); ^{13}C NMR δ 27.78, 28.07, 28.13, 28.51, 28.95, 29.08, 29.52, 30.02, 30.22, 30.41, 51.75, 51.95, 53.12, 53.29, 57.52, 57.64, 59.19, 59.61, 79.29, 79.42, 79.70, 79.90, 153.54, 154.08, 155.30, 172.99, 173.09, 173.69, 173.55; HRMS calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_8$ (MH⁺) 445.2550, found 445.2536. Next to elute was **(3*S*, 6*S*, 9*S*)-methyl 2-oxo-3-*N*-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate** ((3*S*, 6*S*, 9*S*)-12, 452 mg, 67%) as a white solid that recrystallized from hexane:Et₂O: R_f = 0.23, eluant G; mp 111-112 °C; $[\alpha]^{20}_{\text{D}}$ -17.6° (*c* 1, CHCl₃); $[\alpha]^{20}_{\text{D}}$ -47.9° (*c* 6.12, MeOH); ^1H NMR δ 1.45 (s, 9 H), 1.7 (m, 3 H), 2.1 (m, 4 H), 2.45 (m, 1 H), 3.7 (m, 1 H), 3.75 (s, 3 H), 4.15 (m, 1 H), 4.5 (d, 1 H, J = 7.5 Hz), 5.5 (d, 1 H, J = 4.4 Hz); ^{13}C NMR δ 26.8, 27.2, 28.3, 28.9, 32.0, 49.9, 52.2, 56.4, 58.1, 79.4, 155.6, 169.1, 172.1; HRMS calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_5$ (MH⁺) 313.1764, found 313.1785; Anal. Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5$: C, 57.66; H, 7.75; N, 8.97. Found: C, 57.82; H, 7.76; N, 8.87. Last to elute was convex **(3*S*, 6*R*, 9*S*)-12** as an oil (14 mg, 2%): R_f = 0.08, eluant G; $[\alpha]^{20}_{\text{D}}$ -25.3° (*c* 1.1, MeOH); ^1H NMR δ 1.4 (s, 9 H), 1.69 (m, 1 H), 1.83 (m, 1 H), 1.92-2.05 (m, 2 H), 2.09-2.21 (m, 2 H), 2.44 (m, 1 H), 3.64 (m, 1 H), 3.72 (s, 3 H), 3.93 (m, 1 H), 4.43 (d, 1 H, J = 9.7), 5.36 (br s, 1 H); ^{13}C NMR δ 27.6, 28.16, 28.23, 28.50, 31.4, 52, 52.0, 57.9, 60.4, 79.3, 155.8, 168.2, 172.1; HRMS calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_5$ (MH⁺) 313.1764, found 313.1720.

(3*R*, 6*R*, 9*R*)- and (3*R*, 6*S*, 9*R*)-Methyl 2-Oxo-3-*N*-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylates ((3*R*, 6*R*, 9*R*)- and (3*R*, 6*S*, 9*R*)-12) were prepared from (2*R*, 8*R*)-5a (250 mg, 0.30 mmol) in the same manner which gave (3*R*, 6*R*, 9*R*)-12 {54.5 mg, 60%, $[\alpha]^{20}_{\text{D}}$ 17° (*c* 1.1, CHCl₃) and (3*R*, 6*S*, 9*R*)-8 {4.6 mg, 5%, $[\alpha]^{20}_{\text{D}}$ 16° (*c* 0.46, CHCl₃)}.

(3*S*, 6*S*, 9*S*)-Methyl 2-Oxo-3-*N*-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate ((3*S*, 6*S*, 9*S*)-12) from Dimethyl Azelate (2*S*, 8*S*)-5b. A solution of azelate (2*S*, 8*S*)-5b (675 mg, 0.91 mmol) in anhydrous EtOH (23 mL) and AcOH (2.3 mL) was treated with palladium-on-carbon (20 wt %, 184 mg) and stirred under 6 atm of hydrogen for 48 h. The mixture was filtered on celite, the catalyst was washed with EtOH (30 mL), and the combined organic phases were evaporated to a solid. Amino ester hydrochloride **10** was dissolved in CH₂Cl₂ (15 mL), treated with Et₃N (0.83 mL, 1.82 mmol, 200 mol %), and stirred at rt for 3 h. Di-*tert*-butyldicarbonate (993 mg, 4.55 mmol, 500 mol %) was added and the solution was stirred at rt for another 2 h. The mixture was partitioned between CHCl₃ (15 mL) and 1 M NaH₂PO₄ (15 mL) and the aqueous phase was extracted with CHCl₃ (3 × 15 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried, and evaporated to an oil that was chromatographed using eluant G. First to elute was (3*S*, 6*S*, 9*S*)-ethyl 2-oxo-3-*N*-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate: 10 mg (5%), *R*_f = 0.29 in eluant G; [α]_D²⁰ -13.8° (*c* 1.2, CHCl₃); ¹H NMR δ 1.28 (t, 3H, *J* = 7.1), 1.44 (s, 9 H), 1.60-1.79 (m, 4 H), 2.03-2.33 (m, 3 H), 2.1 (m, 4 H), 2.45 (m, 1 H), 3.73 (m, 1 H), 4.15 (d, 1 H), 4.17 (qd, 1 H, *J* = 7.1, 1.2), 4.49 (d, 1 H, *J* = 7.8), 5.52 (br s, 1 H); ¹³C NMR δ 14.1, 26.8, 27.2, 28.3, 29.1, 32.1, 50.0, 56.5, 58.3, 61.3, 79.4, 155.7, 169.1, 171.6; HRMS calcd for C₁₆H₂₇N₂O₅ (MH⁺) 327.1920, found 327.1936. Next to elute was (3*S*, 6*S*, 9*S*)-**12** (230 mg, 81%) followed by (3*S*, 6*R*, 9*S*)-**12** (6.4 mg, 2%).

(3*S*, 6*S*, 9*R*)-Methyl 2-Oxo-3-*N*-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate ((3*S*, 6*S*, 9*R*)-12) Via Epimerization of (3*S*, 6*S*, 9*S*)-12. A solution of Na(SiMe₃)₂ (0.26 mL, 0.26 mmol, 200 mol %, 1 M in THF) was added over 15 min to a -50 °C solution of (3*S*, 6*S*, 9*S*)-12 (40 mg, 0.13 mmol, 100 mol %) in THF (0.2 mL). The reaction mixture was stirred for 1 h at -50 °C followed by 1 h at -20 °C, then partitioned between EtOAc (5 mL) and 1 M NaH₂PO₄ (5 mL). The aqueous phase was extracted with EtOAc (3 × 5 mL). The organic layers were combined, washed with brine, dried, and evaporated to an oil (36.6 mg, 92% of a 1:10 ratio of (3*S*, 6*S*, 9*S*)-12:(3*S*, 6*S*, 9*R*)-12 as determined by ¹H NMR) that was chromatographed using eluant H. Evaporation of the collected fractions gave first (3*S*, 6*S*, 9*S*)-12 (2 mg, 5%; R_f = 0.4, eluant H) followed by **(3*S*, 6*S*, 9*R*)-methyl 2-oxo-3-*N*-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate ((3*S*, 6*S*, 9*R*)-12, 30 mg, 75% of >92% d.e. by ¹H NMR):** R_f = 0.37, eluant H; ¹H NMR δ 1.8 (s, 9 H), 1.4-1.6 (m, 4 H), 1.85 (m, 1 H), 2.12-2.26 (m, 2 H), 2.37 (m, 1 H), 3.67 (s, 3 H), 3.75 (m, 1 H), 4.1 (m, 1 H), 4.5 (t, 1 H, *J* = 7.5), 5.5 (s br, 1 H); ¹³C NMR δ 26.2, 28.0, 28.3, 28.4, 32.6, 50.1, 52.4, 56.4, 58.4, 79.7, 155.7, 169.0, 172.1; HRMS calcd for C₁₅H₂₅N₂O₅ (MH⁺) 313.1764, found 313.1754.

(3*S*, 6*S*, 9*S*)-2-Oxo-3-*N*-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic Acid ((3*S*, 6*S*, 9*S*)-1). (3*S*, 6*S*, 9*S*)-Methyl 3-*N*-(BOC)amino indolizidin-2-one-9-carboxylate ((3*S*, 6*S*, 9*S*)-12, 563 mg, 1.8 mmol) in dioxane (1.8 mL) was treated with 2 M LiOH (1.8 mL, 200 mol %) and stirred at rt for 2 h when TLC (eluant G) showed complete disappearance of starting 12. The mixture was partitioned between EtOAc (6 mL) and 1 M NaH₂PO₄ (6 mL). The aqueous phase was extracted with EtOAc (3 × 6 mL) and the organic

layers were combined, washed with brine, dried, and evaporated to an oil that was chromatographed with 20:1 EtOAc:AcOH as eluant. Evaporation of the collected fractions gave 511 mg (95%) of (3*S*, 6*S*, 9*S*)-**12**: $R_f = 0.46$, eluant E; $[\alpha]^{20}_D -44.7^\circ$ (c 0.8, CHCl₃); ¹H NMR δ 1.44 (s, 9 H), 1.65-1.75 (m, 3 H), 2.10-2.30 (m, 4 H), 2.42 (m, 1 H), 3.71 (dddd, 1 H, $J = 10, 10, 5, 5$), 4.22 (m, 1 H), 4.54 (d, 1 H, $J = 8.6$), 5.66 (d, 1 H, $J = 4.8$); ¹³C NMR δ 26.4, 26.8, 28.1, 28.4, 31.8, 49.6, 56.8, 58.5, 79.6, 155.7, 170.3, 174.2; HRMS calcd for C₁₄H₂₃N₂O₅ (MH⁺) 299.1607, found 299.1596. Followed by 27 mg (5%) of (3*S*, 6*S*, 9*R*)-**2-oxo-3-N-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic acid ((3*S*, 6*S*, 9*R*)-1)**: $R_f = 0.28$, eluant I; $[\alpha]^{20}_D -6.5^\circ$ (c 1.7, CHCl₃); ¹H NMR δ 1.42 (s, 9 H), 1.65-1.8 (m, 2 H), 1.89 (m, 2 H), 2 (m, 3 H), 2.25 (m, 1 H), 3.6 (br s, 1 H), 3.95 (br s, 1 H), 4.35 (br s, 1 H), 5.86 (br s, 1 H); ¹³C NMR δ 27.4, 28.9, 29.1, 30.2, 31.3, 51.5, 60, 60.6, 79.4, 156, 169.7, 176.5; HRMS calcd for C₁₄H₂₃N₂O₅ (MH⁺) 299.1607, found 299.1619.

Isomeric indolizidinone amino acids **1** were similarly obtained from hydrolysis of **12** with hydroxide ion (Table 4) and purified by chromatography with 20:1 EtOAc:AcOH as eluant.

(3*S*, 6*R*, 9*S*)-2-Oxo-3-N-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic Acid ((3*S*, 6*R*, 9*S*)-1): $[\alpha]^{20}_D -20.3^\circ$ (c 0.8, CHCl₃); ¹H NMR δ 1.41 (s, 9 H), 1.55-1.8 (m, 2 H), 1.85-2.05 (m, 2 H), 2.05-2.15 (m, 3 H), 2.28 (m br, 1 H), 3.63 (m br, 1 H), 3.90 (m, 1 H), 4.44 (t, 1 H, $J = 5.3$ Hz), 5.61 (s br, 1 H), 8.2 (s br, 1H); ¹³C NMR δ 27.7, 28.3, 29.7, 31.5, 31.5, 51.8, 59.5, 60.7, 79.5, 156.0, 169.8, 175.9; HRMS calcd for C₁₄H₂₃N₂O₅ (MH⁺) 299.1607, found 299.1594.

(3*S*, 6*R*, 9*R*)-2-Oxo-3-N-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic Acid ((3*S*, 6*R*, 9*R*)-1): ¹H NMR showed a 5.4:1 ratio of diastereomers. The resonances of the major isomer are as follows. ¹H NMR δ 1.39 (s, 9 H), 1.5-

1.7 (m, 3 H), 1.9-2.1 (m, 2 H), 2.1-2.35 (m, 2 H), 2.45 (m, 1 H), 3.6 (m, 1 H), 4.2 (m, 1 H), 4.5 (d, 1 H, $J = 8.7$ Hz), 5.4 (m, 1 H).

(3R, 6R, 9R)-2-Oxo-3-N-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic Acid ((3R, 6R, 9R)-1): $[\alpha]^{20}_{\text{D}} 45.6^{\circ}$ (c 0.8, CHCl_3).

(3R, 6R, 9S)-2-Oxo-3-N-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic Acid ((3R, 6R, 9S)-1): $[\alpha]^{20}_{\text{D}} 20.5^{\circ}$ (c 0.8, CHCl_3).

(3S, 6S, 9S)-Methyl 2-Oxo-3-amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate Hydrochloride ((3S, 6S, 9S)-11). Through a solution of (3S, 6S, 9S)-12 (0.32 mmol, 100 mg) in CH_2Cl_2 (2 mL) was bubbled a stream of HCl gas with stirring at rt for 15 min when TLC (eluant G) showed complete disappearance of starting 12. The white precipitate was filtered to give 80 mg (100%) of (3S, 6S, 9S)-11: $R_f = 0.35$, eluant F; mp 85-90 °C; $[\alpha]^{20}_{\text{D}} -54.9^{\circ}$ (c 1, CH_3OH); ^1H NMR (CD_3OD) δ 1.66-1.79 (m, 2 H), 1.93 (m, 1 H), 2.09 (m, 1 H), 2.17-2.34 (m, 3 H), 2.46 (m, 1 H), 3.73 (s, 3 H), 3.71 (dddd, 1 H, $J = 10.1, 10.1, 5, 5$), 4.04 (t, 1 H, $J = 8.6$), 4.49 (d, 1 H, $J = 8.7$); ^{13}C NMR δ 23.9, 26.6, 29.11, 31.8, 49.0, 52.6, 57.1, 58.6, 167.1, 172.0; HRMS calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_3$ (MH+) 213.1239, found 213.1246.

Recycle of (2S, 5RS, 3'S)-Methyl 5-(3'-N-(BOC)Amino-3'-methyloxycarbonylpropyl)-N-(BOC)prolinate ((2S, 5RS, 3'S)-14) into (3S, 6S, 9S)- and (3S, 6R, 9S)-12. Through a solution of 5-alkylprolinate 14 (2.82 mmol, 1.25 g) in CH_2Cl_2 (10 mL) was bubbled a stream of HCl gas with stirring at rt for 30 min when TLC (eluant C) showed complete disappearance of starting 14. The precipitated was filtered to give a white solid, (2S, 5RS, 3'S)-methyl 5-(3'-amino-3'-methyloxycarbonylpropyl)prolinate hydrochloride ((2S, 5RS, 3'S)-10): 892

mg, 100%, $R_f = 0.14$, eluant F; ^1H NMR (CD_3OD) δ 1.72-1.83 (m, 1 H), 1.90-2.10 (m, 4 H), 2.24-2.43 (m, 3 H), 3.70 (m, 1 H), 3.82 (s, 3 H), 3.86 (s, 3 H), 4.15 (dd, 1 H), 4.50 (dd, 1 H); ^{13}C NMR (CD_3OD) δ 28.1, 28.5, 28.6, 29.8, 53.6, 53.9, 54.1, 60.9, 61.9, 170.5, 170.6; HRMS calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_4$ (MH^+) 245.1577, found 245.1501. Amino ester hydrochloride **10** (303 mg, 0.95 mmol) was then dissolved in CH_2Cl_2 (5 mL) with Et_3N (396 μL , 2.85 mmol, 200 mol %), and stirred at rt for 4 h. Di-*tert*-butyldicarbonate (623 mg, 2.85 mmol, 300 mol %) was added and the solution was stirred at rt for another 2 h. The mixture was partitioned between CHCl_3 (10 mL) and 1 M NaH_2PO_4 (10 mL) and the aqueous phase was extracted with CHCl_3 (3×10 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried, and evaporated to an oil that was chromatographed with 1:1 hexanes:EtOAc as eluant. Evaporation of the collected fractions gave first recovered **14** (58 mg, 12%) followed by (3*S*, 6*S*, 9*S*)-**12** (175 mg, 59%) and (3*S*, 6*R*, 9*S*)-**12** (15 mg, 5%).

(2*S*, 8*S*)-Di-*tert*-butyl 5-Hydroxy-2,8-di-[*N*-(PhF)amino]azelate ((2*S*, 8*S*)-7a**).** Sodium borohydride (790 mg, 2.04 mmol, 50 mol%) was added over a period of 5 min to a stirred solution of (2*S*, 8*S*)-**5a** (3.36 g, 4.08 mmol) in EtOH (25 mL). After stirring for 30 min at rt, TLC (eluant A) showed complete disappearance of starting **5a**. The reaction mixture was concentrated on a rotary evaporator, then partitioned between EtOAc (15 mL) and water (25 mL). The aqueous phase was extracted with EtOAc (3×25 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried, and evaporated to a foam that was purified by chromatography using a gradient of 10-30 % EtOAc in hexanes as eluant. Evaporation of the collected fractions gave 3.01 g (89%) of **7a** as a white solid: $R_f = 0.28$ in

eluant A; mp 84-86 °C; ^1H NMR δ 1.18 (s, 9 H), 1.20 (s, 9 H), 1.31-1.55 (m, 8 H), 2.47-2.55 (m, 2 H), 3.35-3.40 (m, 1 H), 7.1-7.7 (m, 26 H); ^{13}C NMR δ 27.9, 31.5, 31.6, 33.1, 33.2, 55.9, 56.0, 71.1, 73.1, 80.6, 80.7, 175.0, 175.1; HRMS calcd for $\text{C}_{55}\text{H}_{60}\text{N}_2\text{O}_5$ (MH^+) 828.4502, found 828.4538.

(2S, 5S, 3'S)-tert-Butyl 5-(3'-N-(PhF)amino-3'-tert-butyloxycarbonylpropyl)-N-(PhF)prolinate ((2S, 5S, 3'S)-15) A stirred 0 °C solution of (2S, 8S)-7a (83 mg, 0.10 mmol) in CH_2Cl_2 (1 mL) was treated with methanesulfonyl chloride (16 μL , 0.2 mmol, 200 mol%), DMAP (1.2 mg, 0.01 mmol, 10 mol %) and Et_3N (24 μL , 0.30 mmol, 300 mol %), stirred for 1 h, brought to rt, stirred for 1 h, and heated at a reflux for 24 h. EtOAc (3 mL) and H_2O (1 mL) were added to the reaction mixture, and the organic layer was sequentially washed with 2 N HCl (1 mL), 5% NaHCO_3 (1 mL), H_2O (1 mL) and brine, dried, evaporated, and purified by chromatography with 1:5 EtOAc :hexanes as eluant. Evaporation of the collected fractions gave 80.2 mg (99%) of **15** as a white solid: $R_f = 0.75$ in eluant A; mp 110-111 °C; $[\alpha]_D^{20} -133^\circ$ (c 1, CHCl_3); ^1H NMR δ 1.14 (s, 9 H), 1.39 (s, 9 H), 1.35-1.45 (m, 3 H), 1.52-1.75 (m, 3 H), 1.92 (m, 1 H), 2.35 (m, 1 H), 2.73 (m, 1 H), 3.61 (dd, 1 H, $J = 9, 5.8$), 7.1-7.7 (m, 26 H); ^{13}C NMR δ 28.8, 30.0, 30.6, 32.8, 32.9, 56.0, 61.9, 64.7, 73.0, 78.3, 79.5, 79.9, 175.4, 175.5; HRMS calcd for $\text{C}_{55}\text{H}_{57}\text{N}_2\text{O}_4$ (MH^+) 809.4318, found 809.4324.

(3S, 6S, 9S)-Methyl 2-Oxo-3-N-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate ((3S, 6S, 9S)-12) from (2S, 5S, 3'S)-15. A solution of (2S, 5S, 3'S)-15 (71 mg, 0.09 mmol) in EtOH (3 mL) and AcOH (0.3 mL) was treated with palladium-on-carbon (10 wt%, 10 mg) and stirred under 6 atm of hydrogen

for 24 h. The mixture was filtered on celite, the catalyst was washed with EtOH (3 mL), and the combined organic phase was evaporated to a solid. The solid was dissolved in a solution of 6 N HCl (1 mL) and CH₂Cl₂ (1 mL). After stirring 15 h, TLC (eluant F) showed complete disappearance of the starting ninhydrin positive material ($R_f = 0.46$) and formation of a new ninhydrin positive product ($R_f = 0.22$). The volatiles were removed under vacuum, the residue was dissolved in a 0 °C solution of acetyl chloride (0.16 mL) in MeOH (1.92 mL), and the solution was stirred at rt for 24 h when TLC (eluant F) showed complete conversion to a new ninhydrin positive product ($R_f = 0.38$). The volatiles were removed under vacuum. The crude amino ester hydrochloride residue was dissolved in CH₂Cl₂ (1.5 mL) and treated with Et₃N (0.12 mL, 0.27 mmol, 300 mol%) and di-*tert*-butyldicarbonate (96 mg, 0.45 mmol, 500 mol%) and stirred at rt for 2 h. The mixture was partitioned between CHCl₃ (2 mL) and 1 M NaH₂PO₄ (2 mL) and the aqueous phase was extracted with CHCl₃ (3 × 2 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried, and evaporated to an oil that was chromatographed with 1:1 hexanes:EtOAc as eluant. Evaporation of the collected fractions gave first (2*S*, 5*S*, 3'*S*)-**14** (6 mg, 15%) followed by (3*S*, 6*S*, 9*S*)-**12** (18 mg, 66%).

Enantiomeric Purity of (3*S*, 6*S*, 9*S*)-Methyl 2-Oxo-3-*N*-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate ((3*S*, 6*S*, 9*S*)-12**).** A solution of (3*S*, 6*S*, 9*S*)-**12** (0.06 mmol, 18 mg) in CH₂Cl₂ (1 mL) was treated with TFA (0.5 mL) and stirred for 4 h when TLC (eluant F) showed complete disappearance of starting **12**. The volatiles were removed under vacuum and the residue was dissolved in 1 mL of THF. The solution was treated

with either (*R*)- or (*S*)- α -methylbenzyl isocyanate (16 μ L, 0.12 mmol, 200 mol %) and Et₃N (8 μ L, 0.06 mmol, 100 mol %), and heated at a reflux for 3 h. The mixture was cooled. The volatiles were removed under vacuum and the residue was directly examined by NMR. The limits of detection were determined by observation of the diastereomeric methyl ester singlets in the 400 MHz ¹H NMR in benzene-d₆ during incremental additions of diastereomeric urea which demonstrated (1'*S*)- and (1'*R*)-**16** to be of >99% diastereomeric purity.

Urea (1'*R*)-16**:** ¹H NMR (C₆D₆) δ 1.21 (m, 3 H), 1.33 (d, 3 H, *J* = 6.9), 1.47 (m, 3 H), 1.6 (m, 1 H), 2.38 (m, 1 H), 2.83 (m, 1 H), 3.33 (s, 3 H), 4.21 (d, 1 H, *J* = 8.2), 4.34 (m, 1 H), 5.13 (m, 1 H), 5.5 (br s, 1 H), 6.05 (br s, 1 H), 7.15 (m, 5 H).

Urea (1'*S*)-16**:** ¹H NMR (C₆D₆) δ 1.23 (m, 2 H), 1.33 (m, 2 H), 1.39 (d, 3 H, *J* = 6.8), 1.47 (m, 1 H), 1.63 (m, 1 H), 2.3 (m, 1 H), 2.81 (m, 1 H), 3.3 (s, 3 H), 4.24 (d, 1 H, *J* = 8), 4.45 (m, 1 H), 5.16 (m, 1 H), 5.55 (br s, 1 H), 6.06 (br s, 1 H), 7.15 (m, 5 H).

Acknowledgment: This research was supported in part by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, and the Ministère de l'Éducation du Québec. W. D. L. thanks Bio-Méga/Boehringer Ingelheim Recherche Inc. for a Young Investigator Award. We thank Sylvie Bilodeau and Dr. M. T. Phan Viet of the Regional High-Field NMR Laboratory for their assistance in establishing the configurations of lactam **12**. Mr. Eryk Thouin is thanked for helpful suggestions and work to optimize reaction conditions. The crystal structure analysis of compound **12** was performed by Francine Bélanger-Gariépy at l'Université de

Montréal X-ray facility. We are grateful for a loan of Pd/C from Johnson Matthey PLC.

Supporting Information Available: Experimental details for **2b** and γ -methyl *N*-(PhF)glutamate; ^1H and ^{13}C NMR spectra of **1** and **3-15** and ^1H NMR spectra of **16**; crystallographic data for **12** (57 pages). This material is contained in libraries on microfiche, immediately follows this article in the microfilm version of the journal, and can be ordered from the ACS; see any current masthead page for ordering information.

4.2.6 References.

- 1 We have adopted the nomenclature and ring system numbering previously used in references 3a and 5a in order to maintain clarity and consistency when comparing these different heterocyclic systems.
- 2 Synthesis and use of 2-oxo-3-phthalimido-7-thia-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic acid is described in: (a) Nagai, U.; Sato, K. *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 647; (b) Nagai, U.; Sato, K.; Nakamura, R.; Kato, R. *Tetrahedron* **1993**, 49, 3577.
- 3 The use of 2-oxo-3-amino-7-thia-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic acid in peptide analogues include: gramicidin S analogues (a) Sato, K.; Nagai, U. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1986**, 1231; (b) Bach, II, A. C.; Markwalder, J. A.; Ripka, W. C. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, 38, 314; growth hormone-releasing factor analogs: (c) Sato, K.; Hotta, M.; Dong, M.-H.; Hu, H.-Y.; Taulene, J. P.; Goodman, M.; Nagai, U.; Ling, N. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, 38, 340; cyclosporin A analogue: (d) Belshaw,

- P.J.; Meyer, S.D.; Johnson, D.D.; Romo, D.; Ikeda, Y.; Andrus, M.; Alberg, D.G; Schultz, L.W.; Clardy, J.; Schreiber, S.L. *Synlett*, **1994**, 381; tendamistat mimetic: (e) Etzkorn, F.A.; Guo, T.; Lipton, M.A.; Goldberg, S.D.; Bartlett, P.A. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10412; additional examples, such as enkephalin, LRF, GRF, dermorphin and somatostatin, are reviewed in ref. 2b.
- 4 (a) Synthesis of 2-oxo-3-amino-7-thia-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-8,8-dimethyl-9-carboxylic acid is described in: Nagai, U.; Kato, R.; Sato, K.; Ling, N.; Matsuzaki, T.; Tomotake, Y. In *Peptides: Chemistry and Biology, Proceedings of the Tenth Am. Peptide Symp.* G. R. Marshall Ed. ESCOM, Leiden, 1988, pp. 129-130. (b) Synthesis of 2-oxo-3-amino-7-thia-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-8-phenyl-9-carboxylic acid is described in: Nagai, U.; Kato, R. *Peptides: Chemistry and Struct. Biol., Proceedings of the eleventh Am. Pept. Symp.* J. E. Rivier; G. R. Marshall Eds. ESCOM, Leiden, 1989, pp. 653-654.
- 5 Syntheses of 2-oxo-5-oxa-3-amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic acids are reported in: (a) Baldwin, J. E.; Hulme, C.; Schofield, C. J.; Edwards, A. J. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 935; (b) Slomczynska, U.; Chalmers, D. K.; Cornille, F.; Smythe, M. L.; Beusen, D. D.; Moeller, K. D.; Marshall, G. R. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1198.
- 6 Synthesis and analysis of Leu-Enkephalin analogues containing 2-oxo-5-oxa-3-amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic acid is reported in: Claridge, T.D.W. ; Hulme; C.; Kelly; R.J.; Lee, V.; Nash, I.A.; Schofield, C.J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 485.
- 7 The synthesis of a 2-oxo-3-amino-4-benzyl-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic acid analogue that serves as a model antagonist of the

- tachykinin NK-2 receptor is reported in: Hanessian, S.; Ronan, B.; Laoui, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 1397.
- 8 The synthesis of 2(*S*)-amino-3-oxo-11(*R*)-hexahydroindolizino[8,7-*b*]indole-5(*S*)-carboxylate is reported in: (a) de la Figuera, N.; Rozas, I.; García-López, M. T.; González-Muñiz, R. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 613; (b) de la Figuera, N.; Alkorta, I.; Rozas, I.; García-López, M. T.; Herranz, R.; González-Muñiz, R. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 7841.
- 9 An alternative strategy to prepare 2-oxo-3-amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic acid is reported in: Mueller, R.; Revesz, L. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 4091.
- 10 The synthesis of a 2-oxo-3-amino-3-benzyl-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic acid analogue is reported in: Colombo, L.; Di Giacomo, M.; Scolastico, C.; Manzoni, L.; Belvisi, L.; Molteni, V. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 625.
- 11 Preliminary results were reported in part: (a) Lombart, H.-G.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 6147. (b) Lombart, H.-G.; Lubell, W. D. In *Peptides 1994 (Proceedings of the 23rd European Peptide Symposium)*, H. L. S. Maia, Editor; ESCOM, Leiden, The Netherlands, 1995, 696.
- 12 Lombart, H.-G.; Lubell, W. D. In *Peptides: Chemistry, Structure and Biology*, P.T.P Kaumaya and R.S. Hodges, Editors; ESCOM Sci. Pub. B.V.: Leiden, The Netherlands, 1996, 695.
- 13 Synthesis of 5-amino-9-oxo-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-8-carboxylic acid analogues are described in: Dominguez, M. J.; García-López, M. T.; Herranz, R.; Martin-Martinez, M.; González-Muñiz, R. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1995**, 2839 and refs therein.

- 14 Synthesis and use of 2-oxo-3-amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-6-carboxylic acid analogues as type VI β -turn peptide mimetics are described in: (a) Dumas, J.-P.; Germanas, J. P. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 1493; (b) Gramberg, D.; Robinson, J. A. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 861; (c) Kim, K.; Dumas, J.-P.; Germanas, J. P. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 3138; (d) Gramberg, D.; Weber, C.; Beeli, R.; Inglis, J.; Bruns, C.; Robinson, J. A. *Helv. Chim. Acta* **1995**, 78, 1588.
- 15 1,4-Diazabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic acid analogues are described in: Fobian, Y.M.; d'Avignon, D.A.; Moeller, K.D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, 315.
- 16 [4.3.0]Pyrazolidinones-2-carboxylic acid analogues have been synthesized as potential antibacterial agents: Ternansky, R.J.; Draheim, S. E. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 6569.
- 17 Recent representative examples of other azabicyclo[X.Y.0]alkane amino acid derivatives include. (a) Flynn, G. A.; Giroux, E. L.; Dage, R. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 7914. (b) Flynn, G. A.; Beight, D. W.; Mehdi, S.; Koehl, J. R.; Giroux, E. L.; French, J. F.; Hake, P. W.; Dage, R. C. *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 2420. (c) Attwood, M. R.; Hassall, C. H.; Kröhn, A.; Lawton, G.; Redshaw, S. J. *Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1986**, 1011. (d) Thomas, W. A.; Whitcombe, I. W. A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* **1986**, 747. (e) Robl, J. A. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 393. (f) Thorsett, E. D. *Actual. Chim. Thér.* **1986**, 13, 257. (g) Cornille, F.; Slomczynska, U.; Smythe, M. L.; Beusen, D. D.; Moeller, K. D.; Marshall, G. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 909.
- 18 (a) Lubell, W. D.; Rapoport, H. J. *Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 7447. (b) Lubell, W. D.; Jamison, T. F.; Rapoport, H. J. *Org. Chem.* **1990**, 55, 3511.

- (c) Sharma, R.; Lubell, W.D. *J. Org. Chem.* **1996**, *60*, 202. (b) Gill, P.; Lubell, W.D. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2658.
- 19 (a) Humphrey, J. M.; Bridges, R. J.; Hart, J. A.; Chamberlin, A. R. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2467. (b) Gmeiner, P.; Feldman, P.L.; Chu-Moyer, M.Y.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.*, **1990**, *55*, 3068. (c) Wolf, J.-P.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.*, **1989**, *54*, 3164. (d) Koskinen, A.M.P.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 1859. (e) Christie, B. D.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 1239.
- 20 (a) Ibrahim, H. H.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 6438. (b) Atfani, M.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 3184. (c) Zee-Cheng, R. K.-Y.; Olson, R. E.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *94*, 1128.
- 21 (a) Baldwin, J. E.; North, M.; Flinn, A.; Moloney, M. G. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 1453. (b) Baldwin, J. E.; North, M.; Flinn, A.; Moloney, M. G. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 1465.
- 22 Bergmeier, S. C.; Cobás, A. A.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 2369.
- 23 Dimethyl *N*-(PhF)glutamate was prepared according to the procedure described for dimethyl *N*-(PhF)aspartate: (a) Jamison, T. F.; Rapoport, H. *Org. Syn.* **1992**, *71*, 226; (b) Paz, M. M.; Sardina, J. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 6990. γ -Methyl *N*-(PhF)glutamate was prepared by esterification according to: (c) Hanby, W.E.; Waley, S. G.; Watson, J. *J. Chem. Soc.* **1950**, 3239; and phenylfluorenation according to refs 19d and 23a.
- 24 Three different *tert*-butyl esterification methods were examined in order to synthesize α -*tert*-butyl γ -methyl *N*-(PhF)glutamate (**2a**). γ -Methyl *N*-(PhF)glutamate was initially prepared by reaction of *O*-*tert*-butyl *N,N'*-diisopropylisourea and γ -methyl *N*-(PhF)glutamate in 75% yield as described in ref. 19d. Comparable yields were obtained and **2a**

was conveniently purified when the acid was treated with 400 mol% of *N,N*-dimethylformamide di-*tert*-butyl acetal in benzene according to the general procedure described in: (a) Widmer, U. *Synthesis* **1983**, 135. In our hands, the most efficient and least expensive method to prepare **2a** employed *O-tert*-butyl trichloroacetimidate as described in the experimental section. This procedure was modified from the methods described in: (b) Armstrong, A.; Brackenridge, I.; Jackson, R. F. W.; Kirk, J. M. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 2483; (c) Yue, C.; Thierry, J.; Potier, P. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 323; (d) Wessel, H. P.; Iversen, T.; Bundle, D.R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1985**, 2247.

- 25 Laganis, E. D.; Chenard, B. L. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 5831.
- 26 (a) Krapcho, A.P. *Synthesis* **1982**, 805; (b) Krapcho, A.P. *Synthesis* **1982**, 893.
- 27 Epimerization of **12** during basic hydrolysis is similar to racemization of *N*-methyl amino esters under similar conditions, see for examples: Boger, D. L.; Chen, J.-H.; Saionz, K. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 1629 and ref 24 therein.
- 28 The structure of **12** was solved at l'Université de Montréal X-ray facility using direct methods (SHELXS 86): C₁₅H₂₄N₂O₅; M_r = 312.36; orthorhombic, colorless crystal; space group P2₁2₁2₁; unit cell dimensions (Å) a = 6.793(2), b = 14.847(3), c = 16.712(4); volume of unit cell (Å³) 1685.5(7); Z = 4; R₁ = 0.0353 for I>2σ(I), wR₂ = 0.0828 for all data; GOF = 0.869. The author has deposited the atomic coordinates for the structure of **12** with the Cambridge Crystallographic Data Center. The coordinates can be obtained, on request, from the Cambridge Crystallographic Data Center, 12 Union Road, Cambridge, CB2 1EZ, UK.

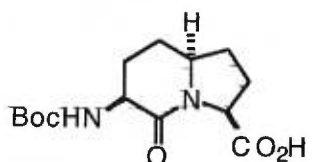
- 29 Ball, J. B.; Alewood, P. F. *J. Mol. Recogn.* **1990**, *3*, 55.
- 30 Madison, V.; Kopple, K. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 4855.
- 31 We have recently reported a method to prepare L- and D- α -amino dicarboxylates of six to eight carbon chain-lengths with high enantiomeric purities: Pham, T.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 3676.

CHAPITRE 5

*Synthèse et analyse conformationnelle de peptides modèles
incorporant l'acide aminé indolizidinone.*

5.1 Introduction.

La conception rationnelle de peptides conformationnellement rigides et leurs utilisations dans des synthèses de molécules bioactives a été le sujet de nombreuses études depuis les dix dernières années. Le remplacement des liaisons amides protéiques par des mimétiques ayant des conformations restreintes convenablement choisies a le potentiel de fournir des informations concernant les conformations biologiques actives.¹ De telles informations sont intéressantes pour la détermination des caractéristiques structurales essentielles (surtout au niveau des structures secondaires) pour les interactions entre les peptides et leurs récepteurs. L'élaboration de synthèses énantiosélectives efficaces a donné accès à ce type d'outils que sont les peptidomimétiques azabicycloalcanes tel que le bicyclic indolizidinone Boc-AAI-OH-1.²



1
(3S, 6S, 9S)-Boc-AAI-OH

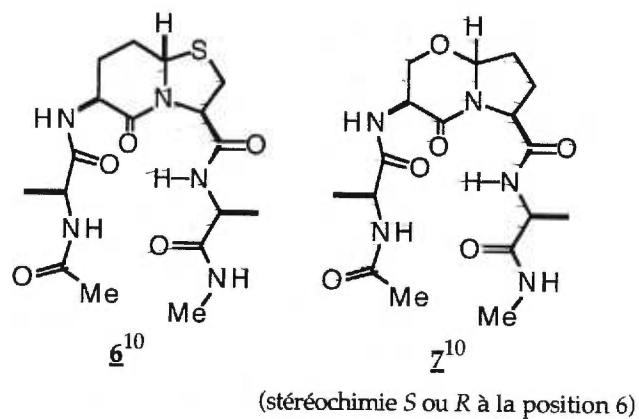
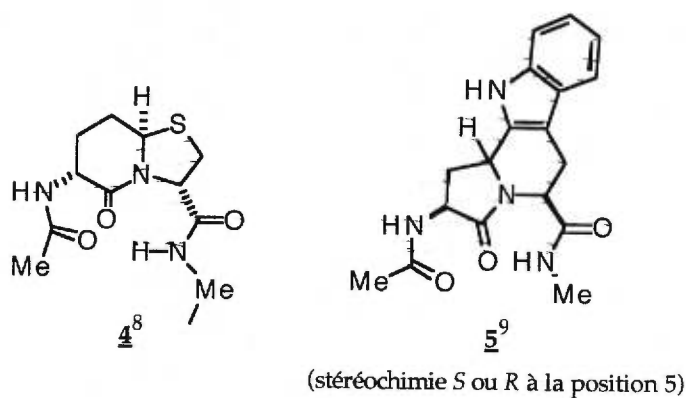
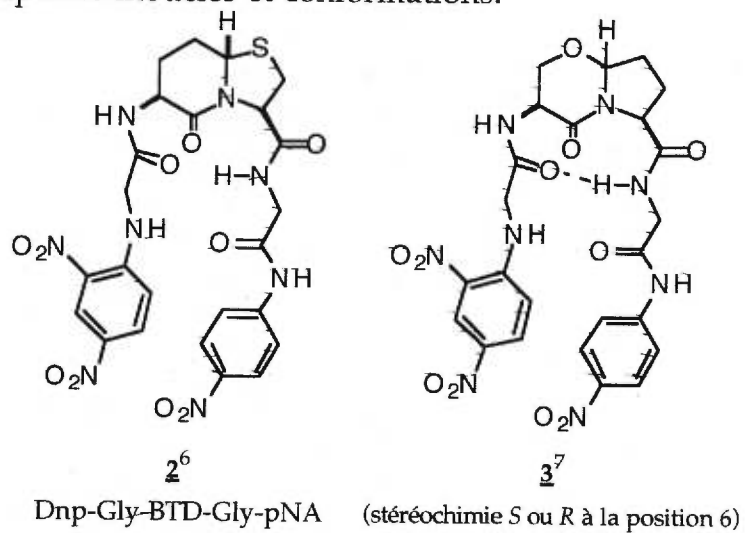
Les analyses conformationnelles de l'ester méthylique de **1** et de son stéréoisomère (*6R*) ont prédit que les deux diastéréoisomères peuvent présenter des angles de torsion ϕ et ψ similaires à ceux idéaux des résidus $i+1$ et $i+2$ de conformations de repliement β de type II'.^{3,4} La question est donc de savoir si l'acide aminé indolizidinone **1** peut jouer le rôle d'un peptidomimétique conformationnellement rigide qui induit une telle conformation ?

L'incorporation du (*3S, 6S, 9S*)-Boc-AAI-OH-**1** et des diastéréoisomères (*6R*) et (*9R*) dans des peptides modèles permettra l'exploration de ses capacités à induire des conformations de repliement β de type II' et d'épingles à cheveux β^5 et ainsi de vérifier cette hypothèse.

Ce chapitre présente les études relatives aux peptides modèles, afin de prouver que l'incorporation de l'AAI dans des peptides conduit bien à l'induction d'un repliement β de type II'. Il se compose d'un article préliminaire (la préparation des peptides modèles à étudier, section 5.3) suivi de la présentation et des discussions complètes des résultats obtenus. Les peptides modèles les plus simples, contenant les fonctions amides acétyle et méthyle, ont d'abord été étudiés. Un peptide modèle comportant des chromophores nitrophényles a été synthétisé pour les études de dichroïsme circulaire. Enfin, l'introduction d'un résidu acide aminé valine a conduit à un peptide modèle plus complexe. La suite des études dans le domaine des conformations sera présentée dans le chapitre suivant avec l'incorporation de l'AAI dans un peptide biologiquement actif, la gramicidine S.

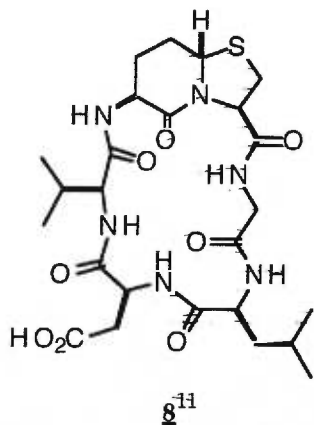
5.2 Analyses conformationnelles des systèmes indolizidinones: précédents

Aucune étude conformationnelle complète portant sur des peptides modèles incorporants des peptidomimétiques indolizidinones, qui inclue des études de modélisation moléculaire, de RMN, d'infrarouge (IR) et de dichroïsme circulaire (DC), n'est rapportée dans la littérature. La première analyse conformationnelle de ce type de composés, en utilisant le dichroïsme circulaire, a été effectuée par Nagai et Sato avec l'incorporation de leur BTD dans un analogue amide **26** ayant des chromophores choisis, un dinitrophényle (Dnp) et un *para*-nitroaniline (pNA) (figure 1). Par comparaison avec un dérivé connu, le spectre de dichroïsme circulaire a révélé la présence d'un repliement β de type II' (une discussion plus approfondie est présentée à la section 5.5). Les synthèses des dérivés oxaindolizidinones **3** ayant les mêmes chromophores sont rapportées,⁷ mais aucune analyse conformationnelle n'est à ce jour présentée. Des études par modélisation moléculaire sur des dérivés amides *N*-acétyl *N'*-méthyle sont rapportées pour plusieurs analogues indolizidinones. Ces études de modélisation moléculaire indiquent une restriction des angles ψ_2 et ϕ_3 à des valeurs de l'ordre des valeurs théoriques des repliements β . Dans le cas de **5**, seul le dérivé concave (stéréochimie *R* à la position 5) présente une conformation similaire à celle d'un repliement β .

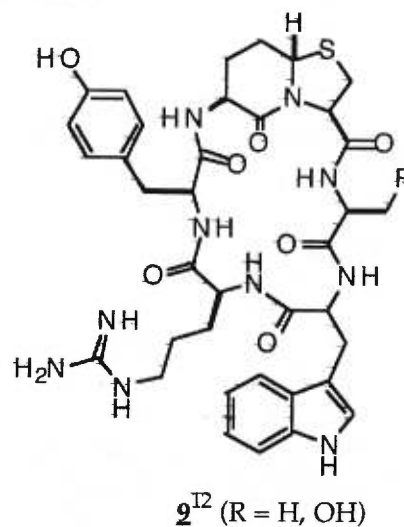
Figure 1. Peptides modèles et conformations.

Des acides aminés indolizidinones de stéréochimies diverses ont été utilisés dans des mimétiques de différents peptides biologiquement actifs et ont montré, grâce aux analyses conformationnelles (modélisation moléculaire, études RMN ou dichroïsme circulaire), qu'ils adoptaient à la fois des conformations de repliements β de type II' et de repliements γ . L'exemple le plus étudié concerne les analogues de la gramicidine S (voir chapitre 6 pour ces exemples). La figure 2 présente les exemples rapportés. Le BTB présente un comportement opposé dans les deux peptides cycliques. Alors que dans le peptide **8** le BTB est capable de stabiliser une conformation de repliement β de type II', il en est incapable dans le peptide **9**. Les résultats obtenus avec les peptides **10** et **11** montrent que les deux peptidomimétiques peuvent induire des conformations désirées.

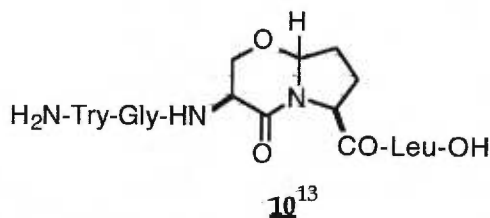
Figure 2. Peptides bio-actifs et conformations.



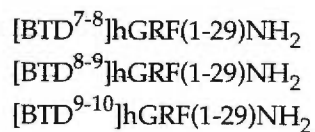
Études conformationnelles par
modélisation moléculaire, RMN et DC.



Études conformationnelles par
modélisation moléculaire et RMN.



(stéréochimie *S* ou *R* à la position 6)
Études conformationnelles par RMN.



Études conformationnelles par DC.

5.3 Article.

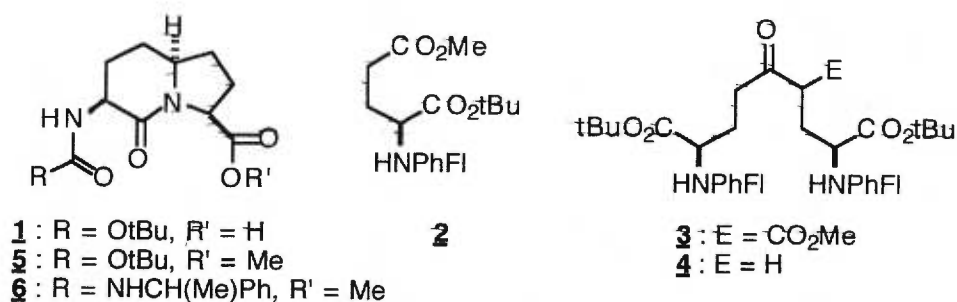
A Claisen Condensation Approach To Prepare Azabicycloalkane Amino Acid β -Turn Mimetics

H.-G. Lombart and W. D. Lubell

In Peptides 1994 (Proceedings of the 23rd European Peptide Symposium),
H. L. S. Maia, Editor; ESCOM, Leiden, The Netherlands, 1995, p.696.

Introduction

We are synthesizing enantiopure azabicycloalkane amino acids for use as conformationally fixed surrogates of β -turn secondary structures in order to explore the importance of peptide turn conformations in protein folding and recognition [1]. Since the β -turn changes the peptide's direction 180° , positioning the α -carbons of its first and fourth amino acids at an interatomic distance of $<7\text{\AA}$, it can permit hydrogen bonding between amides on opposite ends of the peptide chain and thereby nucleate β -hairpins and β -pleated sheets [2]. β -Turns also expose amino acid side-chains to the external environment, creating compact protuberances capable of interacting with macromolecules. Conformationally rigid β -turn peptidomimetics can thus assist peptide folding by stabilizing hydrogen bonding in β -hairpins and β -pleated sheet structures. In addition, they can serve as surrogates of the essential amino acid residues needed for receptor affinity in a bridged protein analogues.

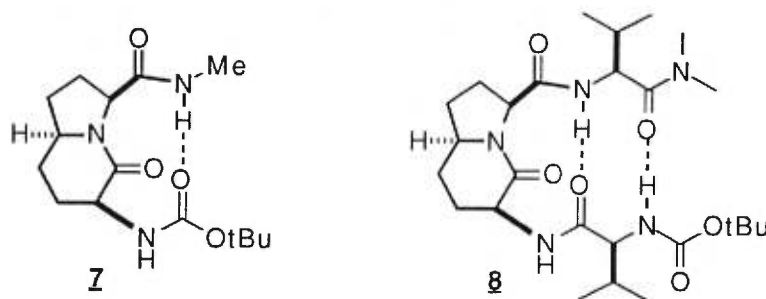


The successful use of 2-oxo-3-phthalimido-7-thia-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic acid as a peptidomimetic of type II' β -turns [3], inspired us to synthesize indolizidinone amino acid **1** in which the thiaindolizidinone sulfur has been replaced by a methylene group. This should increase conformational rigidity by creating additional gauche interactions. Since **1** does not possess a masked aldehyde, peptidomimetics prepared from it should also exhibit greater metabolic stability.

Results and Discussion

Enantiopure (3*S*, 6*S*, 9*S*)-2-oxo-3-*N*-(Boc)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic acid (**1**) was synthesized in 39% overall yield from α -*tert*-butyl γ -methyl *N*-(9-(9-phenylfluorenyl))glutamate (**2**) via our Claisen condensation / reductive amination / lactam cyclization method [1]. Addition of LiN(SiMe₃)₂ to **2** in THF gave rise to Claisen condensation affording diastereomeric β -keto esters **3** (52%) and recovered **2** (45%). Hydrolysis and decarboxylation of **3** with LiOH furnished symmetric δ -oxo α,ω -diaminoazelate **4** (70%). *N*-(Boc)amino indolizidinone methyl ester **5** was then prepared from azelate

4 in four steps and a single purification in 70% overall yield. Hydrogenation of **4** with Pd/C in EtOH : AcOH proceeds by cleavage of the PhFl group, imine formation, protonation, and hydrogen addition predominantly to the less hindered face of the iminium ion to provide a δ -substituted proline as an 8:1 mixture of *cis:trans* diastereomers. Ester hydrolysis with TFA, esterification with MeOH·HCl, and amine protection with (Boc)₂O proceeded with lactam cyclization furnishing diastereomeric *N*-(Boc)amino indolizidinone methyl esters **5** that could be separated readily by column chromatography. The bridge-head *S*-configuration of major product (6*S*)-**5** was assigned based on analogy with previous work [4] and on NMR experiments in which irradiation of the bridge-head proton produced an NOE on the proton at C-3. Ester (6*S*)-**5** was determined to be of >99% enantiomeric purity after conversion to (*R*)- and (*S*)- *N*- α -methylbenzylureas **6** and observation of the diastereomeric methyl ester singlets by ¹H NMR spectroscopy during incremental additions of the opposite isomer. Ester hydrolysis with LiOH provided **1** in 97% yield after extraction [1].



We have now made peptidomimetics **7** and **8** in order to study the conformational effects of **1** when introduced into peptides. Treatment of methyl ester **5** with MeNH₂·HCl and Al(Me)₃ provided **7**. Tripeptide **8**

was synthesized in good yield by coupling acid **1** to Val-NMe₂ with TBTU, Boc deprotection with TFA, and subsequent coupling with Boc-Val and TBTU. In the ¹H NMR spectra of **7** and **8** in CDCl₃, the amide protons derived from MeNH₂ and valine appear at about two ppm downfield from the amide proton in **1** itself. Future study will examine if this deshielding results from intramolecular hydrogen bonding in β-turn and β-hairpin conformations.

We have accomplished an efficacious synthesis of amino acid **1** and its incorporation into peptides. Because a variety of side-chain groups may be added to **1** via alkylations of *N*-(PhFl)amino ketones **3** and **4**, and because this process is compatible with other functionality, our method for preparing azabicycloalkane amino acids exhibits considerable potential for peptidomimetic synthesis.

Acknowledgments

This research was supported in part by the NSERC of Canada and FCAR of Québec. We thank the Ichikizaki Fund for an award supporting travel expenses.

References

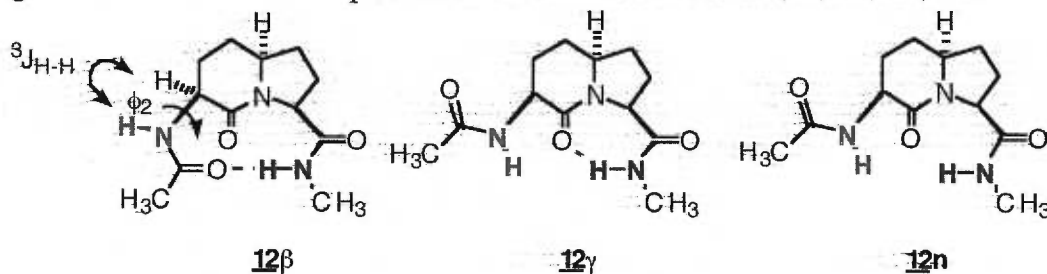
1. Lombart, H.-G. and Lubell, W. D., *J. Org. Chem.*, 59 (1994) in press.
2. Wilmot, C. M. and Thornton, J. M., *J. Mol. Biol.*, 203 (1988) 221.
3. Nagai, U., Sato, K., Nakamura, R. and Kato, R., *Tetrahedron*, 49 (1993) 3577.
4. Ibrahim, H. H. and Lubell, W. D., *J. Org. Chem.*, 58 (1993) 6438.

5.4 Les amides modèles Ac-AAI-NHMe.

Le choix s'est initialement porté sur le peptide modèle le plus simple, c'est-à-dire comportant des amides méthylées, pour étudier l'effet d'incorporation du composé **1** sur la conformation induite. En plus des études de modélisation moléculaire qui généralement présentées seules, les études sur les systèmes réels ont été accomplies.

Un certain nombre d'outils et de techniques sont à notre disposition pour interpréter la conformation d'un peptide.¹⁵⁻¹⁸ Dans le cas de l'amide modèle **12**, il peut adopter trois conformations principales: une conformation de repliement β , **12 β** , une conformation de repliement γ , **12 γ** , ou une conformation sans liaison hydrogène **12n** (figure 3).¹⁹

Figure 3. Conformations possibles de l'amide modèle (3*S*, 6*S*, 9*S*)-**12**.^{19,20}



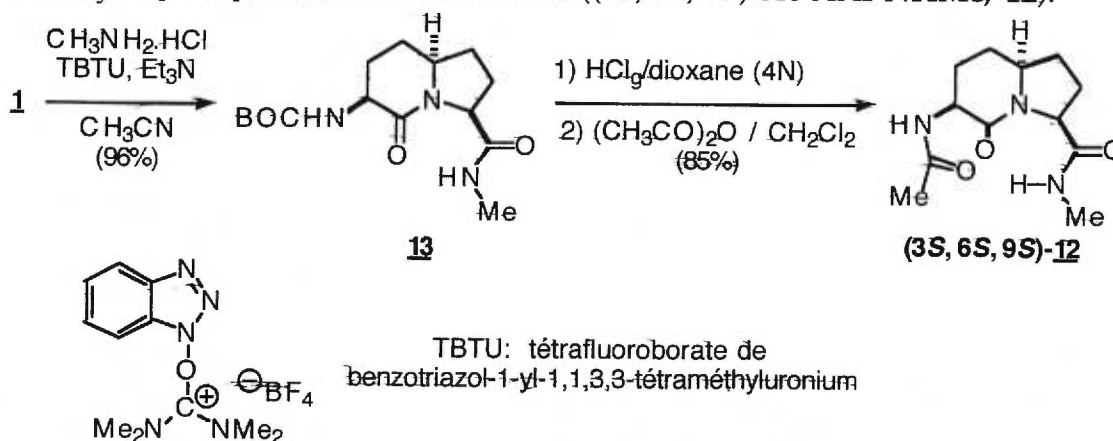
L'influence du milieu extérieur (solvant, température ou concentration) sur les protons amides NHAc et NHMe, étudiée en parallèle par la RMN et l'IR-TF, a permis de déterminer la conformation adoptée par l'amide modèle.

Parmi les angles de torsion qui définissent la conformation, l'angle de torsion ϕ_2 est celui qui permet la quantification du passage d'une conformation à l'autre (telle que 12β à 12γ). Cette valeur ϕ_2 peut être directement déterminée par la mesure de la valeur de l'angle de torsion $^3J_{H-H}$. Ainsi cette donnée s'avère précieuse dans la recherche de la conformation induite.

5.4.1 Synthèse.

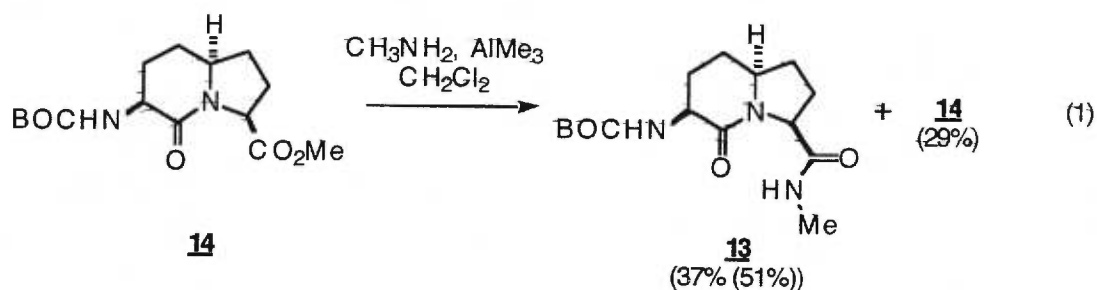
Les amides modèles simples sont rapidement obtenus à partir des dérivés acides correspondant en utilisant le réactif de couplage TBTU dans l'acétonitrile. Ainsi, l'amide modèle (3*S*, 6*S*, 9*S*)-*N*'-méthyl 2-oxo-3-*N*-acétamido-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide ((3*S*, 6*S*, 9*S*)-Ac-AAI-NHMe, **12**) a été synthétisé en trois étapes avec un rendement global de 82% à partir de l'AAI-1 (schéma 1). L'amide AAI-*N*'-méthyle **13** a d'abord été synthétisé avec un rendement de 96% par couplage de l'acide **1** avec le chlorhydrate de la méthylamine en présence de tétrafluoroborate de benzotriazol-1-yl-1,1,3,3-tétraméthyluronium²¹ (TBTU) et de la triéthylamine dans l'acétonitrile (ces conditions de couplage ont été utilisées dans tous les cas de formation d'amides). La déprotection du groupe Boc de **13** avec une solution 4N d'acide chlorhydrique dans le dioxane puis l'acétylation avec l'anhydride acétique conduit, après purification par HPLC, à l'amide modèle **12** avec un rendement de 80%. Les assignations de tous les protons et carbones ont été faites grâce aux spectres RMN 2-dimension COSY et HMQC.

Schéma 1. Synthèse du (3*S*, 6*S*, 9*S*)-*N*'-méthyl 2-oxo-3-*N*-acétamido-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide ((3*S*, 6*S*, 9*S*)-Ac-AAI-NHMe, **12**).

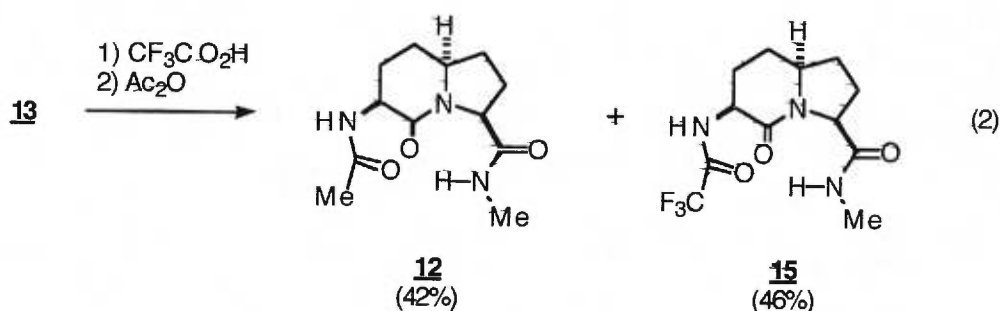


Parmi les nombreux réactifs de couplage récemment mis au point, le choix s'est porté sur le TBTU pour deux raisons. Il permet des réactions propres avec d'excellents rendements (sans épimérisation du centre α et rend facile la purification des produits de réaction) et il est disponible commercialement.

Dans le cas des prolines 5-*tert*-butyles,²² l'introduction de la fonction méthylamide a été accomplie en utilisant la méthode décrite par Weinreb²³ avec de bons résultats. Cependant, l'emploi de cette méthode sur l'ester méthylique **14** (traitement avec une solution prémixée *in situ* de triméthyl aluminium et de chlorhydrate de la méthylamine dans le benzène) a toujours conduit à des réactions incomplètes (équation 1). Cet insuccès a donc dicté le passage par l'acide et l'utilisation d'un réactif de couplage pour la formation de la *N*-méthylamide.

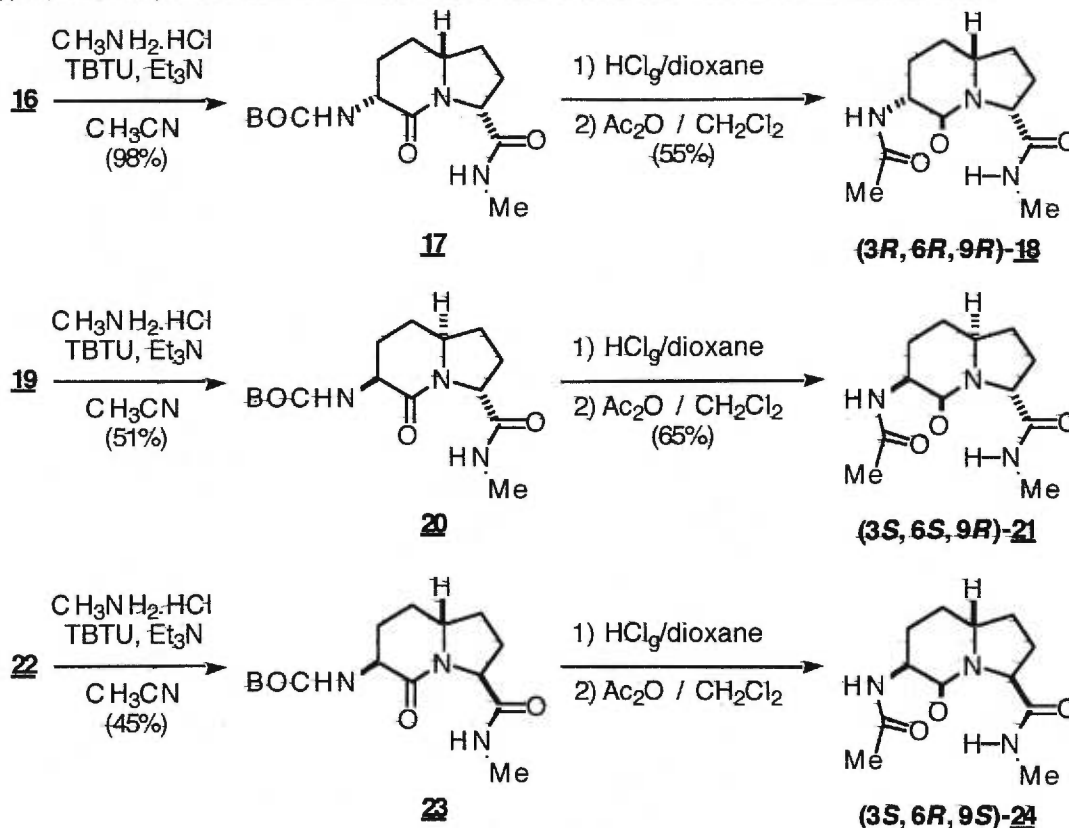


La déprotection du groupe Boc de **13** a été initialement conduite utilisant l'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane (équation 2). Cependant, l'acétylation du sel trifluoroacétate dérivé de **13** a conduit à un mélange équimolaire de deux produits, l'amide modèle désiré **12** et l'amide trifluoroacétylé **15**. L'échange d'anions entre l'anhydride acétique et le trifluoroacétate conduit à un anhydride mixte ($\text{CF}_3\text{COOCOCH}_3$) qui va réagir avec l'amine pour donner le dérivé **15**. Le changement de la méthode de déprotection, en utilisant cette fois l'acide chlorhydrique, évite ce problème et conduit à l'amide désirée **12** avec un bon rendement.



Les autres amides stéréoisomères *N*-acétyl *N'*-méthyle (*3R* *6R*, *9R*)-**18** et (*3S* *6S*, *9R*)-**21** ont été synthétisées en trois étapes, en suivant la même méthode utilisée pour **12**, avec des rendements globaux de 54% et 33% à partir des acides (*3R* *6R*, *9R*)-AAI-**16** et (*3S* *6S*, *9R*)-AAI-**19** respectivement (schéma 2).

Schéma 2. Synthèse des *N'*-méthyl 2-oxo-3-acetamido-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamides ((*3R*, *6R*, *9R*)-Ac-AAI-NHMe, **18**), ((*3S*, *6S*, *9R*)-Ac-AAI-NHMe, **21**) et ((*3S*, *6R*, *9S*)-Ac-AAI-NHMe, **24**).



Dans le cas de l'amide *N*-acétyl *N'*-méthyle (*3S*, *6R*, *9S*)-**24**, elle n'a jamais pu être correctement isolée et caractérisée, bien que la séquence des réactions a conduit au produit désiré (comparaison avec **12** par CCM et HPLC).

Avec ces trois amides modèles obtenues, des analyses conformationnelles ont été entreprises en utilisant les techniques de RMN, d'IR-TF et de dichroïsme circulaire.

5.4.2 Modélisation moléculaire.

Les premières indications sur la possibilité d'induire des conformations spécifiques avec ces amides modèles ont été fournies par les résultats de la modélisation moléculaire. Les calculs des énergies des conformères pour les différentes amides diastéréoisomériques ont été effectués en utilisant le programme MacroModel (version 4.5x),²⁴ et le champs de force AMBER.²⁵

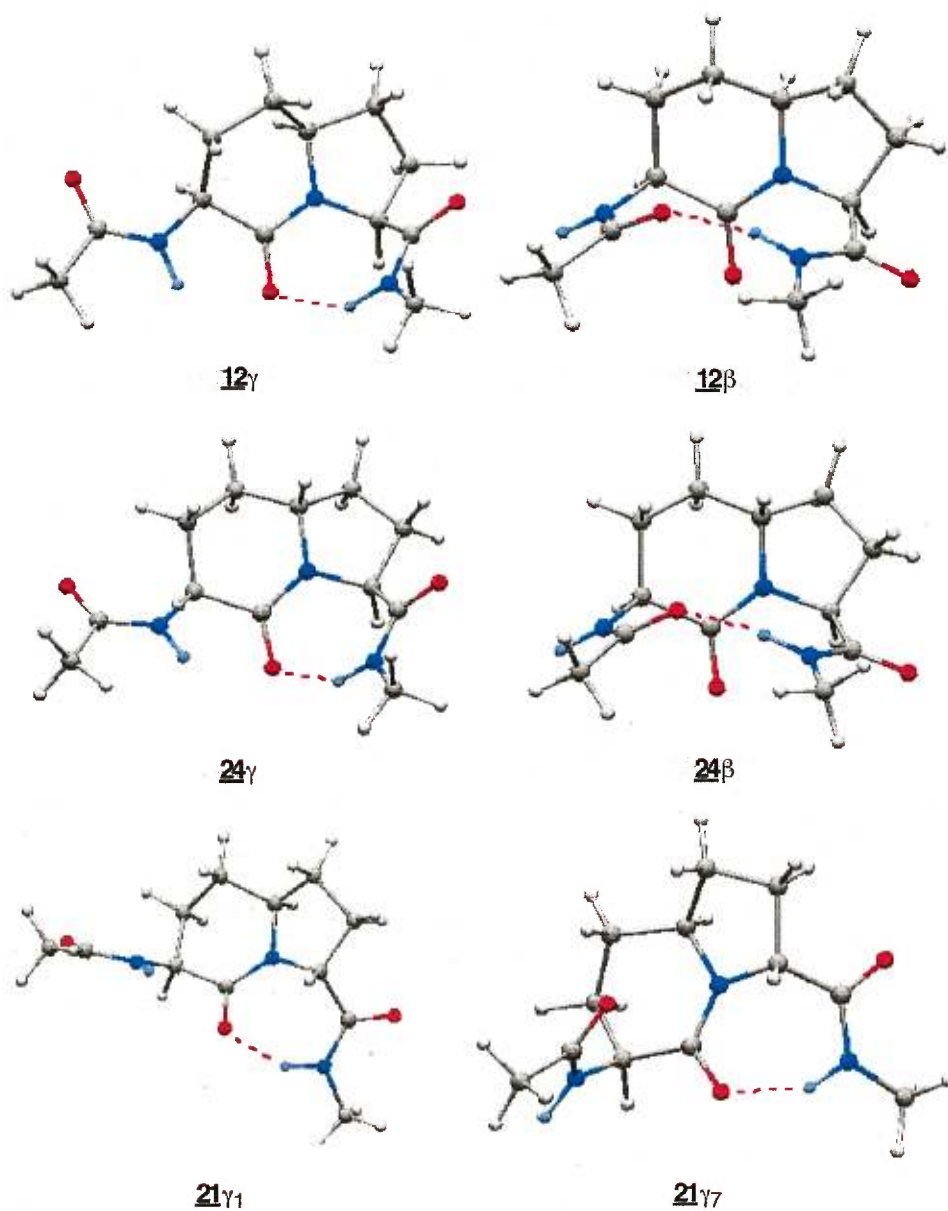
Le tableau 1 présente les résultats de la modélisation moléculaire des amides modèles en utilisant le chloroforme comme modèle de solvation. Il est à associer avec la figure 4, qui représente les minima des conformations de repliements γ et β pour chaque amide. Ces résultats ont indiqué que **12** et **24** peuvent adopter des conformations de repliement γ et β . Parmi ces conformations minima, un grand nombre de conformations de repliement γ est trouvée (60-70%) tandis qu'un faible nombre de conformations de repliement β est détectée (20-30%). Le repliement γ (**12 γ** et **24 γ**) est prédit comme la conformation de plus basse énergie. Dans le cas de **12**, le repliement β est la cinquième conformation de plus basse énergie, <11 KJ/mol plus élevée en énergie par rapport au minimum. Dans le cas de **24**, le repliement β est la seconde conformation de plus basse énergie, >1 KJ/mol plus élevée en énergie par rapport au minimum. Ainsi, ces différences d'énergie indiquent que **24** serait mieux capable de stabiliser une conformation de repliement β que **12**. De plus, en utilisant l'équation de Karplus et les valeurs des angles ϕ_2 des minima conformationnels, les valeurs de la constante de couplage $^3J_{H-H}$ sont calculées. Elles sont de

l'ordre de 4 Hz pour le repliement γ et près de 7 Hz pour le repliement β . Le repliement γ est aussi prédit comme la conformation de plus basse énergie pour l'amide **21**, qui ne peut pas adopter un repliement β dû au centre stéréogène 9 qui est de configuration *R*. Les résultats des modélisations de l'amide **18** ont montrés des conclusions similaires à celles obtenues pour son énantiomère **12**. Cependant, les repliements générés par **18**, γ type normal et β type II, sont les images énantiomères de ceux présents dans **12**. Ainsi, le peptidomimétique (3*R*, 6*R*, 9*R*)-Boc-IAA-OH **1** pourrait stabiliser des conformations de repliement β de type II.

Tableau 1. Analyses conformationnelles des amides modèles Ac-AAI-NHMe, en utilisant le chloroforme comme modèle de solvation et le champs de force AMBER.

(3<i>S</i>, 6<i>S</i>, 9<i>S</i>)-Ac-AAI-NHMe 12											
no. de conformations de basse énergie	no. (%) du rep. β	no. (%) du rep. γ	conformère (no.)	E_{total} (KJ/mol)	ϕ_2	ψ_2	ϕ_3	ψ_3	liaison H (d. Å)	$^3J_{H-H}$ (Hz)	
10	2 (20) type II'	6 (60) type γ^I	12 γ (1)	-216.8	-174.8	-167.9	-73.9	66.8	1.9	4.2	
			12 β (5)	-205.1	51.9	-126.6	-66.9	-5.5	1.9	6.8	
(3<i>S</i>, 6<i>R</i>, 9<i>S</i>)-Ac-AAI-NHMe 24											
32	2 (28) type II'	9 (68) type γ^I	24 γ (1)	-220.0	-179.6	-137.2	-76.0	62.5	1.8	3.4	
			24 β (2)	-219.6	51.6	-125.2	-71.8	-2.9	1.9	6.8	
(3<i>S</i>, 6<i>S</i>, 9<i>R</i>)-Ac-AAI-NHMe 21											
10	0 (0)	100 (100) type γ^N	21 γ_1 (1)	-216.4	-173.1	-121.5	73.6	-84.2	1.8	4.2	
			21 γ_7 (7)	-198.2	38.9	-119.0	75.9	-65.1	1.8	6.2	
Valeurs théoriques des angles de torsion pour:			- un repliement β de type II'	60	-120	-80	0				
			- un repliement γ de type inverse			-80	80				
			- un repliement γ de type normal			80	-80				

Figure 4. Représentation des minima des conformations de repliements γ et β pour chaque amide (avec le chloroforme comme modèle de solvataion).

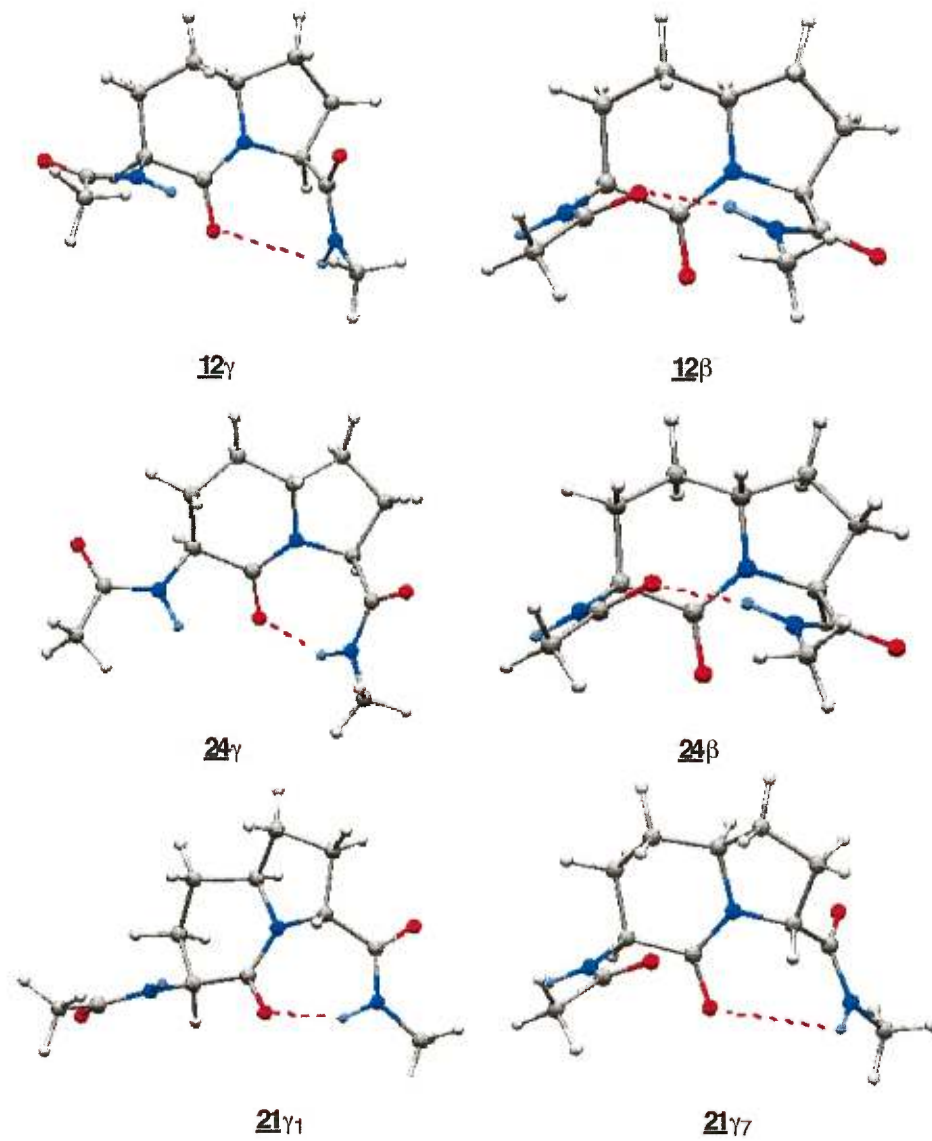


Le tableau 2 présente les résultats de la modélisation moléculaire des amides modèles en utilisant l'eau comme modèle de solvation. Il est à associer avec la figure 5 qui représente les minima des conformations de repliements γ et β pour chaque peptide. La modélisation utilisant l'eau comme modèle de solvation a prédit que les conformations sans liaison hydrogène sont de plus basse énergie. Les repliements γ sont respectivement 2.8 et 4.7 Kcal/mol plus élevés en énergie par rapport au minimum dans le cas de 12γ et 24γ . Le repliement γ reste toujours de plus basse énergie que le repliement β et le repliement β de l'amide **24** est plus bas en énergie par rapport au minimum que celui de **12**.

Tableau 2. Analyses conformationnelles des amides modèles Ac-AAI-NHMe, en utilisant l'eau comme modèle de solvation et le champs de force AMBER.

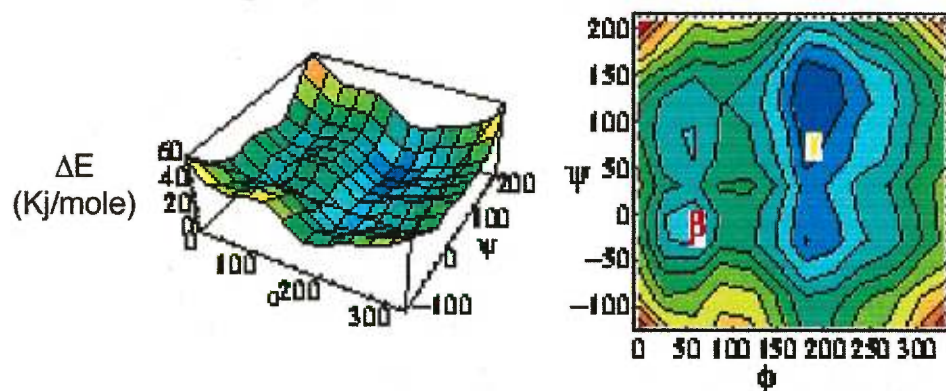
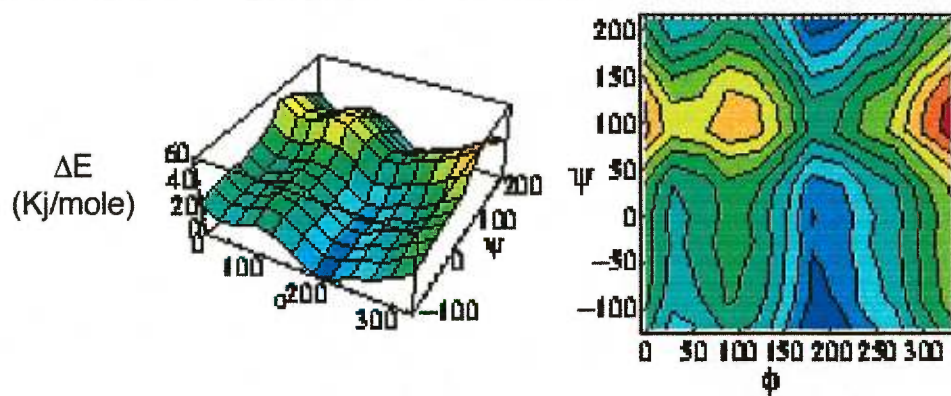
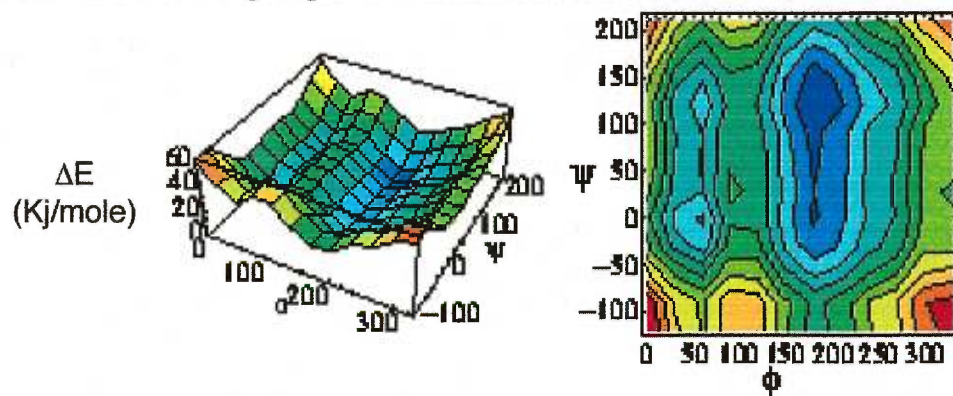
(3S, 6S, 9S)-Ac-AAI-NHMe 12											
no. de conformations de basse énergie	no. (%) du rep. β	no. (%) du rep. γ	conformère (no.)	E_{total} (KJ/mol)	ϕ_2	ψ_2	ϕ_3	ψ_3	liaison H (d. Å)	$^3J_{H-H}$ (Hz)	
23	3 (13) type II'	11 (49) type γ^I	12 γ (3)	-215.5	-164.4	-112.7	-60.1	105.8	2.7	5.6	
			12 β (11)	-206.8	51.1	-125.5	-65.6	-9.7	1.8	6.7	
(3S, 6R, 9S)-Ac-AAI-NHMe 24											
21	5 (24) type II'	10 (48) type γ^I	24 γ (3)	-217.7	-177.5	-135.6	-76.1	170.0	1.8	4.0	
			24 β (4)	-213.4	51.8	-121.1	-71.0	-6.4	2.0	6.8	
(3S, 6S, 9R)-Ac-AAI-NHMe 21											
28	0 (0)	15 (54) type γ^N	21 γ^I (2)	-215.4	-171.6	-118.2	74.2	-73.1	1.9	4.8	
			21 γ^N (17)	-204.2	36.7	-115.1	71.5	-116.1	3.0	5.9	
Valeurs théoriques des angles de torsion pour:		- un repliement β de type II'			60	-120	-80	0			
		- un repliement γ de type inverse					-80	80			
		- un repliement γ de type normal					80	-80			

Figure 5. Représentation des minima des conformations de repliements γ et β pour chaque amide (avec l'eau comme modèle de solvation).



L'utilisation d'une méthode graphique a permis la comparaison des effets de stéréochimie sur les conformations résultantes. Ainsi, les capacités de formation de repliements β ou γ , selon la stéréochimie des positions 3, 6 et 9 du bicycle AAI, peuvent être prédites et visualisées qualitativement par les tracés de cartes présentant le profil énergie *vs* conformation. Une analyse systématique (effectuée avec le champs de force AMBER et le chloroforme comme modèle de solvation) a été accomplie dans laquelle les valeurs des angles de torsion ϕ_2 et ψ_3 sont successivement incrémentées de 30° . L'énergie du minimum local est alors calculée pour chaque conformation générée. Les cartes tridimensionnelles 1 à 3 sont alors construites pour les peptides modèles Ac-AAI-NHMe **12**, **21** et **24** respectivement par les tracés des valeurs des énergies minimales à chaque intervalle en fonction des angles de torsion ϕ_2 et ψ_3 .

Les cartes d'énergie 1 à 3 fournissent donc une représentation graphique de la distribution conformationnelle dans les amides modèles diastéréoisomères considérées. La comparaison des cartes montre que la conformation de repliement γ possède une énergie plus basse que celle d'un repliement β . La possibilité de formation d'un repliement β décroît avec l'ordre $(3S, 6R, 9S)$ -**24** > $(3S, 6S, 9S)$ -**12** > $(3S, 6S, 9R)$ -**21**. Cependant une possibilité existe pour les amides **12** et **24** d'effectuer une transition conformationnelle entre les deux types de repliements car la différence d'énergie est suffisamment faible pour laisser cette transition.

Carte 1. Surface énergétique de l'amide modèle (3*S*, 6*S*, 9*S*)-Ac-AAI-NHMe (12).**Carte 2.** Surface énergétique de l'amide modèle (3*S*, 6*S*, 9*R*)-Ac-AAI-NHMe (21).**Carte 3.** Surface énergétique de l'amide modèle (3*S*, 6*R*, 9*S*)-Ac-AAI-NHMe (24).

5.4.3 Études RMN.

Les méthodes spectroscopiques, en particulier la comparaison des données de RMN et de IR pour les protons amides, permettent la détection de pont hydrogène en solution.

Les dépendances des déplacements chimiques des protons amides observées par RMN en fonction de la température ont été largement utilisées comme outil pour étudier les liaisons hydrogènes de peptides en solution.²⁶ En particulier, les mesures des coefficients de température $\Delta\delta/\Delta T$, par expériences de basse ou haute température, sont devenues un paramètre standard dans la caractérisation du comportement d'un peptide en solution.⁵ Cependant, les équilibres entre des états de liaison hydrogène ou non pour des protons amide donnés sont presque toujours plus rapides que l'échelle de temps de la RMN, et les déplacements chimiques observés de ces protons amide sont des moyennes pondérées des déplacements chimiques des états contributeurs.²⁶

Les équilibres entre des états de liaison hydrogène ou non sont plus lents que l'échelle de temps de la spectroscopie IR. La spectroscopie IR permet donc l'observation des bandes d'absorption amide distinctes. Cependant, l'application de la spectroscopie IR à des molécules plus complexes, telles les peptides, est limitée par la superposition des signaux lorsque plusieurs fonctions amide sont présentes.²⁶

Les déplacements chimiques des protons amides sont sensibles à l'état dans lequel se trouvent ces protons (en liaison hydrogène ou non).

Un proton amide non impliqué dans une liaison hydrogène (libre) va subir l'influence de l'environnement externe (comme la température ou la concentration), et son coefficient de température $\Delta\delta/\Delta T$ élevé va refléter cette exposition au solvant. Par contre, un proton amide impliqué dans une liaison hydrogène (lié) sera moins affecté par l'environnement externe et son coefficient de température $\Delta\delta/\Delta T$ sera faible. A partir de cette affirmation, l'influence de la température sur les protons amides du peptide modèle a été étudiée avec l'enregistrement des spectres RMN à des températures et des concentrations variables dans des solvants non polaires.

La figure 6 décrit le graphe où sont représentés les déplacements chimiques, exprimés en ppm, des protons amides du (3*S*, 6*S*, 9*S*)-Ac-AAI-NHMe (12) en fonction de la température avec une concentration de 5 mmol/ml dans le dichlorométhane. Ce graphe montre que les déplacements chimiques du proton amide de l'AAI (N-H_{AAI}, figuré en rouge) augmentent fortement avec la diminution de la température. A l'inverse, les déplacements chimiques du proton méthylamide (N-H_{Me}, figuré en vert) sont relativement indépendants de la variation de température par rapport à ceux du N-H_{AAI}. Le coefficient de pente $\Delta(\delta_{NH})/\Delta(T)$ du proton amide N-H_{Me} ($-2.0 \cdot 10^{-3}$ ppm/K) suggère la présence d'une liaison hydrogène avec ce proton.²⁶ Par contre le coefficient de pente $\Delta(\delta_{NH})/\Delta(T)$ du proton amide N-H_{AAI} ($-6.8 \cdot 10^{-3}$ ppm/K) suggère un proton libre.²⁶

Figure 6. Effets de la température sur les déplacements chimiques des protons amides du (3*S*, 6*S*, 9*S*)-Ac-AAI-NHMe (**12**) dans le dichlorométhane.

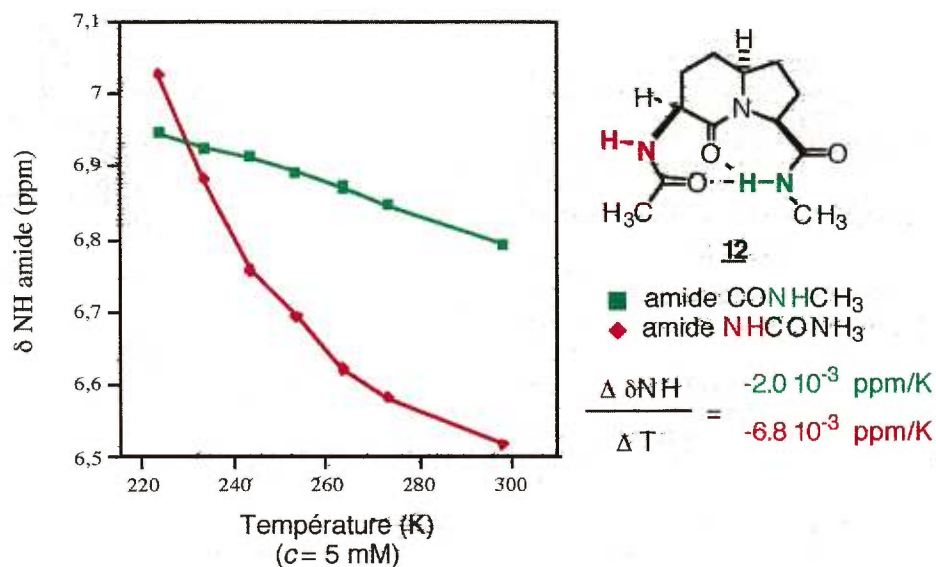
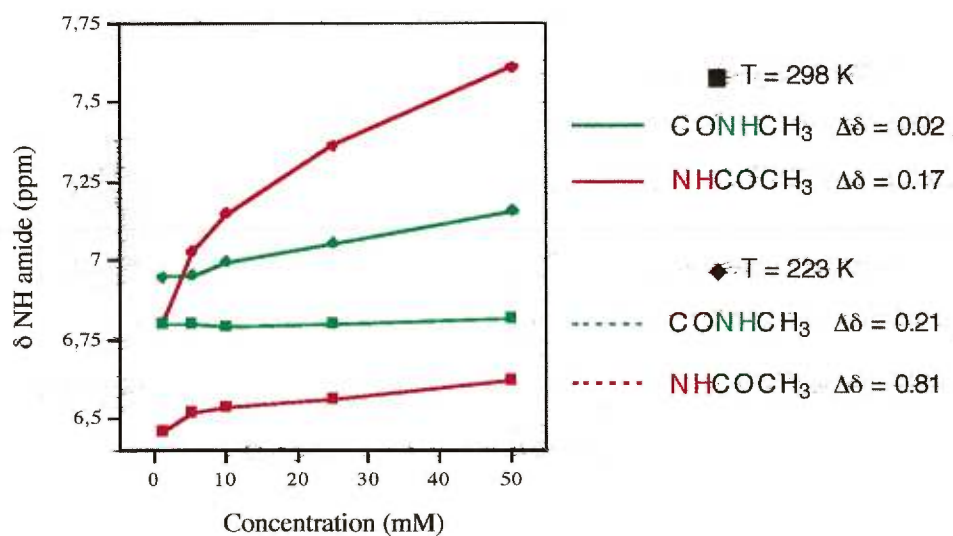


Figure 7. Effets de la concentration sur les déplacements chimiques des protons amides du (3*S*, 6*S*, 9*S*)-Ac-AAI-NHMe (**12**) dans le dichlorométhane.



La figure 7 décrit le graphe où sont représentés les déplacements chimiques, exprimés en ppm, des protons amides de **12** en fonction de la concentration, exprimée en mmol/ml, aux températures de 298 K et 223 K dans le dichlorométhane. Il est à associer avec le tableau 3, qui présente les valeurs des coefficients de température $\Delta(\delta\text{NH})/\Delta(T)$ pour les protons amides de **12** en fonction de la concentration et enregistrés dans le dichlorométhane deutéré.

Tableau 3. Variation des coefficients de température des protons amides du (3S, 6S, 9S)-Ac-AAI-NHMe (**12**) en fonction de la concentration.

Concentration (mM) CD ₂ Cl ₂	$\Delta \delta\text{NH} / \Delta T$ CONHCH ₃ ($\cdot 10^{-3}$ ppm / K)	$\Delta \delta\text{NH} / \Delta T$ NHCOCH ₃ ($\cdot 10^{-3}$ ppm / K)
1	1.98	4.80
5	2.00	6.80
10	3.07	8.27
25	3.47	11.47
50	4.40	13.07

(Les coefficients sont calculés sur la région 223-298 K)

Ces données indiquent que les déplacements chimiques du proton amide de l'AAI (N-H_{AAI}, figuré en rouge) sont dépendants de la concentration relativement à ceux du proton méthylamide (N-H_{Me}, figuré en vert): les variations de déplacement chimique, pour une variation de concentration de 49 mmol/ml, sont de 0.17 et 0.80 à 298 K et 223 K respectivement pour N-H_{AAI}, comparés à 0.02 et 0.21 pour N-H_{Me} aux mêmes températures (figure 7). La même conclusion que précédemment peut être déduite: la présence d'un pont hydrogène relativement indépendant de la concentration pour le N-H_{Me} et un N-H_{AAI} libre

l'effet de la température et de la concentration indiquent la présence d'une liaison hydrogène pour le N-H_{Me} interne et un N-H_{AAI} externe qui est libre. Il faut cependant noter que, bien qu'un proton amide est plus exposé au solvant que l'autre, les deux sont plus exposés au solvant que les protons liés dans les peptides cycliques ou les protéines.¹⁵

L'implication d'un proton amide dans une liaison hydrogène et la stabilité de cette liaison hydrogène peuvent être évaluées par l'addition d'un solvant polaire accepteur de liaison hydrogène tel que le DMSO. La mesure de la dépendance des déplacements chimiques d'un proton amide en fonction de la composition du solvant permet cette quantification.²⁷

La figure 8 décrit le graphe où sont représentés les déplacements chimiques exprimés en ppm des protons amides de 12 en fonction du pourcentage de DMSO (volume à volume dans le dichlorométhane) à une concentration de 20 mmol/ml aux températures de 298 K et 223 K. Ce graphe indique que les variations des déplacements chimiques des deux protons amides, lors de l'addition de DMSO (de 0 à 10%), sont du même ordre de grandeur, $\Delta\delta = 0.41$ et 0.49 pour les protons N-H_{Me} et N-H_{AAI} respectivement à la température de 298 K. Avec la baisse de la température, ces différences sont plus prononcées: à la température de 223 K, ces valeurs sont de $\Delta\delta = 0.79$ et 0.93 pour les protons N-H_{Me} et N-H_{AAI} respectivement. Dans le cas de protons exposés au solvant, la valeur de $\Delta\delta$ est de l'ordre de 2 et dans le cas de protons non exposés au solvant, la

Figure 8. Effets de l'addition de DMSO sur les déplacements chimiques des protons amides du (3*S*, 6*S*, 9*S*)-Ac-AAI-NHMe (**12**) dans le dichlorométhane.

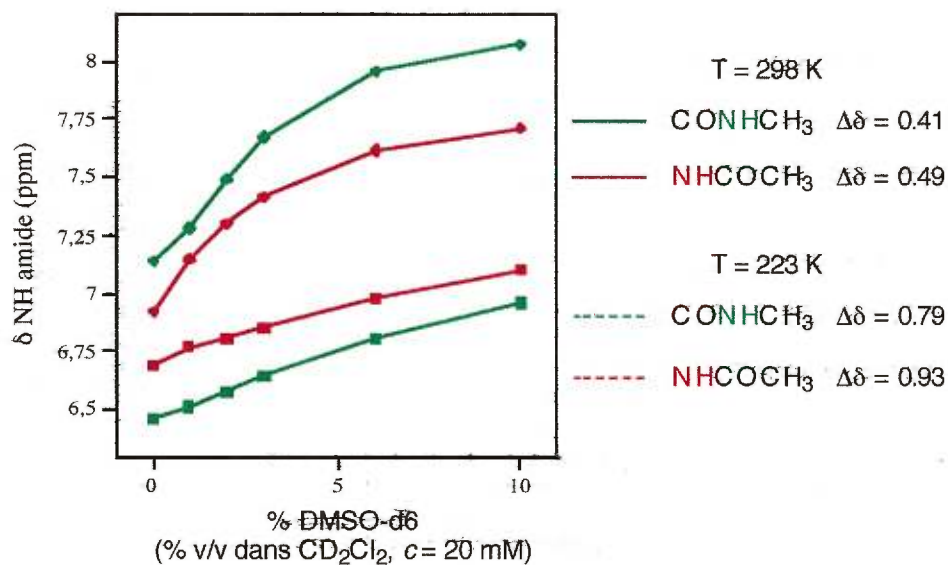
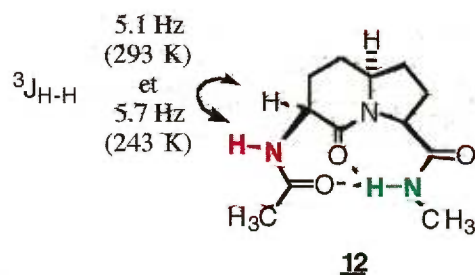


Figure 9.



valeur de $\Delta\delta$ est de l'ordre de 0.1.²⁷ Dans le cas de l'amide **12**, les variations des déplacements chimiques entre les deux protons amides ne sont pas significatives. Ainsi, les deux protons amides adoptent le même comportement vis-à-vis du solvant et l'amide **12** présente une conformation dépendante du solvant. La conformation ayant une liaison hydrogène qui est stabilisée dans un solvant non polaire va être désorganisée dans un solvant polaire. L'addition du DMSO a un effet plus grand à basse température car la liaison hydrogène intermoléculaire entre le DMSO et les protons amides est mieux stabilisée à basse température. Ce résultat est conforté par les résultats des modélisations moléculaires effectuées dans l'eau où les conformations ne présentant pas de liaisons hydrogènes sont de plus basse énergie que celles des repliements γ ou β .

La détermination de la valeur de la constante de couplage $^3J_{H-H}$ entre le proton amide N-H_{AAI} et H_{C3} est un moyen de calculer la valeur de l'angle ϕ_2 et ainsi connaître un profil de la conformation en solution. Cette valeur fut accessible par une expérience particulière de découplage sélective effectuée sur un appareil RMN 600 MHz à la température de la pièce et à une concentration de 20 mmol/ml (figure 9). Cette valeur est de 5.1 Hz pour l'amide **12**, ce qui est proche de celle calculée par la modélisation moléculaire pour une conformation de repliement γ (valeur moyenne \approx 4.5 Hz, **12** γ , figure 4).

La valeur de l'angle de torsion ϕ_2 peut être calculée à partir de la constante de couplage $^3J_{H-H}$ grâce à l'équation de Karplus, en utilisant l'équation 3:²⁸

$${}^3J_{\alpha N} \text{ (Hz)} = 6.4 \cos^2 \theta - 1.4 \cos \theta + 1.9 \quad (3)$$

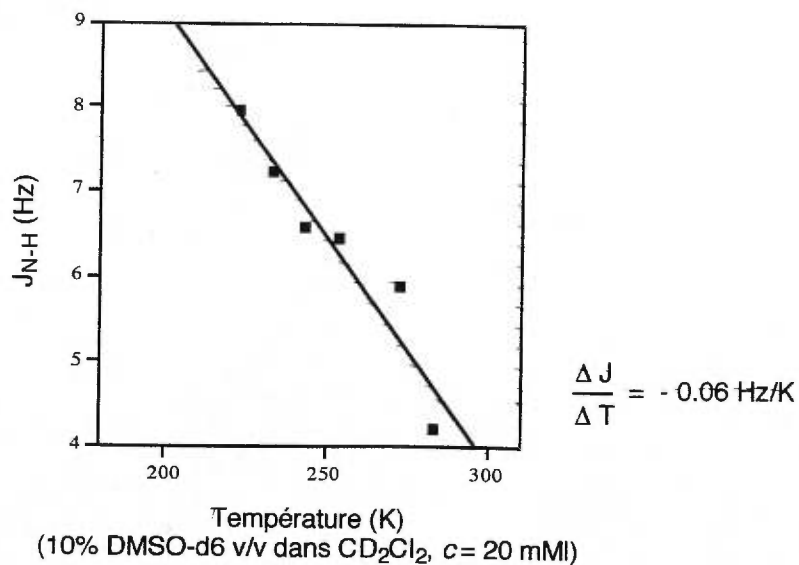
$$(\theta = |\phi - 60|)$$

A partir de la valeur 5.1 Hz, le calcul donne deux séries de valeurs pour l'angle de torsion ϕ , 3, 113° et 34, 94°.

La valeur de la constante de couplage ${}^3J_{H-H}$ a également été mesurée à 5.7 Hz à 243 K pour une concentration de 20 mmol/ml. La mesure de cette constante de couplage, ${}^3J_{H-H}$, n'est pas aisée et seulement deux valeurs ont pu être mesurées et elles indiquent une modification de la conformation en fonction de la température. Cependant, lors des expériences d'addition de DMSO, cette valeur a pu être mesurée à chaque température et traduite sous forme d'un graphe.

La figure 10 décrit le graphe où sont représentées les valeurs de la constante de couplage ${}^3J_{H-H}$ entre le proton amide N-H_{AAI} et H_{C3} de 12 exprimées en Hz en fonction de la température à une concentration de 20 mmol/ml dans un mélange de 10% de DMSO deutéré dans le dichlorométhane deutéré. Ce graphe montre une variation linéaire décroissante de la valeur de la constante de couplage ${}^3J_{H-H}$ avec l'augmentation de la température. Ces données indiquent que l'angle ϕ est dépendant de la température et qu'il y a un changement conformationnel avec la baisse de la température. Ces données, obtenues en présence de DMSO, montrent que la conformation est perturbée par l'addition d'un solvant polaire.

Figure 10. Variation de la constante de couplage $^3J_{\text{H-H}}$ en fonction de la température pour l'amide (3*S*, 6*S*, 9*S*)-Ac-AAI-NHMe (**12**).



Ainsi, ces expériences ont montré la présence d'une conformation possédant une liaison hydrogène et stabilisée dans un solvant non polaire. Cependant, l'addition d'un solvant polaire entraîne une perturbation de cette conformation.

L'amide modèle (3*S*, 6*S*, 9*R*)-Ac-AAI-NHMe (**21**) a fait l'objet de moins d'études que son diastéréoisomère. De par sa stéréochimie, ce système semble plus simple car il ne peut pas adopter une conformation de repliement de type β . Les résultats des études modèles ont montré que la conformation de repliement de type γ est une conformation privilégiée (voir la section 5.4.2 sur la modélisation moléculaire).

La figure 11 décrit le graphe où sont représentés les déplacements chimiques, exprimés en ppm, des protons amides de l'amide **21** en fonction de la température à une concentration de 20 mmol/ml dans le dichlorométhane. Ce graphe montre que les déplacements chimiques du proton amide de l'AAI (N-H_{AAI}, figuré en rouge) et du proton méthylamide (N-H_{Me}, figuré en vert) augmentent de façon significative avec la diminution de la température. Les coefficients de température $\Delta(\delta\text{NH})/\Delta(T)$ respectifs sont de $-5.1 \cdot 10^{-3}$ ppm/K et de $-8.5 \cdot 10^{-3}$ ppm/K. Ces valeurs indiquent que les deux protons amides subissent l'effet de température et sont plus exposés au solvant que ceux de l'amide **12**.

La tableau 4 présente les variations des coefficients de température des protons amides exprimés en ppm/K en fonction du pourcentage de DMSO (volume à volume dans le dichlorométhane). Les variations des coefficients de température des protons amides indiquent que les différences des valeurs des coefficients de température pour un pourcentage de DMSO, passant de 0 à 10 pour les deux protons, sont relativement faibles et du même ordre de grandeur: l'addition d'un solvant polaire affecte de façon moins significative la conformation présente que dans l'amide **12**.

Figure 11. Effets de la température sur les déplacements chimiques des protons amides du (3*S*, 6*S*, 9*R*)-Ac-AAI-NHMe (**21**) dans le dichlorométhane.

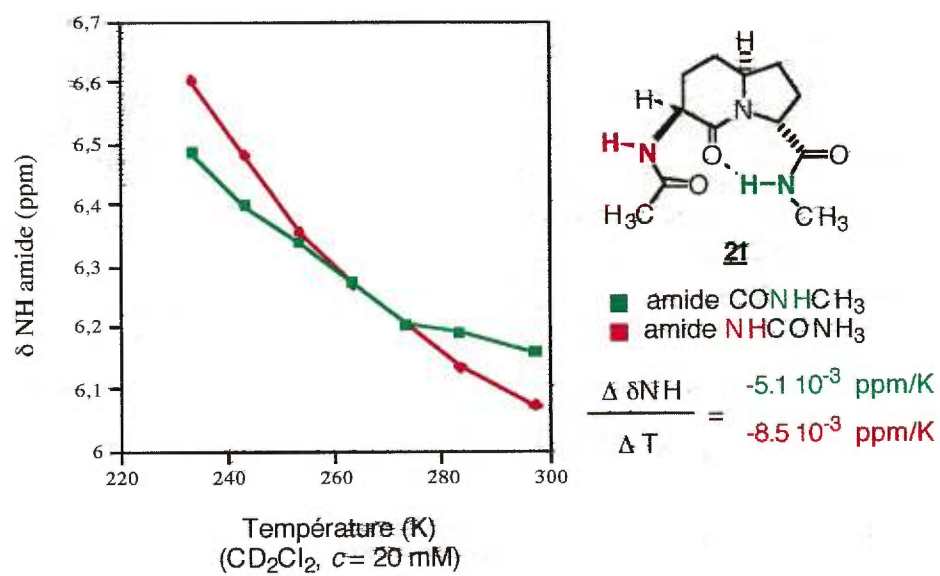
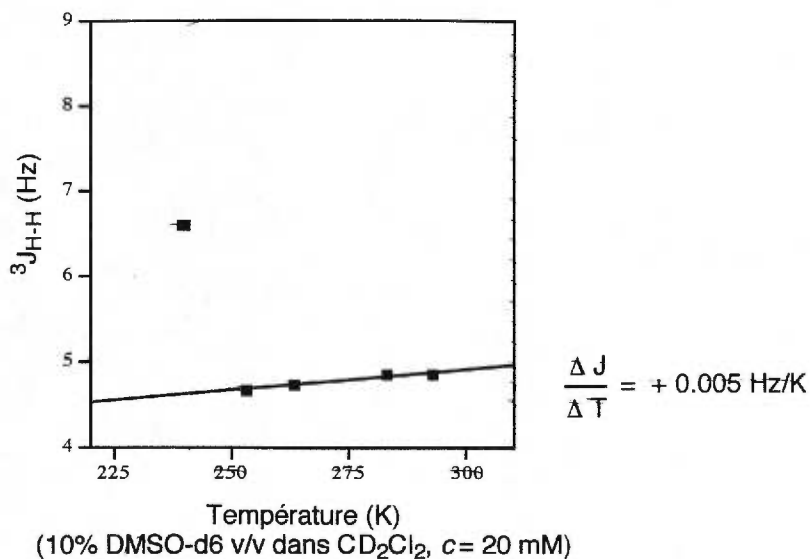


Tableau 4. Variation des coefficients de température des protons amides du (3*S*, 6*S*, 9*R*)-Ac-AAI-NHMe (**21**) en fonction du pourcentage de DMSO.

% DMSO v/v CD ₂ Cl ₂ (c = 20 mM)	$\Delta \delta_{\text{NH}} / \Delta T$ CONHCH ₃ ($\cdot 10^{-3}$ ppm / K)	$\Delta \delta_{\text{NH}} / \Delta T$ NHCOCH ₃ ($\cdot 10^{-3}$ ppm / K)
0	5.1	8.5
10	7.2	10.3

La figure 12 décrit le graphe où sont représentées les valeurs de la constante de couplage ${}^3J_{\text{H-H}}$ entre le proton amide N-H_{AAI} et H_{C3} de l'amide **21** exprimées en Hz en fonction de la température à une concentration de 20 mmol/ml dans un mélange de 10% de DMSO deutéré dans le dichlorométhane deutéré.

Figure 12. Variation de la constante de couplage ${}^3J_{\text{H-H}}$ en fonction de la température pour l'amide (3*S*, 6*S*, 9*R*)-Ac-AAI-NHMe (**21**).



Ce graphe montre, à une exception près (à basse température), une certaine linéarité de la valeur de la constante de couplage ${}^3J_{\text{H-H}}$ avec la baisse de la température. Cette indépendance de l'angle dièdre ϕ_2 pour l'amide **21** dans un solvant plus polaire suggère que cet angle est relativement fixé. Ainsi, l'amide modèle **21** peut présenter dans ce système de solvant une conformation de type γ ou plus probablement une conformation sans liaison hydrogène.

5.4.4 Études IR.

Une liaison N-H d'une amide non impliquée dans une liaison hydrogène (libre) présente une bande d'absorption (allongement) à une longueur d'onde plus élevée que celle d'une liaison N-H d'une amide impliquée dans une liaison hydrogène (liée).^{26b,29} A partir de cette matière, l'influence de la concentration et de la température sur les bandes d'absorption des liaisons N-H amides de l'amide modèle **12** a été étudiée avec l'enregistrement des spectres IR-TF à des températures et des concentrations variables.

La figure 13 décrit le graphe où est représentée l'absorption des bandes des liaisons N-H amides de l'amide **12** en fonction de la longueur d'onde exprimée en cm^{-1} à la température de 294 K avec des concentrations variables (1, 5 et 10 mmol/ml) dans le dichlorométhane. Les spectres d'IR-TF indiquent donc deux bandes d'absorption correspondant à une liaison N-H amide libre (3448 et 3405 cm^{-1}) ainsi qu'une bande d'absorption correspondant à une liaison N-H amide liée (3336 cm^{-1}). La variation de la concentration d'un facteur de 10 n'entraîne pas de modification sur l'aspect des spectres car les trois bandes d'absorption sont toujours présentes aux mêmes longueurs d'ondes et avec les mêmes intensités relatives. Par conséquent, il ne semble pas y avoir pas d'association intermoléculaire. Les analyses RMN ayant suggérées la présence d'une liaison hydrogène, celle-ci est intramoléculaire et les bandes d'absorption correspondant aux liaisons N-H amides libres ne peuvent être attribuées à une conformation de type **12n**

Figure 13. Effets de la concentration sur la fréquence d'absorption des bandes des liaisons N-H amides en IR-TF du (3*S*, 6*S*, 9*S*)-Ac-AAI-NHMe (12) dans le dichlorométhane.^a

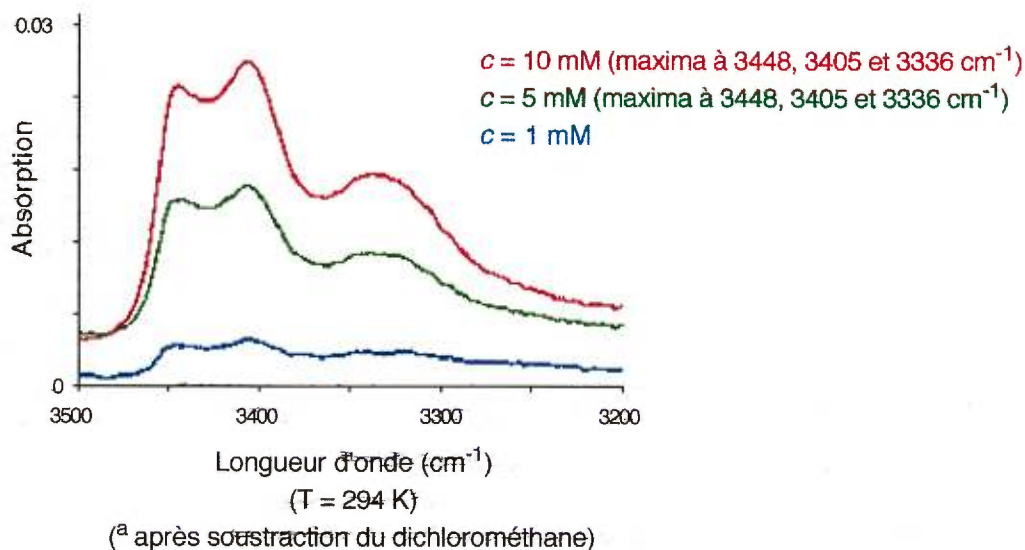
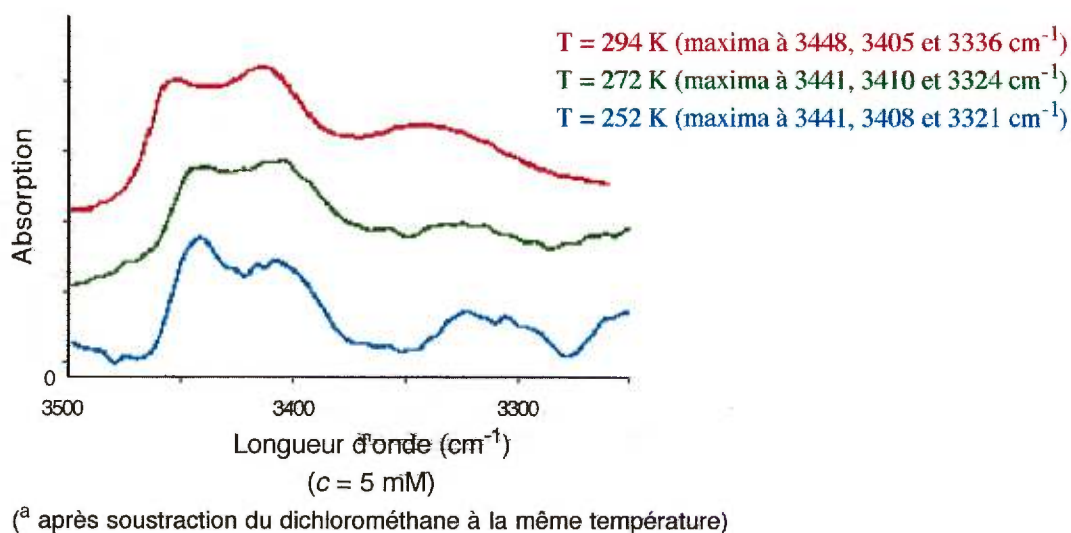


Figure 14. Effets de température sur la fréquence d'absorption des bandes des liaisons N-H amides en IR-TF du (3*S*, 6*S*, 9*S*)-Ac-AAI-NHMe (12) dans le dichlorométhane.^a



(figure 3) mais pourrait résulter de conformations de repliement de type β ou γ .

La figure 14 décrit le graphe où sont représentées les absorptions des bandes des liaisons N-H amides de l'amide **12** en fonction de la longueur d'onde exprimée en cm^{-1} à la concentration de 5 mmol/ml avec des températures variables (294, 272 et 252 K) dans le dichlorométhane. Les spectres d'IR-TF indiquent toujours la présence de deux bandes d'absorption correspondantes aux liaisons N-H amides libres (~ 3441 et $\sim 3405 \text{ cm}^{-1}$) ainsi qu'une bande d'absorption correspondant aux liaisons N-H liées avec la variation de température. Cependant il y a une modification dans la répartition relative des trois bandes d'absorption entre elles. La bande d'absorption de la liaison NH amide liée augmente avec la baisse de température. Par contre la bande d'absorption de la liaison NH amide libre à $\sim 3410 \text{ cm}^{-1}$ diminue tandis que celle à $\sim 3441 \text{ cm}^{-1}$ augmente. Ces données indiquent donc un changement conformationnel avec la baisse de la température.

5.4.5 *Dichroïsme circulaire.*

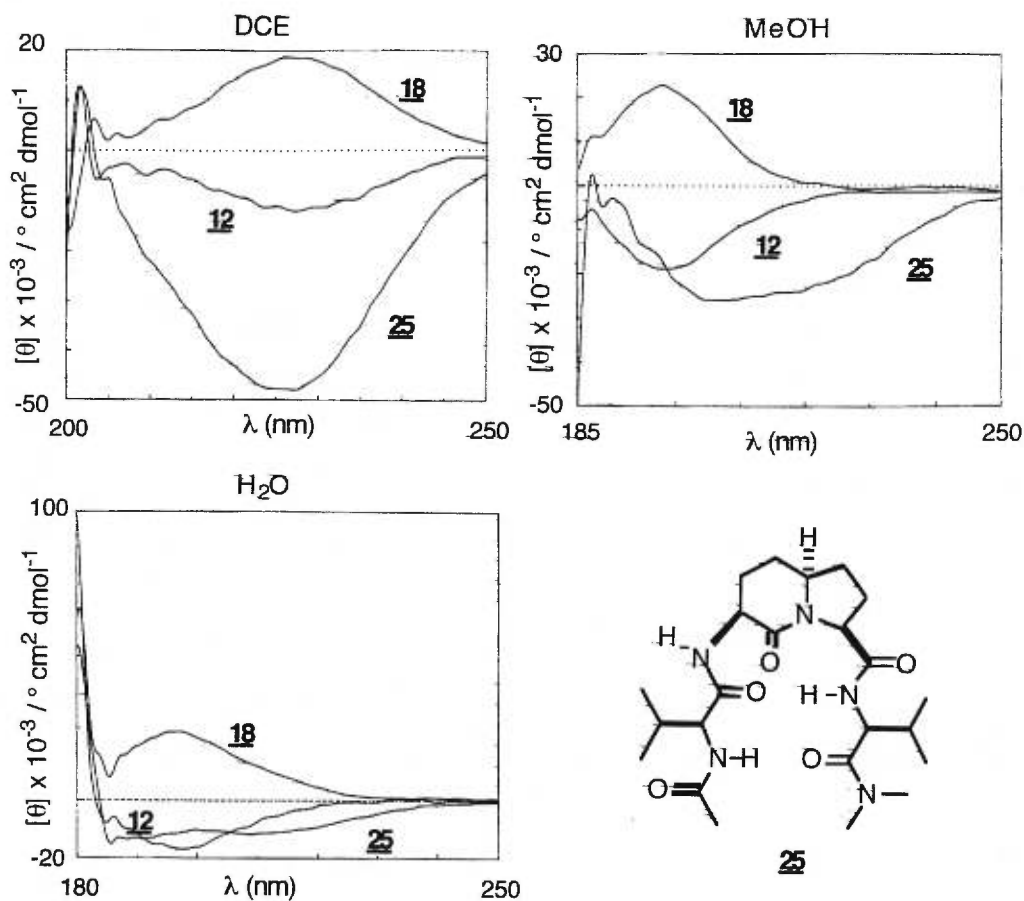
La spectroscopie de dichroïsme circulaire (DC) est une méthode largement utilisée pour l'étude et la détermination structurale des peptides de par sa haute sensibilité conformationnelle et la faible quantité d'échantillon requise. Le spectre de DC d'un peptide est principalement déterminé par l'arrangement spatial des chromophores (fonctions amides)

autours des centres stéréogènes (C α des acides aminés). Ainsi, un peptide choisi pour étudier ses propriétés conformationnelles par DC doit posséder un nombre correct de chromophores aussi bien qu'avoir un degré de rigidité conformationnelle.

La figure 15 décrit donc les spectres de dichroïsme circulaire des peptides modèles **12**, **18** et **25** enregistrés dans le dichloroéthane, le méthanol et l'eau. Malheureusement, ces spectres n'apportent aucune information concrète car ils ne présentent pas de courbes similaires à celles de références connues.³⁰ Il est à noter que ces spectres diffèrent de celui antipode d'un repliement β de type II, rapporté par Woody et basé sur des calculs théoriques.³¹

Trois explications peuvent être avancées: la première est que ces spectres traduisent l'absence d'une conformation spécifique présente dans ces peptides modèles. Compte tenue des résultats données par la RMN et l'IR, cette explication ne peut être retenue. La seconde est que ces spectres traduisent la présence d'une conformation de repliement γ . La troisième est que les composés retenus ne présentent pas de chromophores communs aux composés de référence. Cette troisième explication étant privilégiée, la synthèse d'un nouveau peptide incorporant des chromophores choisis a donc été envisagée avec la possibilité de se référer à un modèle connu.

Figure 15. Spectres de dichroïsme circulaire des peptides modèles (3*S*, 6*S*, 9*S*)-Ac-AAI-NHMe (**12**), (3*R*, 6*R*, 9*R*)-Ac-AAI-NHMe (**18**) et (3*S*, 6*S*, 9*S*)-Ac-Val-AAI-Val-N(Me)₂ (**25**) dans différents solvants.



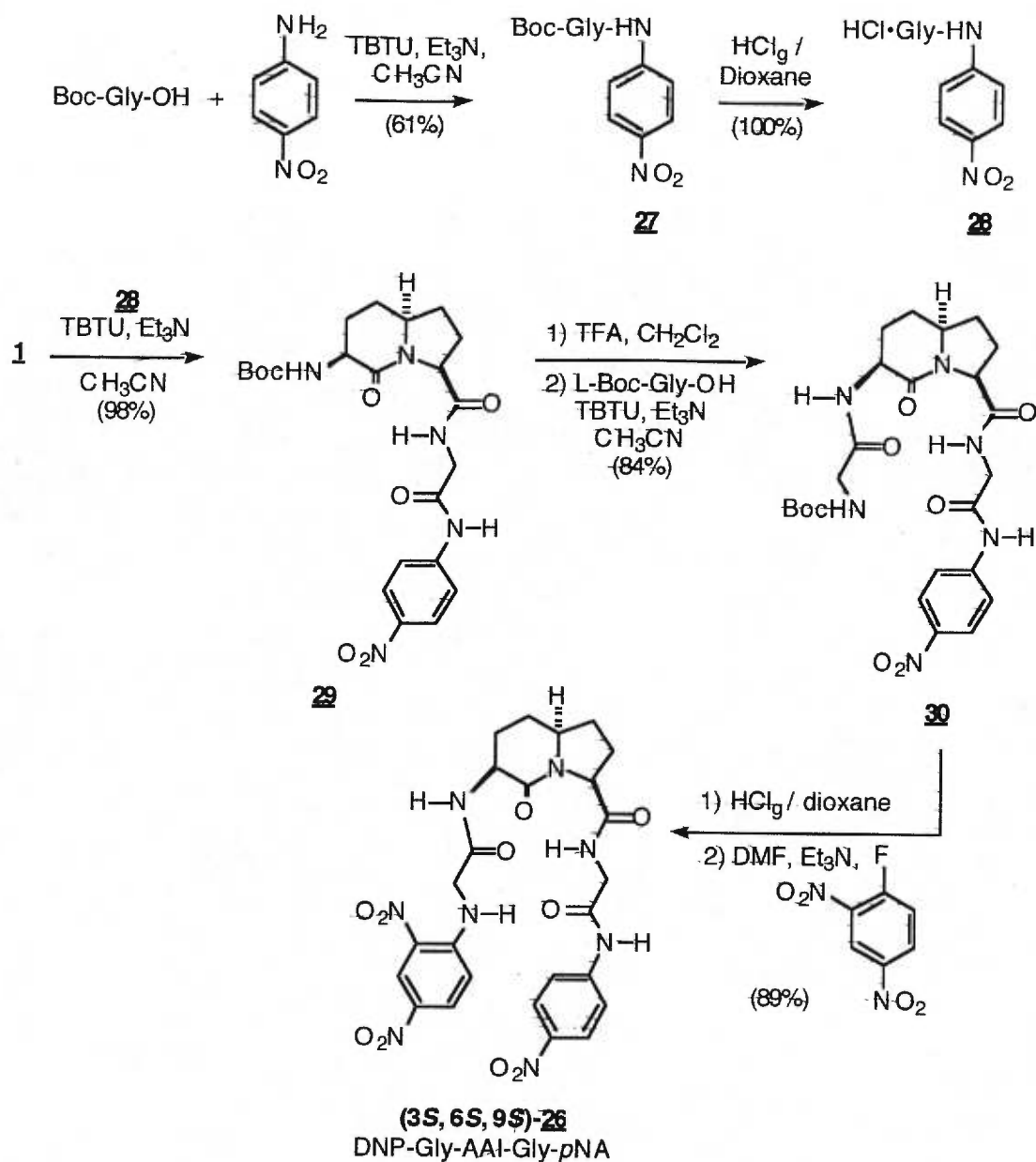
5.5 Le peptide modèle DNP-Gly-AAI-Gly-*p*NA.

Les résultats des spectres de dichroïsme circulaire avec les peptides modèles **12**, **18** et **25** ne permettant de tirer des conclusions sur la conformation induite par l'AAI, la synthèse et l'étude d'un nouveau peptide modèle ont été envisagées. Calquées sur les études faites par Nagai et Sato avec leur acide aminé thiaindolizidinone, la synthèse et l'étude d'un dérivé comportant des chromophores nitrophényles ont été entreprises.

5.5.1 Synthèse.

Le peptide (3*S*, 6*S*, 9*S*)-*N'*-*p*-nitrophényl 2-Oxo-3-(*N*-2,4-dinitrophényl-glycinamido)-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carbonylglycinamide ((3*S*, 6*S*, 9*S*)-DNP-Gly-AAI-Gly-*p*NA, **26**) a été synthétisé en cinq étapes avec un rendement global de 73% à partir du (3*S*, 6*S*, 9*S*)-Boc-AAI-OH (**1**) (schéma 3). La *N'*-*p*-nitrophényl *N*-(Boc)-glycinamide **27** a été synthétisée avec un rendement de 61% avec le couplage de la Boc-glycine et de la *p*-nitroaniline en présence de TBTU, de triéthylamine et dans l'acétonitrile. Son chlorhydrate **28** a été obtenu par déprotection du groupe Boc en présence d'une solution 4N d'acide chlorhydrique dans le dioxane. Le composé **29** a été obtenu en couplant le chlorhydrate **28** et le (3*S*, 6*S*, 9*S*)-Boc-AAI-OH (**1**) dans les mêmes conditions avec un rendement quantitatif.

Schéma 3. Synthèse du (3*S*, 6*S*, 9*S*)-*N'*-*p*-nitrophényl 2-Oxo-3-(*N*-2,4-dinitrophényl)glycinamido)-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carbonylglycinamide ((3*S*, 6*S*, 9*S*)-DNP-Gly-AAI-Gly-*p*NA, **26**).



La déprotection du groupe Boc en présence d'acide trifluoroacétique puis le couplage avec l'acide aminé Boc-glycine en utilisant les mêmes

conditions a conduit au composé **30** avec un rendement de 84%. La déprotection du groupe Boc avec l'acide chlorhydrique puis réaction avec le 2,4-dinitrofluorobenzène en présence de triéthylamine³² a conduit au peptide modèle désiré **26** avec un bon rendement.

Avec ce peptide modèle obtenu, une comparaison avec les exemples rapportés dans la littérature a été faite en utilisant les analyses de dichroïsme circulaire.

5.5.5 *Dichroïsme circulaire.*

Les tétrapeptides linéaires du type DNP-tétrapeptide-*p*NA présentent des spectres de dichroïsme circulaire caractéristiques à partir de 250 nm, et les effets Cotton sont considérés comme dû aux interactions des deux chromophores terminaux. L'amplitude des effets Cotton vers 310 et 350 nm reflète la préférence de la conformation de repliement β de ces peptides.³³ Cette méthode d'analyse a montré que les composés du type DNP-Gly-X-Y-Gly-*p*NA, où X est un acide aminé D tel D-Ala et Y un résidu L-Pro, présentent des conformations de repliement β .

Les figures 16 et 17 présentent respectivement les spectres de dichroïsme circulaire des peptides de référence **31a**⁷ / **31b**³⁴ et le peptide modèle **26** enregistrés dans le méthanol.

Figure 16. Spectres de dichroïsme circulaire des peptides de référence dans le méthanol.^{33,7}

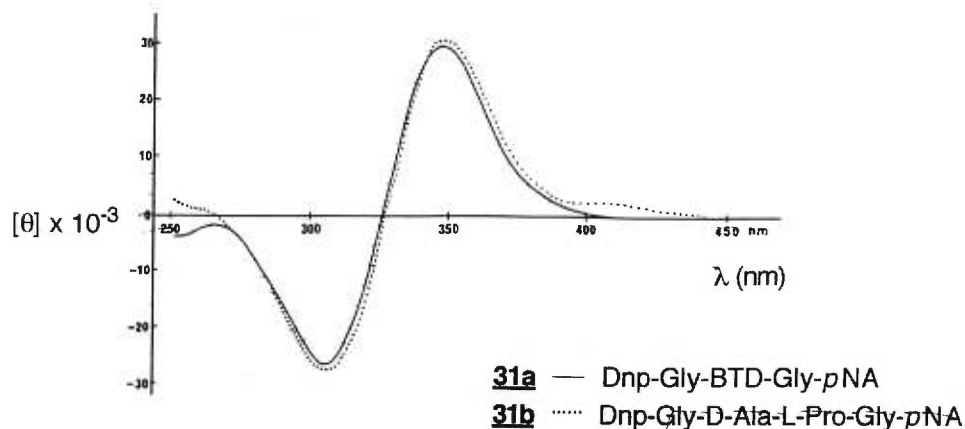
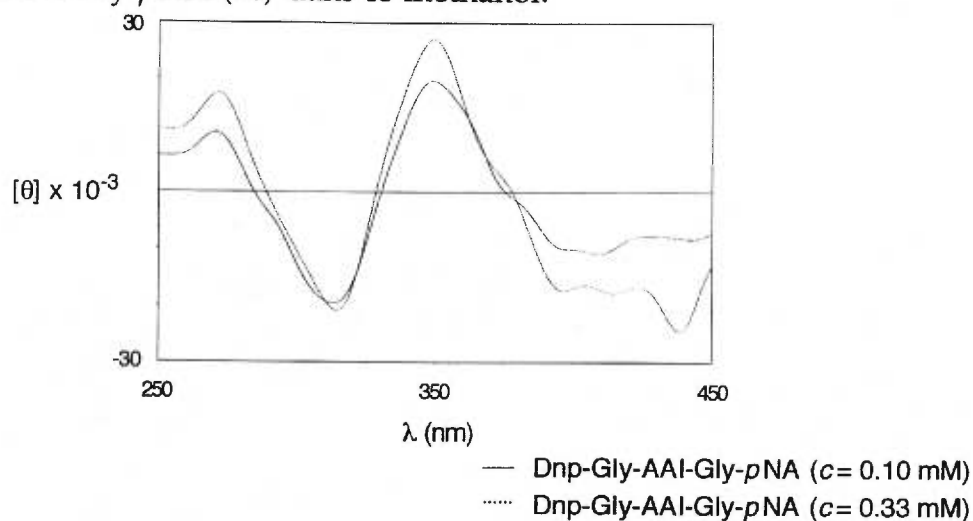


Figure 17. Spectres de dichroïsme circulaire du peptide (3*S*, 6*S*, 9*S*)-DNP-Gly-AAI-Gly-pNA (**26**) dans le méthanol.

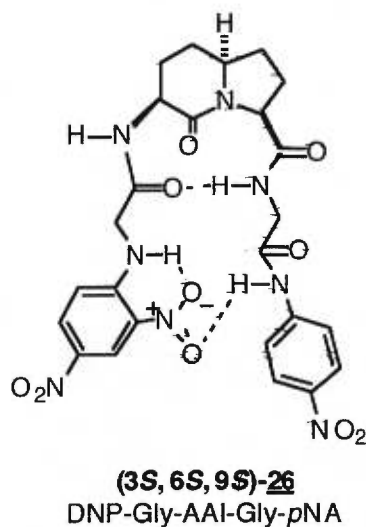


Le peptide **26** présente des spectres de dichroïsme circulaire très similaires à ceux des peptides de référence **31a** et **31b** qui sont connus pour présenter des conformations de repliement β de type II'. Ils présentent tous une bande positive vers 350 nm et une bande négative vers 305 nm pour les peptides de référence **31** ou 310 nm pour le peptide **26**. Les

similarités entre les spectres de référence et du peptide **26** suggèrent que les peptides présentent le même type de conformation, un repliement β de type II'.

Cependant l'introduction de ces deux types de chromophores nitrophénylés amplifie la préférence intrinsèque du peptide à former un repliement β de type II'. Cette amplification pourrait s'expliquer par la formation d'une liaison hydrogène entre le proton amide *p*NA et le groupe nitro en position 2 du DNP, associé à des interactions de type électrostatique entre les phényles (figure 18).³⁵

Figure 18.



Ce pont hydrogène peut alors jouer le rôle d'un facteur externe, favorisant ainsi la formation d'une conformation de repliement β de type II'.

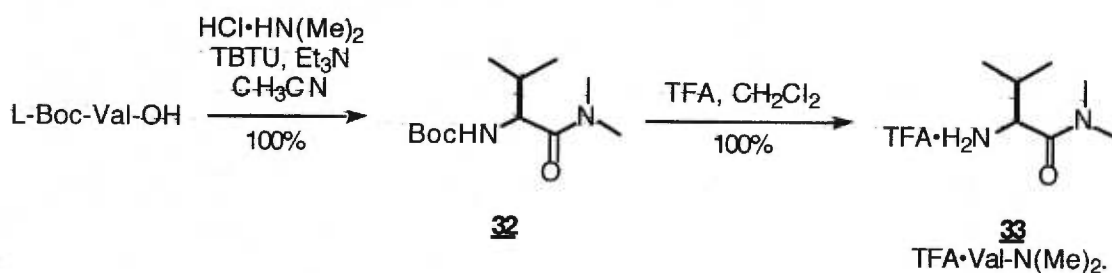
5.6 Le peptide modèle Ac-Val-AAI-Val-N(Me)₂.

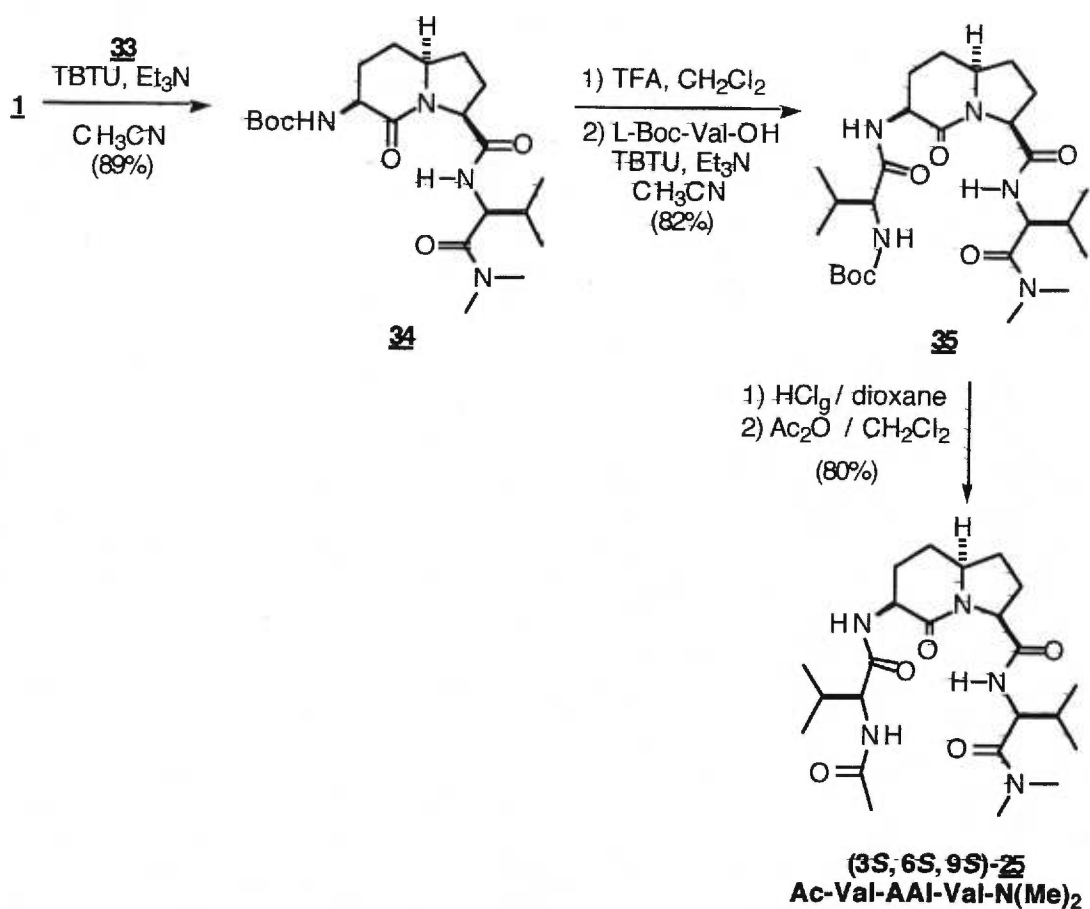
Parallèlement aux études effectuées avec les amides modèles **12** et **21**, un système plus complexe a été choisi avec l'introduction de deux acides aminés valine, formant ainsi un térapeptide.

6.5.1 Synthèse.

Le peptide modèle (3*S*, 6*S*, 9*S*)-*N*',*N*'-diméthyl 2-oxo-3-(*N*-acétyl-L-valinamido)-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carbonyl-L-valinamide ((3*S*, 6*S*, 9*S*)-Ac-Val-IAA-Val-N(Me)₂, **25**) a été synthétisé en cinq étapes avec un rendement global de 58% à partir du (3*S*, 6*S*, 9*S*)-Boc-AAI-OH (**1**) (schéma 4).

Schéma 4. Synthèse du (3*S*, 6*S*, 9*S*)-*N*',*N*'-diméthyl 2-oxo-3-(*N*-acétyl-L-valinamido)-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carbonyl-L-valinamide ((3*S*, 6*S*, 9*S*)-Ac-Val-IAA-Val-N(Me)₂, **25**).

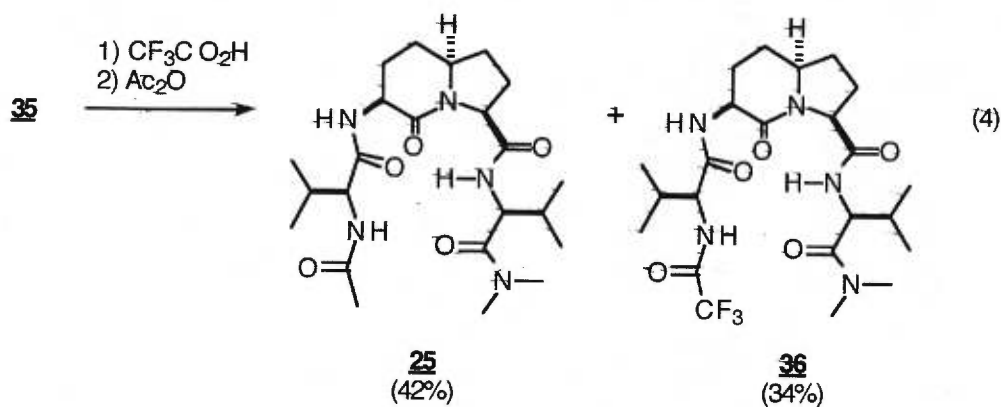




Le sel de trifluoroacétate de la *N,N'*-diméthyl L-valinamide **33** a été synthétisé en deux étapes avec un rendement quantitatif en utilisant les mêmes conditions de couplage (TBTU, triéthylamine, acétonitrile) entre la Boc-L-valine et la diméthylamine, puis déprotection du groupe Boc en présence d'acide trifluoroacétique. Le composé **34** a été obtenu en couplant le sel de trifluoroacétate **33** et le (3*S*, 6*S*, 9*S*)-Boc-AAI-OH (**1**) dans les mêmes conditions avec un rendement de 89%. Le deuxième acide aminé valine du composé **35** a été introduit à partir de **34** et de la Boc-valine en utilisant les mêmes conditions de déprotection / couplage avec un rendement de 84%. La déprotection du groupe Boc, en utilisant cette fois

une solution 4N d'acide chlorhydrique dans le dioxane, puis acétylation avec l'anhydride acétique, a conduit au térapeptide désiré (3*S*, 6*S*, 9*S*)-Ac-Val-AAI-Val-N(Me)₂ (**25**). Les assignations de tous les protons et carbones ont été faites grâce aux spectres RMN 2-dimension COSY et HMQC.

De la même manière que lors de la synthèse du peptide modèle **12**, l'acétylation du sel trifluoroacétate dérivé de **35** a conduit à un mélange (1.2 pour 1) de deux produits, le peptide désiré **25** et le peptide trifluoroacétylé **36** (équation 4).



Avec ce peptide modèle plus complexe, des analyses conformationnelles ont été entreprises en utilisant les techniques de modélisation moléculaire, de RMN, d'IR-TF et de dichroïsme circulaire, en suivant les exemples précédents.

5.6.2 Modélisation moléculaire.

Le térapeptide modèle **25** a été étudié en utilisant les mêmes techniques de modélisation moléculaire décrites pour les Ac-AAI-NHMe. Le champs de force OPLS-AMBER³⁶ a été utilisé avec le chloroforme comme modèle de solvation. Le tableau 5 présente un résumé des résultats de modélisation du peptide **25**. Il est à associer avec la figure 19 qui représente les minima des conformations de repliements γ et β pour le térapeptide.

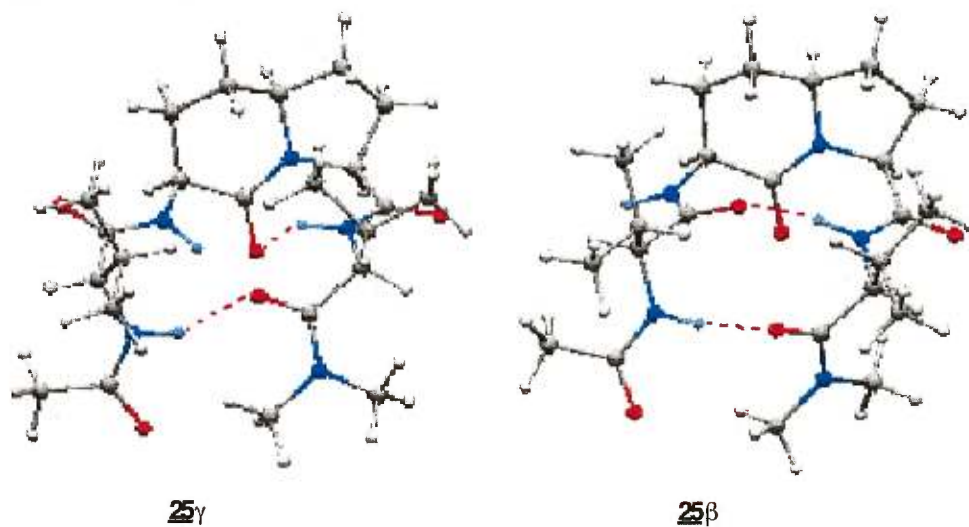
Tableau 5. Analyses conformationnelles du peptide Ac-Val-AAI-Val-N(Me)₂ (**25**), en utilisant le chloroforme comme modèle de solvation et le champs de force OPLS/ AMBER.

no. de conformations de basse énergie	no. (%) du rep. β	no. (%) du rep. γ	conformère (no.)	E_{total} (KJ/mol)	ϕ_2	ψ_2	ϕ_3	ψ_3	liaison H (d. Å)	$^3J_{H-H}$ (Hz)
427	39 (9)	273 (64)	25 γ (2)	-522.6	-157.9	-123.1	-75.4	38.9	1.9 et 1.8	4.4
	type II'	type γ^I	25 β (23)	-492.1	45.4	-120.0	-62.5	-7.1	1.8 et 1.8	6.9
Valeurs théoriques des angles de torsion pour:		- un repliement β de type II'			60	-120	-80	0		
		- un repliement γ de type inverse					-80	80		

Les résultats des analyses indiquent que **25** peut adopter des conformations de repliement γ et β . Trois points importants sont à noter. Tout d'abord, une plus grande complexité de ce système se traduit par une grande quantité de conformations générées. Deuxièmement, parmi les minima, la structure de repliement γ , (**25** γ , figure 19) est largement majoritaire (64%) et est prédite comme étant de plus basse énergie que la conformation de repliement β (9%) (**25** β , figure 19). Cette conformation de

repliement γ n'est cependant pas prédite comme la conformation de plus basse énergie. Finalement, dans les deux cas, un pont hydrogène terminal pourrait être présent.

Figure 19. Représentation des minima des conformations de repliements γ et β pour le peptide modèle (3*S*, 6*S*, 9*S*)-Ac-Val-AAI-Val-N(Me)₂ (**25**) (avec le chloroforme comme modèle de solvation et OPLS/AMBER comme champs de force).



5.6.3 Études RMN.

La figure 20 décrit le graphe où sont représentés les déplacements chimiques, exprimés en ppm, des protons amides du peptide modèle 25 en fonction de la température avec une concentration de 17.5 mmol/ml dans le dichlorométhane. Il est à associer avec le tableau 6 qui présente les valeurs des coefficients de pente $\Delta(\delta\text{NH})/\Delta(T)$ en fonction de la concentration pour les protons amides de 25, enregistrés dans le dichlorométhane.

Ce graphe montre une rupture très nette, à une température d'environ 230 K, de la variation des déplacements chimiques pour les protons amides N-H_{AAI} (figuré en rouge) et N-HCOCH₃ (figuré en bleu). Par contre, les déplacements chimiques du proton valine diméthylamide (N-H_{Val}, figuré en vert) sont relativement indépendants de la variation de température relativement aux autres protons amide et en particulier le proton N-H_{AAI}. En outre, ce graphe indique que les déplacements chimiques du proton amide N-H_{AAI} augmentent fortement avec la diminution de la température. Le coefficient de température $\Delta(\delta\text{NH})/\Delta(T)$ du proton amide N-H_{AAI} ($-11.48 \cdot 10^{-3}$ ppm/K sur la région 233-298 K) suggère un proton libre. Ce graphe montre également que les déplacements chimiques du proton amide N-HCOCH₃ sont relativement indépendants de la variation de température relativement au N-H_{AAI}. Le coefficient de température $\Delta(\delta\text{NH})/\Delta(T)$ du proton amide N-HCOCH₃ ($-3.16 \cdot 10^{-3}$ ppm/K, sur la région 233-298 K) pourrait suggérer la présence d'une liaison hydrogène. Le coefficient de température $\Delta(\delta\text{NH})/\Delta(T)$ du

Figure 20. Effets de la température sur les déplacements chimiques des protons amides du peptide (3*S*, 6*S*, 9*S*)-Ac-Val-AAI-Val-N(Me)₂ (**25**) dans le dichlorométhane.

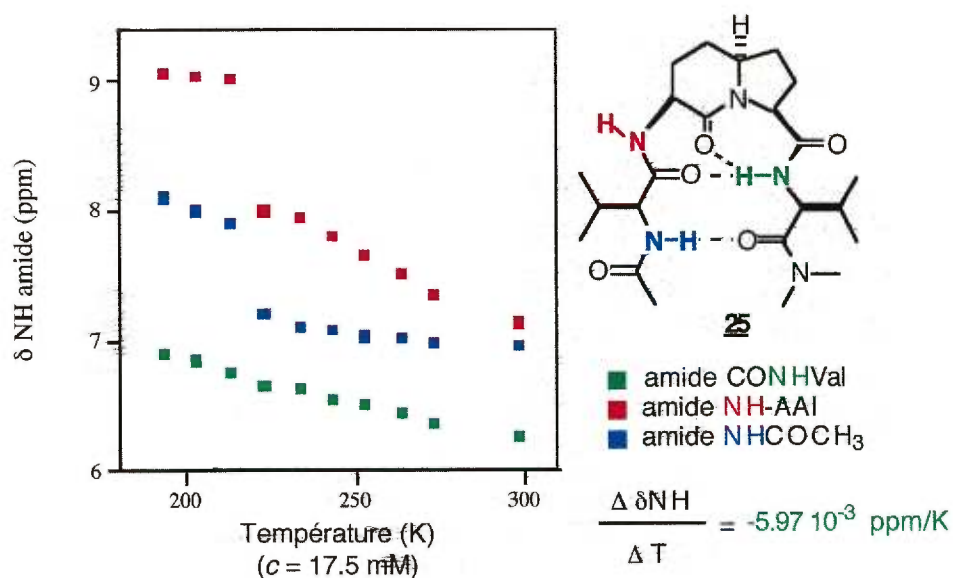
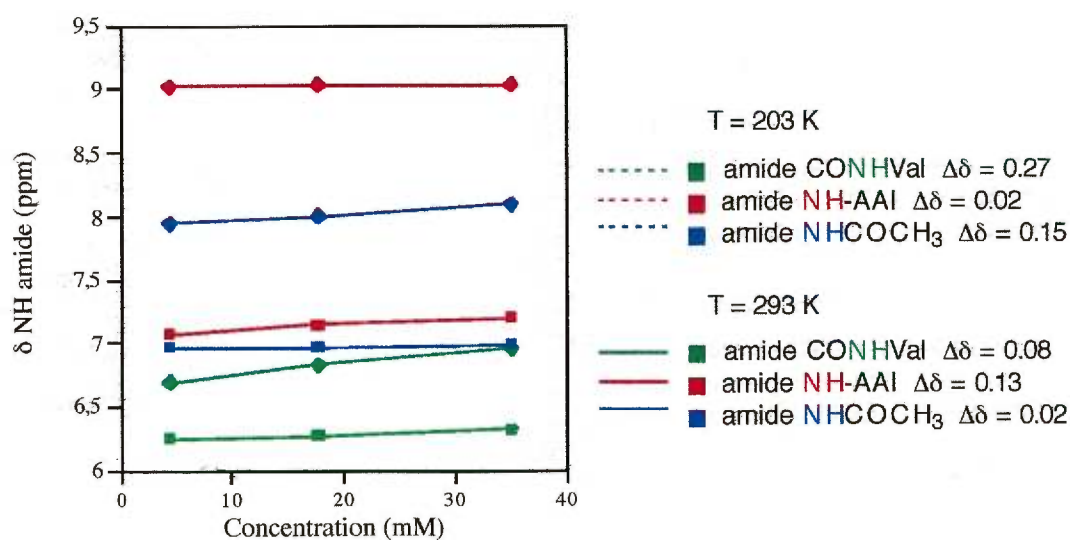


Figure 21. Effets de la concentration sur les déplacements chimiques des protons amides du peptide (3*S*, 6*S*, 9*S*)-Ac-Val-AAI-Val-N(Me)₂ (**25**) dans le dichlorométhane.



proton amide N-H_{Val} est de $-5.97 \cdot 10^{-3}$ ppm/K sur la région 193-298 K, ou de $-5.21 \cdot 10^{-3}$ ppm/K sur la région 233-298 K. Ces trois dernières valeurs sont d'un ordre de grandeur relativement élevé pour des protons amides impliqués dans une liaison hydrogène. Ces résultats tendraient à indiquer un effet d'agrégation plutôt que la présence de liaison hydrogène. Une autre possibilité pourrait être la présence d'une conformation qui serait ni de repliement γ ni de repliement β .

Tableau 6. Variation des coefficients de température des protons amides du peptide (3S, 6S, 9S)-Ac-Val-AAI-Val-N(Me)₂ (25) en fonction de la concentration.

Concentration (mM, CD ₂ Cl ₂)	$\Delta \delta_{\text{NH}} / \Delta T$ CONHVal ($\cdot 10^{-3}$ ppm / K)	$\Delta \delta_{\text{NH}} / \Delta T$ NHCOCH ₃ ($\cdot 10^{-3}$ ppm / K)	$\Delta \delta_{\text{NH}} / \Delta T$ NH-AAI ($\cdot 10^{-3}$ ppm / K)
4.4	4.63	0.95	10.08
17.5	5.21	3.16	11.48
33	5.19	3.54	14.05

(Les coefficients sont calculés sur la région 233-298 K)

A plus faible concentration (4.4 mM), il est important de noter que les coefficients de température $\Delta(\delta_{\text{NH}})/\Delta(T)$ du proton amide N-H_{COMe} ($-0.95 \cdot 10^{-3}$ ppm/K sur la région 193-298 K) est beaucoup plus faible, et pourrait définir la présence d'une liaison hydrogène. Les variations des coefficients de température avec la concentration suggèrent un effet d'agrégation (tableau 6).

La figure 21 décrit le graphe où sont représentés les déplacements chimiques exprimés en ppm des protons amides de **25** en fonction de la concentration exprimée en mmole/ml aux températures de 293 K et 203 K dans le dichlorométhane.

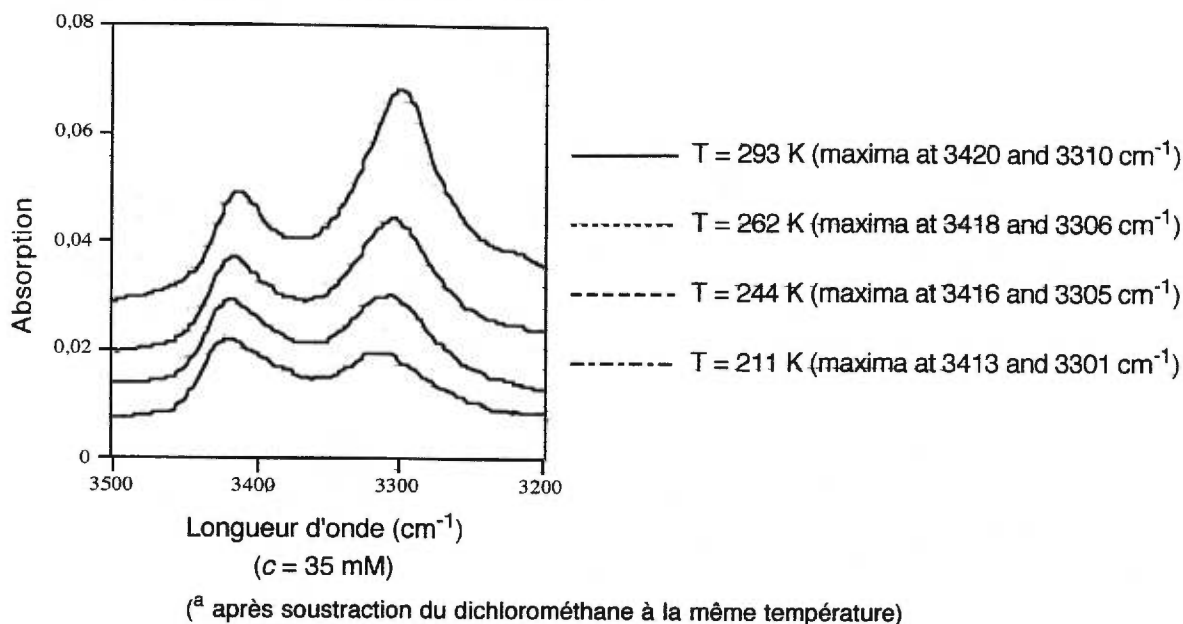
Ce graphe indique que les déplacements chimiques des protons amides sont peu dépendants de la concentration. Par contre la température semble avoir un petit effet sur les protons liés ($\Delta\delta = 0.27$ et 0.15 à 203 K pour les protons amides N-H_{VAl} et N-H_{COMe} respectivement).

Ainsi, le peptide modèle **25** semble présenter, sur la région 233 - 298 K, un proton amide libre, N-H_{AAI} et un proton amide impliqué dans un pont hydrogène, N-H_{COCH₃} (ceci est en accord avec les résultats de modélisation moléculaires). Au delà de 230 K, un changement conformationnel majeur semble s'opérer vers 230 K.

5.6.4 Études IR.

La figure 22 décrit le graphe où est représentée l'absorption des bandes des liaisons N-H amides du peptide modèle **25** en fonction de la longueur d'onde exprimée en cm^{-1} à la concentration de 35 mmol/ml et à des températures variables (293, 262, 244, et 211 K) dans le dichlorométhane.

Figure 22. Effets de la température sur la fréquence d'absorption des bandes des liaisons N-H amides en IR-TF du peptide (3*S*, 6*S*, 9*S*)-Ac-Val-AAI-Val-N(Me)₂ (**25**) dans le dichlorométhane.^a



Les spectres d'IR-TF indiquent donc deux bandes d'absorption, l'une correspondante aux liaisons N-H amides libres ($\sim 3420 \text{ cm}^{-1}$) et l'autre plus importante correspondante aux liaisons N-H amides liées ($\sim 3310 \text{ cm}^{-1}$). Avec la diminution de température, il y a une modification dans la

répartition des deux bandes d'absorption. La bande d'absorption des liaisons N-H amides libres augmente avec la baisse de température et la bande d'absorption des liaisons N-H amides liées diminue. Ceci va dans le même sens des études de basse température effectuées par RMN et il semblerait que ces données indiquent un effet d'agrégation.

5.6.5 *Dichroïsme circulaire.*

Les spectres de dichroïsme circulaire du peptide modèle **25**, enregistrés dans le dichloroéthane, le méthanol et l'eau, sont décrits sur la figure 13. Comme dans le cas des amides modèles **12** et **18**, ces spectres n'apportent aucune information concrète car ils ne présentent pas de courbes similaires à celles de références connues.³⁰ Étant donné que le composé **25** est un peptide modèle, des investigations plus poussées pour déterminer sa conformation n'ont pas été poursuivies mais les efforts ont été placés dans la synthèse et l'étude d'un peptide biologiquement actif, la gramicidine S.

5.7 Conclusion partielle.

Les études sur l'amide modèle Ac-AAI-NHMe (12) ont montré que ce peptide induit bien une conformation présentant une liaison hydrogène dans le dichlorométhane. Cette conformation générée, au regard des résultats de modélisation moléculaire, serait plutôt du type γ . Dans un solvant plus polaire, cette liaison hydrogène est désorganisée entraînant une modification de l'équilibre conformationnel. Par contre, l'introduction de chromophores spécifiques dans le peptide modèle 26 entraîne la formation d'une conformation de repliement β bien définie. L'hypothèse avancée serait que l'AAI, sous l'action d'une contrainte externe, telle que la basse température ou l'introduction de chromophores spécifiques, est capable de stabiliser une conformation définie qui pourrait être de repliement β .

Par contre les résultats obtenus avec le tripeptide modèle sont beaucoup moins clairs et apportent plus de problèmes qu'ils n'en résolvent.

Il reste cependant que les résultats sont suffisamment encourageants pour suivre cette étude avec l'incorporation de l'AAI dans un système biologique.

5.8 Partie expérimentale.

General: Experimental protocols were conducted as described in the general section of Chapter 3. Amino acid signals were assigned according to the examples presented in "Tabellen zur strukturaufklärung organischer verbindungen mit spektroskopischen methoden", Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1981. Analytical HPLC was performed on an reverse phase column Prep DeltaPak HR C-18 (6 mm, 60 Å, 8 x 100 mm) with an reverse phase precolumn Prep NovaPak HR C-18 (6 mm 60 Å) eluting with a linear gradient of 90:10:0.01 to 0:100:0.01 (v/v) H₂O:CH₃CN:TFA over 30 min with a flow rate of 1.5 mL min⁻¹ and detection at 220 nm. Low-temperature ¹H NMR experiments were performed on a Bruker ARX-400 using methylene-d₂ chloride (99.9%), chloroform-d (99.9%) or dimethylsulfoxide-d₆ (99.9%) purchased from Cambridge Isotope Laboratories.

General procedure A: TBTU coupling.²¹

To a solution of acid (0.13 mmol, 100 mol %) in acetonitrile (1 mL) at room temperature was added the amine (0.14 mmol, 110 mol %) followed by triethylamine (0.27 mmol, 220 mol %) and benzotriazol-1-yl-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate (TBTU, 0.14 mmol, 110 mol %). The mixture was stirred at room temperature for 12 h or until TLC analysis showed complete consumption of starting material. The reaction mixture was diluted with brine (3 mL) and extracted with ethyl acetate (3 x

2 mL). The combined organic layers were washed with 2 N HCl (0.2 mL), H₂O (0.2 mL), 5% NaHCO₃ (0.2 mL) and H₂O (0.2 mL), dried and concentrated *in vacuo*. The crude mixture was purified by flash chromatography.

General procedure B: TFA deprotection.

A stirred solution of Boc-protected compound (0.10 mmol) in dichloromethane (2 mL) was treated with TFA (1 mL) at room temperature for 15 min when TLC analysis showed complete consumption of starting material. The crude mixture was concentrated *in vacuo* to give a white precipitate which was used directly in the next reaction.

General procedure C: HCl deprotection.

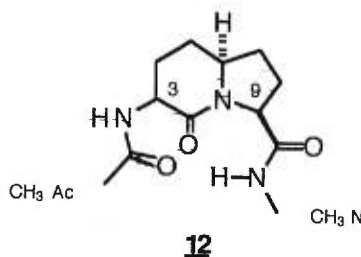
To a stirred solution of Boc-protected compound (0.30 mmol) in dioxane (2 mL) at room temperature was bubbled a stream of HCl gas for 15 min at which point TLC analysis showed complete consumption of starting material. The crude mixture was concentrated *in vacuo* to afford a white precipitate which was used directly in the next reaction.

General procedure D: Acetamide formation.

Acetic anhydride (1 mL) was added to a solution of amine salt (0.11 mmol) in dichloromethane (1 mL). The mixture was stirred at room temperature for 12 h or until TLC analysis showed complete consumption of the starting amine. The crude mixture was concentrated *in vacuo* and the residue was purified by HPLC on a preparative reverse-phase column

NovaPak HR C-18 (6 mm, 60 Å, 25 x 100 mm) equipped with a Prep NovaPak HR C-18 precolumn (6 µm 60 Å) eluting with a linear gradient of 90:10:0.01 to 0:100:0.01 (v/v) H₂O:CH₃CN:TFA over 30 min with a flow rate of 10 mL min⁻¹ and detection at 220 nm to afford the desired compound.

Synthesis of *N'*-Methyl 2-Oxo-3-acetamido-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide ((3*S*, 6*S*, 9*S*)-Ac-IAA-NHMe, 12).



(3*S*, 6*S*, 9*S*)-*N'*-Methyl 2-Oxo-3-*N*-(Boc)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide ((3*S*, 6*S*, 9*S*)-Boc-IAA-NHMe, 13), by general procedure A. General procedure A was followed using (3*S*, 6*S*, 9*S*)-Boc-IAA-OH (1, 40 mg, 0.13 mmol, 100 mol %), methylamine hydrochloride (10 mg, 0.143 mmol, 110 mol %), TBTU (46 mg, 0.143 mmol, 110 mol %) and triethylamine (38 μ L, 0.273 mmol, 220 mol %) in acetonitrile (1 mL). Flash column chromatography, using a gradient of 0 to 10% MeOH in EtOAc as eluant, and evaporation of the collected fractions yielded the desired amide 13 as a white solid.

(3*S*, 6*S*, 9*S*)-Boc-IAA-NHMe (13, 39.9 mg, 96%): $R_f = 0.48$ (5:1 EtOAc:MeOH); $[\alpha]_D^{20} -63.2^\circ$ (c 0.8, CHCl₃); ¹H NMR δ 1.45 (s, 9 H, CH₃ Boc), 1.54-1.62 (m, 2 H, CH₂ IAA-4,5), 1.75 (m, 1 H, CH₂ IAA-7), 1.87 (m, 1 H, CH₂ IAA-8), 2.07 (m, 1 H, CH₂ IAA-5), 2.12 (m, 1 H, CH₂ IAA-7), 2.40-2.50 (m, 2 H, CH₂ IAA-8,4), 2.78 (d, 3 H, $J = 4.7$ Hz, CH₃ N), 3.62 (m, 1 H, CH IAA-6), 4.13 (m, 1 H, CH IAA-3) 4.44 (d, 1 H, $J = 8.1$ Hz, CH IAA-9), 5.48 (d br, 1 H, $J = 5.6$ Hz, NH Boc), 7.11 (s br, 1 H, NH N); ¹³C NMR δ 26.3 (CH₃ N), 26.5 (CH₂ IAA-C5), 27.0 (CH₂ IAA-C4), 27.8 (CH₂ IAA-C8), 28.3 (CH₃ Boc), 32.4 (CH₂ IAA-C7), 50.2 (CH IAA-C3), 57.0 (CH IAA-C6), 59.6 (CH IAA-C9), 79.7 (C_q Boc), 155.7 (CO

Boc), 170.7 (CO_{IAA-N}), 171.2 (CO_{IAA-C3}); HRMS calcd for C₁₅H₂₆N₃O₄ (MH⁺) 312.1923, found 312.1939.

(3*S*, 6*S*, 9*S*)-*N*'-Methyl 2-Oxo-3-*N*-(Boc)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide ((3*S*, 6*S*, 9*S*)-Boc-IAA-NHMe, 13), via methyl ester 14.²³ To a suspension of methyl amine hydrochloride (135 mg, 2 mmol) in dry benzene at 0 °C, was slowly added trimethyl aluminum (2M in toluene, 1 mL). After the addition was complete, the reaction mixture was allowed to warm to room temperature and was stirred for 2 h until gas evolution had ceased to give the aluminium reagent MeAlClNHMe. The resulting solution (0.6 mL) was added to a solution of (3*S*, 6*S*, 9*S*)-*N*-Boc-IAA-OMe (14, 61 mg, 0.19 mmol, 100 mol %) in dichloromethane (2 mL) and the resultant mixture was stirred for 12 h at room temperature and then for 12 h at reflux. The reaction mixture was cooled to room temperature and quenched with 5% aqueous HCl (10 mL). The aqueous phase was extracted with EtOAc (3 × 5 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried, and evaporated to yield an oil that was then chromatographed on silica gel using a gradient of 0 to 5% MeOH in EtOAc as eluant. The first compound to be eluted was the starting methyl ester 14 (17 mg, 29%; R_f = 0.71 (10:1 EtOAc:MeOH)) followed by the amide 13 (25 mg, 37% (51%); R_f = 0.24 (10:1 EtOAc:MeOH)).

(3*S*, 6*S*, 9*S*)-*N*'-Methyl 2-Oxo-3-amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide Hydrochloride ((3*S*, 6*S*, 9*S*)-HCl•IAA-NHMe, 13a). General procedure C was followed using (3*S*, 6*S*, 9*S*)-Boc-IAA-NHMe (13, 35 mg,

0.11 mmol) and gave the desired salt **13a** which was used directly in the next reaction.

(3*S*, 6*S*, 9*S*)-HCl•IAA-NHMe (**13a**, 27 mg, 100%): $R_f = 0.14$ (4:1:1 *n*-BuOH:AcOH:H₂O); ¹H NMR δ 1.65-1.83 (m, 3 H, CH₂ IAA-4,5,7), 1.95 (m, 1 H, CH₂ IAA-8), 2.00-2.15 (m, 4 H, CH₂ IAA-4,5,7,8), 2.70 (d, 3 H, $J = 4.8$ Hz, CH₃ N), 3.65 (m, 1 H, CH IAA-6), 4.30 (m, 1 H, CH IAA-3), 4.40 (m, 1 H, CH IAA-9), 7.95 (s br, 1 H, NH N), 8.32 (s br, 2 H, NH₂); ¹H NMR (CD₃OD) δ 1.75-1.85 (m, 2 H, CH₂ IAA-4,7), 1.90-2.03 (m, 2 H, CH₂ IAA-5,8), 2.11-2.25 (m, 3 H, CH₂ IAA-5,7,8), 2.38 (m, 1 H, CH₂ IAA-4), 2.75 (s, 3 H, CH₃ N), 3.78 (m, 1 H, CH IAA-6), 3.98 (m, 1 H, CH IAA-3), 4.40 (d, 1 H, $J = 4.5$ Hz, CH IAA-9); ¹³C NMR (CD₃OD) δ 27.0 (CH₂ IAA-C5), 27.7 (CH₃ N), 28.3 (CH₂ IAA-C4), 32.1 (CH₂ IAA-C8), 34.0 (CH₂ IAA-C7), 50.9 (CH₂ IAA-C3), 60.4 (CH₂ IAA-C6), 62.3 (CH₂ IAA-C9), 168.5 (CO IAA-N), 175.2 (CO IAA-C3).

(3*S*, 6*S*, 9*S*)-*N'*-Methyl 2-oxo-3-amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide Trifluoroacetate ((3*S*, 6*S*, 9*S*)-CF₃CO₂H•IAA-NHMe, **13b).**

General procedure B was followed using (3*S*, 6*S*, 9*S*)-Boc-IAA-NHMe (**13**, 18 mg, 0.06 mmol) and gave the desired salt **13b** which was used directly in the next reaction.

(3*S*, 6*S*, 9*S*)-CF₃CO₂H•IAA-NHMe (**13b**, 19 mg, 100%): $R_f = 0.17$ (4:1:1 *n*-BuOH:AcOH:H₂O); ¹H NMR δ 1.76 (m, 3 H, CH₂ IAA-4,5,7), 2.00-2.20 (m, 4 H, CH₂ IAA-5,7,8,8), 2.40 (m, 1 H, CH₂ IAA-4), 2.72 (d, 3 H, $J = 4.7$ Hz, CH₃ N), 3.65 (m, 1 H, CH IAA-6), 3.95 (m, 1 H, CH IAA-3), 4.45 (m, 1 H, CH IAA-9), 7.32 (s br, 1 H, NH N-Me), 8.15 (s br, 2 H, NH₂).

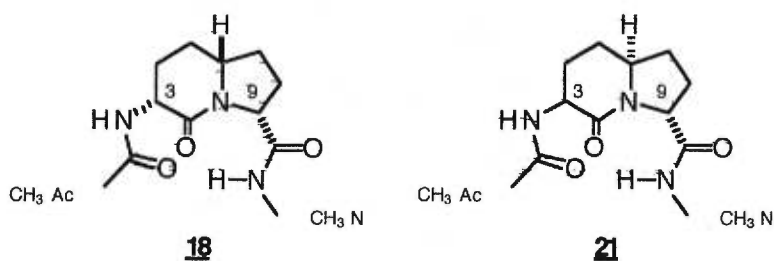
(3*S*, 6*S*, 9*S*)-*N*'-Methyl 2-Oxo-3-acetamido-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide ((3*S*, 6*S*, 9*S*)-Ac-IAA-NHMe, **12).** General procedure D was followed using hydrochloride **13a** (27 mg, 0.11 mmol) in dichloromethane (1 ml). HPLC purification yielded the desired acetamide **12**.

(3*S*, 6*S*, 9*S*)-Ac-IAA-NHMe (**12**, 27 mg, 85%): $R_f = 0.15$ (5:1 EtOAc:MeOH, using a solution of 5% sulfuric acid in ethanol as spray reagent); Retention time = 9.88; $[\alpha]_D^{20} -29.7^\circ$ (c 0.3, CHCl₃); ¹H NMR δ 1.53 (m, 1 H, CH₂ IAA-4), 1.62 (m, 1 H, CH₂ IAA-5), 1.80 (m, 1 H, CH₂ IAA-7), 1.94 (m, 1 H, CH₂ IAA-8), 2.04 (s, 3 H, CH₃ Ac), 2.10 (m, 1 H, CH₂ IAA-5) 2.18 (m, 1 H, CH₂ IAA-7), 2.45 (d, 1 H, $J = 4.8$ Hz, CH₂ IAA-8), 2.56 (m, 1 H, CH₂ IAA-4), 2.80 (d, 3 H, $J = 4.6$ Hz, CH₃ N), 3.67 (m, 1 H, CH IAA-6), 4.37 (m, 1 H, CH IAA-3), 4.43 (d, 1 H, $J = 8.0$ Hz, CH IAA-9), 6.57 (s br, 1 H, NH N-Me), 6.91 (s br, 1 H, NH N-C₃); ¹H NMR (CD₂Cl₂) δ 1.53 (m, 1 H, CH₂ IAA-4), 1.62 (m, 1 H, CH₂ IAA-5), 1.80 (m, 1 H, CH₂ IAA-7), 1.94 (m, 1 H, CH₂ IAA-8), 2.02 (s, 3 H, CH₃ Ac), 2.11 (m, 1 H, CH₂ IAA-5) 2.16 (m, 1 H, CH₂ IAA-7), 2.45 (d, 1 H, $J = 4.8$ Hz, CH₂ IAA-8), 2.55 (m, 1 H, CH₂ IAA-4), 2.75 (d, 3 H, $J = 4.7$ Hz, CH₃ N), 3.65 (m, 1 H, CH IAA-6), 4.32 (m, 1 H, CH IAA-3), 4.37 (d, 1 H, $J = 8.5$ Hz, CH IAA-9), 6.62 (s br, 1 H, NH N-Me), 6.77 (d, 1 H, ³ $J_{H-H} = 5.1$ Hz, NH N-C₃); ¹³C NMR δ 23.2 (CH₃ Ac), 26.4 (CH₃ N), 26.5 (CH₂ IAA-C₅), 26.6 (CH₂ IAA-C₄), 28.0 (CH₂ IAA-C₈), 32.4 (CH₂ IAA-C₇), 49.3 (CH₂ IAA-C₃), 57.0 (CH₂ IAA-C₆), 59.7 (CH₂ IAA-C₉), 170.1, 170.4, 171.1 (CO Ac 2 CO IAA); HRMS calcd for C₁₂H₂₀N₃O₃ (MH⁺) 254.1505, found 254.1521.

(3*S*, 6*S*, 9*S*)-*N*'-Methyl 2-Oxo-3-acetamido-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide ((3*S*, 6*S*, 9*S*)-Ac-IAA-NHMe, **12**) and (3*S*, 6*S*, 9*S*)-*N*'-Methyl 2-Oxo-3-trifluoroacetamido-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide ((3*S*, 6*S*, 9*S*)-CF₃CO-IAA-NHMe, **15**). General procedure D was followed using trifluoroacetate **13b** (19 mg, 0.06 mmol) in a solution of 1:2 acetic anhydride:dichloromethane (1.5 mL). The crude mixture was purified by flash column chromatography using an eluant of 5:1 EtOAc:MeOH. The first compound to be eluted was the trifluoroacetamido **15** (6.8 mg, 46%) followed by the acetamide **12** (6.1 mg, 42%).

(3*S*, 6*S*, 9*S*)-CF₃CO-IAA-NHMe (**15**): *R*_f = 0.5 (5:1 EtOAc:MeOH, using a solution of 5% sulfuric acid in ethanol as spray reagent); Retention time = 9.95 min; ¹H NMR δ 1.50-1.70 (m, 2 H, CH₂_{IAA-4,5}), 1.85 (m, 1 H, CH₂_{IAA-7}), 1.96 (m, 1 H, CH₂_{IAA-8}), 2.15-2.25 (m, 2 H, CH₂_{IAA-5,7}), 2.46 (m, 1 H, CH₂_{IAA-8}), 2.68 (m, 1 H, CH₂_{IAA-4}), 2.80 (d, 3 H, *J* = 4.7 Hz, CH₃_N), 3.70 (m, 1 H, CH_{IAA-6}), 4.36 (m, 1 H, CH_{IAA-3}), 4.43 (d, 1 H, *J* = 4.6, CH_{IAA-9}), 6.68 (s br, 1 H, NH_{N-Me}), 7.52 (s br, 1 H, NH_{N-C3}); ¹⁹F NMR δ -59.6 (CF₃; trifluoroacetic acid was used as ¹⁹F NMR reference).

Synthesis of diastereoisomers of *N*'-Methyl 2-Oxo-3-acetamido-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide.



(3R, 6R, 9R)-N'-Methyl 2-Oxo-3-N-(Boc)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide ((3R, 6R, 9R)-Boc-IAA-NHMe, 17). General procedure A was followed using (3R, 6R, 9R)-Boc-IAA-OH (16, 40 mg, 0.13 mmol, 100 mol %), methylamine hydrochloride (10 mg, 0.143 mmol, 110 mol %), TBTU (46 mg, 0.143 mmol, 110 mol %) and triethylamine (38 μ L, 0.273 mmol, 220 mol %) in acetonitrile (1 mL). Flash column chromatography, using a gradient of 0 to 10% MeOH in EtOAc as eluant, and evaporation of the collected fractions yielded the desired amide 17 as a solid.

(3R, 6R, 9R)-Boc-IAA-NHMe (17, 41 mg, 98%): $R_f = 0.48$ (5:1 EtOAc:MeOH); $R_f = 0.24$ (10:1 EtOAc:MeOH); $[\alpha]^{20}_D +63^\circ$ (c 0.8, CHCl₃); HRMS calcd for C₁₅H₂₆N₃O₄ (MH⁺) 312.1923, found 312.1936.

(3R, 6R, 9R)-N'-Methyl 2-Oxo-3-amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide Hydrochloride ((3R, 6R, 9R)-HCl•IAA-NHMe, 17a). General procedure C was followed using (3R, 6R, 9R)-Boc-IAA-NHMe (17, 40 mg, 0.13 mmol) to give the desired salt 17a which was used directly in the next reaction.

(3R, 6R, 9R)-HCl•IAA-NHMe (17a, 31 mg, 100%): $R_f = 0.14$ (4:1:1 *n*-BuOH:AcOH:H₂O).

(3R, 6R, 9R)-N'-Methyl 2-Oxo-3-acetamido-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide ((3R, 6R, 9R)-Ac-IAA-NHMe, 18). General procedure D was followed using hydrochloride 17a (31 mg, 0.13 mmol) in dichloromethane (1 ml). HPLC purification yielded the desired acetamide 18.

(3R, 6R, 9R)-Ac-IAA-NHMe (18, 18 mg, 55%): $R_f = 0.15$ (5:1 EtOAc:MeOH, using a solution of 5% sulfuric acid in ethanol as spray reagent); $[\alpha]^{20}_D$

+30.9° (*c* 0.4, CHCl₃); HRMS calcd for C₁₂H₂₀N₃O₃ (MH⁺) 254.1505, found 254.1525.

(3*S*, 6*S*, 9*R*)-*N*'-Methyl 2-Oxo-3-*N*-(Boc)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide ((3*S*, 6*S*, 9*R*)-Boc-IAA-NHMe, **20).** General procedure A was followed using (3*S*, 6*S*, 9*R*)-Boc-IAA-OH (**19**, 41 mg, 0.138 mmol, 100 mol %), methylamine hydrochloride (14 mg, 0.206 mmol, 150 mol %), TBTU (49 mg, 0.151 mmol, 110 mol %) and triethylamine (48 μL, 0.345 mmol, 250 mol %) in acetonitrile (1 mL). Flash column chromatography, using 5:1 CHCl₃:isopropanol as eluant, and evaporation of the collected fractions yielded the desired amide **20** as a solid.

(3*S*, 6*S*, 9*R*)-Boc-IAA-NHMe (**20**, 21 mg, 51%): *R*_f = 0.29 (5:1 EtOAc:MeOH); [α]_D²⁰ -18° (*c* 0.8, CHCl₃); ¹H NMR δ 1.45 (s, 9 H, CH₃ Boc), 1.64 (m, 1 H, CH₂ IAA-4), 1.75-2.00 (m, 4 H, CH₂ IAA-5,5,7,8), 2.07 (m, 1 H, CH₂ IAA-7), 2.15 (m, 1 H, CH₂ IAA-8), 2.35 (m, 1 H, CH₂ IAA-4), 2.77 (d, 3 H, *J* = 4.8 Hz, CH₃ N), 3.59 (m, 1 H, CH IAA-6), 3.93 (m, 1 H, CH IAA-3), 4.39 (d, 1 H, *J* = 8.1 Hz, CH IAA-9), 5.28 (d br, 1 H, *J* = 6.1 Hz, NH Boc), 6.6 (s br, 1 H, NH N); ¹³C NMR δ 26.2 (CH₃ N), 27.7 (CH₂ IAA-C5), 28.2 (CH₂ IAA-C4), 28.3 (CH₃ Boc), 28.9 (CH₂ IAA-C8), 31.8 (CH₂ IAA-C7), 52.2 (CH IAA-C3), 59.5 (CH IAA-C6), 61.2 (CH IAA-C9), 79.7 (C_q Boc), 155.8 (CO Boc), 169.4 (CO IAA-N), 171.8 (CO IAA-C3); HRMS calcd for C₁₅H₂₆N₃O₄ (MH⁺) 312.1923, found 312.1939.

(3*S*, 6*S*, 9*R*)-*N*'-Methyl 2-Oxo-3-amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide Hydrochloride ((3*S*, 6*S*, 9*R*)-HCl.IAA-NHMe, 20a). General procedure C was followed using (3*S*, 6*S*, 9*R*)-Boc-IAA-NHMe (20, 17 mg, 0.055 mmol) and gave the desired salt 20a which was used directly in the next reaction.

(3*S*, 6*S*, 9*R*)-HCl.IAA-NHMe (20a, 13 mg, 100%): $R_f = 0.11$ (4:1:1 *n*-BuOH:AcOH:H₂O); ¹H NMR (CD₃OD) δ 1.50-1.70 (m, 2 H, CH₂ IAA-4,7), 1.78-1.92 (m, 3 H, CH₂ IAA-5,7,8), 2.00 (m, 1 H, CH₂ IAA-5), 2.20 (m, 1 H, CH₂ IAA-8), 2.32 (m, 1 H, CH₂ IAA-4), 2.68 (s, 3 H, CH₃ N), 3.60 (m, 1 H, CH IAA-6), 4.15 (d, 1 H, CH IAA-3), 4.28 (d, 1 H, CH IAA-9).

(3*S*, 6*S*, 9*R*)-*N*'-Methyl 2-Oxo-3-acetamido-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide ((3*S*, 6*S*, 9*R*)-Ac-IAA-NHMe, 21). General procedure D was followed using hydrochloride 20a (13 mg, 0.055 mmol) in dichloromethane (1 ml). HPLC purification yielded the desired acetamide 21.

(3*S*, 6*S*, 9*R*)-Ac-IAA-NHMe (21, 9 mg, 65%): $R_f = 0.17$ (5:1 EtOAc:MeOH, using a solution of 5% sulfuric acid in ethanol as spray reagent); ¹H NMR δ 1.70-1.85 (m, 3 H, CH₂ IAA-4,5,7), 2.01 (s, 3 H, CH₃ Ac), 2.05-2.15 (m, 2 H, CH₂ IAA-5,8) 2.23 (m, 1 H, CH₂ IAA-7), 2.33 (m, 1 H, CH₂ IAA-8), 2.46 (m, 1 H, CH₂ IAA-4), 2.78 (s, 3 H, CH₃ N), 3.61 (m, 1 H, CH IAA-6), 4.13 (m, 1 H, CH IAA-3), 4.38 (d, 1 H, $J = 4.6$ Hz, CH IAA-9), 6.28 (s br, 1 H, NH N-Me), 6.49 (s br, 1 H, NH N-C3); ¹³C NMR δ 27.6 (CH₃ Ac), 27.9 (CH₃ N), 28.7 (CH₂ IAA-C5), 29.2 (CH₂ IAA-C4), 29.6 (CH₂ IAA-C8), 31.9 (CH₂ IAA-C7), 52.0 (CH₂ IAA-C3), 59.5 (CH₂ IAA-C6), 61.4 (CH₂ IAA-C9), 170.9, 171.6, 172.8 (CO Ac 2 CO IAA); HRMS calcd for C₁₂H₂₀N₃O₃ (MH⁺) 254.1505, found 254.1525.

(3*S*, 6*R*, 9*S*)-*N*'-Methyl 2-Oxo-3-*N*-(Boc)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide ((3*S*, 6*R*, 9*S*)-Boc-IAA-NHMe, **23).** General procedure A was followed using (3*S*, 6*R*, 9*S*)-Boc-IAA-OH (**22**, 24 mg, 0.08 mmol, 100 mol %), methylamine hydrochloride (6 mg, 0.09 mmol, 110 mol %), TBTU (29 mg, 0.09 mmol, 110 mol %) and triethylamine (25 μ L, 0.173 mmol, 210 mol %) in acetonitrile (0.8 mL). Flash column chromatography, using a gradient of 0 to 10% MeOH in EtOAc as eluant, and evaporation of the collected fractions yielded the desired amide **23** as a solid.

(3*S*, 6*R*, 9*S*)-Boc-IAA-NHMe (**23**, 11 mg, 45%): $R_f = 0.30$ (5:1 EtOAc:MeOH); $[\alpha]_D^{20} -8.7^\circ$ (c 0.9, CHCl₃); ¹H NMR δ 1.45 (s, 9 H, CH₃ Boc), 1.65 (m, 1 H, CH₂ IAA-4), 1.75-1.95 (m, 4 H, CH₂ IAA-5,5,7,8), 2.05 (m, 1 H, CH₂ IAA-7), 2.20 (m, 1 H, CH₂ IAA-8), 2.38 (m, 1 H, CH₂ IAA-4), 2.77 (d, 3 H, $J = 4.8$ Hz, CH₃ N), 3.58 (m, 1 H, CH_{IAA-6}), 3.90 (m, 1 H, CH_{IAA-3}) 4.38 (d, 1 H, $J = 4.8$ Hz, CH_{IAA-9}), 5.23 (s br, 1 H, NH_{Boc}), 6.60 (s br, 1 H, NH_N); ¹³C NMR δ 26.3 (CH₃ N), 27.7 (CH₂ IAA-C5), 27.9 (CH₂ IAA-C4), 28.3 (CH₃ Boc), 29.1 (CH₂ IAA-C8), 31.9 (CH₂ IAA-C7), 52.3 (CH_{IAA-C3}), 59.4 (CH_{IAA-C6}), 61.4 (CH_{IAA-C9}), 79.8 (C_q Boc), 155.8 (CO_{Boc}), 169.4 (CO_{IAA-N}), 171.5 (CO_{IAA-C3}); HRMS calcd for C₁₅H₂₆N₃O₄ (MH⁺) 312.1923, found 312.1936.

(3*S*, 6*R*, 9*S*)-*N*'-Methyl 2-Oxo-3-amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide Hydrochloride ((3*S*, 6*R*, 9*S*)-HCl•IAA-NHMe, **23a).** General procedure C was followed using (3*S*, 6*R*, 9*S*)-Boc-IAA-NHMe (**23**, 10.6 mg, 0.034 mmol) and gave the desired salt **23a** which was used directly in the next reaction.

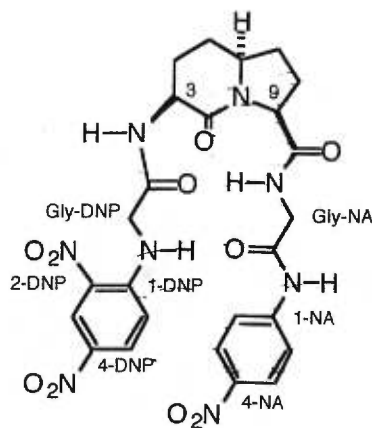
(3*S*, 6*R*, 9*S*)-HCl•IAA-NHMe (**23a**, 8 mg, 95%): $R_f = 0.10$ (4:1:1 *n*-BuOH:AcOH:H₂O); ¹H NMR (CD₃OD) δ 1.65-1.75 (m, 2 H), 1.75-2.05 (m, 3

H), 2.05-2.2 (m, 2H), 2.32 (m, 1 H), 2.68 (d, 3 H, $J = 4.8$ Hz), 3.6 (m, 1 H), 4.16 (d, 1 H, $J = 4.7$ Hz), 4.35 (m, 1 H).

(3S, 6R, 9S)-N'-Methyl 2-Oxo-3-acetamido-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide ((3S, 6R, 9S)-Ac-IAA-NHMe, 24). General procedure D was followed using hydrochloride **23a** (8 mg, 0.032 mmol) in dichloromethane (0.5 ml).

(3S, 6R, 9S)-Ac-IAA-NHMe (**24**) $R_f = 0.10$ (5:1 EtOAc:MeOH, using a solution of 5% sulfuric acid in ethanol as spray reagent); Retention time = 9.70.

Synthesis of (3*S*, 6*S*, 9*S*)-*N*'-*p*-Nitrophenyl 2-Oxo-3-(*N*-2,4-dinitrophenylglycinamido)-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carbonylglycinamide ((3*S*, 6*S*, 9*S*)-DNP-Gly-IAA-Gly-*p*NA, **26).**

**26**

***N*'-*p*-Nitrophenyl *N*-(Boc)glycinamide (Boc-Gly-*p*NA, **27**).** General procedure A was followed using *N*-(Boc)glycine (351 mg, 2 mmol, 100 mol %), *p*-nitroaniline (304 mg, 2.2 mmol, 110 mol %), TBTU (707 mg, 2.2 mmol, 110 mol %) and triethylamine (308 μ L, 2.2 mmol, 110 mol %) in acetonitrile (16 mL). Flash column chromatography, using 2:1 EtOAc:hexane as eluant, and evaporation of the collected fractions yielded the amide compound **27** as a white solid.

Boc-Gly-*p*NA (**27**, 360 mg, 61%): R_f = 0.52 (2:1 EtOAc:hexane); ^1H NMR (CD_3OD) δ 1.48 (s, 9 H, CH_3 Boc), 3.94 (s, 2 H, CH_2 Gly), 7.79 (m, 2 H, Ar 2-NA), 8.19 (m, 2 H, Ar 3-NA); ^{13}C NMR (CD_3OD) δ 27.7 (CH_3 Boc), 43.9 (CH_2 Gly), 79.9 (C_q Boc), 118.9 (CH Ar 2-NA), 124.5 (CH Ar 3-NA), 142.9 (C_q Ar 4-NA), 143.9 (C_q Ar 1-NA), 156.5 (CO Boc), 168.8 (CO Gly); HRMS calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_5$ (MH^+) 296.1246, found 296.1240.

***N'*-*p*-Nitrophenyl glycinamide Hydrochloride (HCl•Gly-*p*NA, 28).**

General procedure C was followed using Boc-Gly-*p*NA (27, 31 mg, 0.11 mmol) and gave the desired salt 28 as a white solid which was used directly in the next reaction.

HCl•Gly-*p*NA (28, 20.5 mg, 100%): $R_f = 0.51$ (4:1:1 *n*-BuOH:AcOH:H₂O); ¹H NMR (CD₃OD) δ 3.93 (s, 2 H, CH₂ Gly), 7.83 (m, 2 H, Ar 2-NA), 8.21 (m, 2 H, Ar 3-NA); ¹³C NMR (CD₃OD) δ 42.5 (CH₂ Gly), 120.5 (CH Ar 2-NA), 126.0 (CH Ar 3-NA), 145.1 (C_q Ar 4-NA), 145.4 (C_q Ar 1-NA), 166.4 (CO Gly); HRMS calcd for C₈H₉N₃O₃ (M⁺) 195.0644, found 195.0644.

(3*S*, 6*S*, 9*S*)-*N'*-*p*-nitrophenyl 2-Oxo-3-*N*-(Boc)amido-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylglycinamide ((3*S*, 6*S*, 9*S*)-Boc-IAA-Gly-*p*NA, 29).

General procedure A was followed using (3*S*, 6*S*, 9*S*)-Boc-IAA-OH (1, 30 mg, 2 mmol, 100 mol %), HCl•Gly-*p*NA (28, 20.5 mg, 0.11 mmol, 110 mol %), TBTU (41 mg, 0.12 mmol, 120 mol %) and triethylamine (30 μl, 0.22 mmol, 220 mol %) in acetonitrile (1 mL). Flash column chromatography using 9:1 EtOAc:MeOH as eluant, and evaporation of the collected fractions yielded the desired amide 29 as a white solid.

(3*S*, 6*S*, 9*S*)-Boc-IAA-Gly-*p*NA (29, 46.7 mg, 98%): $R_f = 0.62$ (5:1 EtOAc:MeOH); mp 112-113 °C; $[\alpha]_D^{20} +58.2^\circ$ (*c* 1.0, CHCl₃); ¹H NMR δ 1.30 (s, 9 H, CH₃ Boc), 1.80 (m, 1 H, CH₂ IAA-4), 1.85-2.00 (m, 2 H, CH₂ IAA-7,8), 2.05 (m, 1 H, CH₂ IAA-5), 2.10-2.20 (m, 3 H, CH₂ IAA-5,7,8), 2.25 (m, 1 H, CH₂ IAA-4), 3.60 (m, 1 H, CH IAA-6), 3.95 (s, 2 H, CH₂ Gly), 4.20 (m, 1 H, CH IAA-3), 4.45 (m, 1 H, CH IAA-9), 5.65 (d, 1 H *J* = 4.8 Hz, NH_{Boc}), 7.90 (s br, 1 H, NH_{Gly}), 8.05 (m, 2 H, Ar 2-NA), 8.15 (m, 2 H, Ar 3-NA), 9.40 (s, 1 H, NH_{NA}); ¹³C NMR δ 26.5 (CH₂ IAA-C5), 28.1 (CH₃ Boc), 28.4 (CH₂ IAA-C4), 30.0 (CH₂

IAA-C8), 31.9 (CH₂ IAA-C7), 43.9 (CH₂ Gly), 49.2 (CH IAA-C3), 60.0 (CH IAA-C6), 60.8 (CH IAA-C9), 80.5 (C_q Boc), 119.6 (CH Ar 2-NA), 124.6 (CH Ar 3-NA), 143.2 (C_q Ar 4-NA), 144.4 (C_q Ar 1-NA), 156.3 (CO Boc), 168.5, 169.7, 171.9 (3 CO Gly, IAA).

(3S, 6S, 9S)-N'-p-nitrophenyl 2-Oxo-3-amido-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylglycinamide Trifluoroacetate ((3S, 6S, 9S)-CF₃CO₂H•IAA-Gly-pNA, 29a). General procedure B was followed using (3S, 6S, 9S)-Boc-IAA-Gly-pNA (29, 59 mg, 0.125 mmol) and gave the desired salt 29a which was used directly in the next reaction.

(3S, 6S, 9S)-CF₃CO₂H•IAA-Gly-pNA (29a, 58.7 mg, 100%): R_f = 0.24 (4:1:1 *n*-BuOH:AcOH:H₂O); ¹H NMR (CD₃OD) δ 1.70-1.85 (m, 2 H, CH₂ IAA-4,7), 1.95 (m, 1 H, CH₂ IAA-8), 2.10-2.30 (m, 4 H, CH₂ IAA-5,5,7,8), 2.40 (m, 1 H, CH₂ IAA-4), 3.80 (m, 1 H, CH IAA-6), 4.05 (s, 2 H, CH₂ Gly), 4.10 (m, 1 H, CH IAA-3), 4.50 (m, 1 H, CH IAA-9), 7.90 (m, 2 H, Ar 2-NA), 8.20 (m, 2 H, Ar 3-NA); ¹³C NMR (CD₃OD) δ 25.6 (CH₂ IAA-C5), 27.0 (CH₂ IAA-C4), 30.3 (CH₂ IAA-C8), 33.0 (CH₂ IAA-C7), 44.8 (CH₂ Gly), 49.6 (CH IAA-C3), 59.4 (CH IAA-C6), 61.4 (CH IAA-C9), 120.8 (CH Ar 2-NA), 125.8 (CH Ar 3-NA), 144.9 (C_q Ar 4-NA), 145.8 (C_q Ar 1-NA), 167.8, 170.2, 174.6 (3 CO Gly, IAA).

(3S, 6S, 9S)-N'-p-nitrophenyl 2-Oxo-3-N-(Boc)glycinamido-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylglycinamide ((3S, 6S, 9S)-Boc-Gly-IAA-Gly-pNA, 30). General procedure A was followed using (3S, 6S, 9S)-CF₃CO₂H•IAA-Gly-pNA (39a, 58 mg, 0.125 mmol, 100 mol %), Boc-Gly-OH (24 mg, 0.13 mmol, 110 mol %), TBTU (82 mg, 0.25 mmol, 200 mol %) and triethylamine (36 μl, 0.26 mmol, 220 mol %) in acetonitrile (1 mL). Flash

column chromatography, using 10:1 CH₂Cl₂:MeOH as eluant, and evaporation of the collected fractions yielded the desired compound **30** as a white solid.

(3*S*, 6*S*, 9*S*)-Boc-Gly-IAA-Gly-*p*NA (**30**, 57 mg, 84%): *R*_f = 0.50 (10:1 CH₂Cl₂:MeOH); mp 126-128 °C; [α]²⁰_D +31.6° (*c* 1.2, CHCl₃); ¹H NMR δ 1.39 (s, 9 H, CH₃ Boc), 1.80 (m, 1 H, CH₂ IAA-4), 1.90-2.00 (m, 2 H, CH₂ IAA-7,8), 2.07 (m, 1 H, CH₂ IAA-5), 2.12-2.20 (m, 3 H, CH₂ IAA-5,7,8), 2.21 (m, 1 H, CH₂ IAA-4), 3.45-3.65 (m, 3 H, CH IAA-6, CH₂ Gly), 3.91 (dd, 1 H, *J* = 5.2, 21.9 Hz, CH₂ Gly-NA), 4.19 (m, 1 H, CH IAA-3), 4.28 (dd, 1 H, *J* = 6.6, 17.4 Hz, CH₂ Gly-NA), 4.48 (t, 1 H, *J* = 5.2 Hz, CH IAA-9), 4.98 (s br, 1 H, NH Boc), 7.55 (d, 1 H, *J* = 7.26 Hz, NH IAA), 7.90 (t, 1 H, *J* = 5.8 Hz, NH Gly-NA), 7.97 (d, 2 H, *J* = 8.7 Hz, Ar 2-NA), 8.14 (m, 2 H, *J* = 8.7 Hz, Ar 3-NA), 9.34 (s br, 1 H, NH NA); ¹³C NMR δ 26.5 (CH₂ IAA-C5), 28.2 (CH₃ Boc), 28.5 (CH₂ IAA-C4), 29.4 (CH₂ IAA-C8), 31.8 (CH₂ IAA-C7), 43.9 (CH₂ Gly-NA), 44.1 (CH₂ Gly), 48.6 (CH IAA-C3), 60.2 (CH IAA-C6), 60.8 (CH IAA-C9), 80.6 (C_q Boc), 123.4 (CH Ar 2-NA), 124.8 (CH Ar 3-NA), 143.2 (C_q Ar 4-NA), 144.3 (C_q Ar 1-NA), 155.9 (CO Boc), 168.6, 169.1, 170.4, 171.8 (4 CO Gly, IAA); HRMS calcd for C₂₄H₃₃N₆O₈ (MH⁺) 533.2360, found 533.2332.

(3*S*, 6*S*, 9*S*)-*N'*-*p*-nitrophenyl 2-Oxo-3-glycinamido-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylglycinamide Hydrochloride ((3*S*, 6*S*, 9*S*)-HCl•Gly-IAA-Gly-*p*NA, **30a**). General procedure C was followed using (3*S*, 6*S*, 9*S*)-Boc-Gly-IAA-Gly-*p*NA (**30**, 31 mg, 0.06 mmol) and gave the desired salt **30a** as a white solid which was used directly in the next reaction.

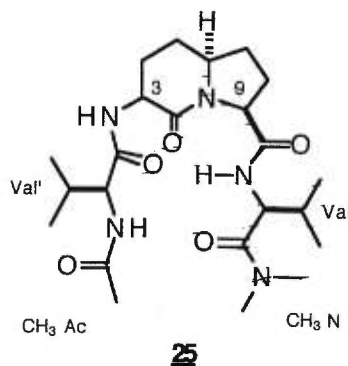
(3*S*, 6*S*, 9*S*)-HCl•Gly-IAA-Gly-*p*NA (**30a**, 27 mg, 100%): $R_f = 0.26$ (4:1:1 *n*-BuOH:AcOH:H₂O); ¹H NMR (CD₃OD) δ 1.60-1.85 (m, 3 H, CH₂ IAA-4,7,8), 2.00-2.20 (m, 5 H, CH₂ IAA-5,5,7,8,4 β), 3.50-3.70 (m, 3 H, CH IAA-6, CH₂ Gly), 3.98 (d, 2 H, $J = 4.5$ Hz, CH₂ Gly-NA), 4.38 (d, 1 H, $J = 8.7$ Hz, CH IAA-3), 4.48 (t, 1 H, $J = 5.2$ Hz, CH IAA-9), 7.84 (d, 2 H, $J = 9.2$ Hz, Ar 2-NA), 8.09 (d, 2 H, $J = 9.2$ Hz, Ar 3-NA); ¹³C NMR (CD₃OD) δ 27.2 (CH₂ IAA-C5), 28.9 (CH₂ IAA-C4), 29.8 (CH₂ IAA-C8), 33.5 (CH₂ IAA-C7), 42.1 (CH₂ Gly-NA), 44.6 (CH₂ Gly), 48.7 (CH IAA-C3), 60.0 (CH IAA-C6), 62.3 (CH IAA-C9), 121.2 (CH Ar 2-NA), 126.3 (CH Ar 3-NA), 143.5 (C_q Ar 4-NA), 146.9 (C_q Ar 1-NA), 163.4, 167.2, 170.3, 175.4 (4 CO Gly, IAA).

(3*S*, 6*S*, 9*S*)-*N'*-*p*-Nitrophenyl 2-Oxo-3-(*N*-2,4-dinitrophenylglycinamido)-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylglycinamide ((3*S*, 6*S*, 9*S*)-DNP-Gly-IAA-Gly-*p*NA, **26).**³⁰ To a solution of (3*S*, 6*S*, 9*S*)-HCl•Gly-IAA-Gly-*p*NA (**30a**, 37 mg, 0.058 mmol, 100 mol %) and triethylamine (24 mL, 0.174 mmol, 300 mol %) in DMF (1.5 mL) was added 2,4-dinitrofluorobenzene (22 mg, 0.116 mmol, 200 mol %). The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h and evaporated *in vacuo*. Flash column chromatography of the residue, using a gradient of pure CHCl₃ to 20:1 CHCl₃:MeOH as eluant, and evaporation of the collected fractions yielded the desired compound **26** as a yellow solid that was recrystallized from chloroform-diethyl ether.

(3*S*, 6*S*, 9*S*)-DNP-Gly-IAA-Gly-*p*NA (**26**, 31 mg, 89%): $R_f = 0.61$ (10:1 CHCl₃:MeOH); ¹H NMR (5:1 CDCl₃:CD₃OD) δ 1.67-1.84 (m, 2 H, CH₂ IAA-4,7), 1.90 (m, 1 H, CH₂ IAA-8), 2.00-2.20 (m, 5 H, CH₂ IAA-5,5,7,8,4 β), 3.60 (m, 1 H, CH IAA-6), 3.73 (dd, 1 H, $J = 16.8, 49.3$ Hz, CH₂ Gly-DNP), 3.90 (m, 2 H, CH

IAA-3, CH₂ Gly-NA), 4.11 (dd, 1 H, $J = 2.1, 17.4$ Hz, CH₂ Gly-DNP), 4.35 (d, 1 H, $J = 7$ Hz, CH₂ Gly-NA), 4.46 (d, 1 H, $J = 3.7$ Hz, CH IAA-9), 6.67 (d, 1 H $J = 8.1$ Hz, Ar 6-DNP), 7.85 (dd, 2 H, $J = 7.1, 1.5$ Hz, Ar 2-NA), 7.96 (dd, 2 H, $J = 7.1, 1.5$ Hz, Ar 3-NA), 8.10 (m, 1 H, Ar 5-DNP), 9.00 (m, 1 H, Ar 3-DNP); ¹³C NMR (5:1 CDCl₃:CD₃OD) δ 25.4 (CH₂ IAA-C5), 27.9 (CH₂ IAA-C4), 28.4 (CH₂ IAA-C8), 31.8 (CH₂ IAA-C7), 43.4 (CH₂ Gly-NA), 45.0 (CH₂ Gly-DNP), 47.8 (CH IAA-C3), 59.9 (CH IAA-C6), 60.0 (CH IAA-C9), 113.8 (CH Ar 3-DNP), 119.1 (CH Ar 2-NA), 123.8 (CH Ar 5-DNP), 124.2 (CH Ar 3-NA), 130.0 (CH Ar 6-DNP), 130.7 (C_q Ar 2-DNP), 136.2 (C_q Ar 1-DNP), 142.9 (C_q Ar 4-NA), 143.9 (C_q Ar 4-DNP), 146.7 (C_q Ar 1-NA), 167.2, 168.3, 168.4, 173.0 (4 CO Gly, IAA); HRMS calcd for C₂₅H₂₇N₈O₁₀ (MH⁺) 599.1850, found 599.1829.

Synthesis of (3*S*, 6*S*, 9*S*)-*N*',*N*'-Dimethyl 2-Oxo-3-(*N*-acetyl-L-valinamido)-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carbonyl-L-valinamide ((3*S*, 6*S*, 9*S*)-Ac-Val-IAA-Val-N(Me)₂, 25)



***N*',*N*'-Dimethyl (Boc)-L-valinamide (Boc-Val-N(Me)₂, 32). General procedure A** was followed using *N*-(Boc)-L-valine (217 mg, 1 mmol, 100 mol %), dimethylamine hydrochloride (90 mg, 1.1 mmol, 110 mol %), TBTU (353 mg, 1.1 mmol, 110 mol %) and trimethylamine (303 μ L, 2 mmol, 200 mol %) in acetonitrile (8 mL). Flash column chromatography, using 2:1 hexane:EtOAc as eluant, and evaporation of the collected fractions yielded the desired amide **32** as a white solid.

Boc-Val-N(Me)₂ (**32**, 244 mg, 100%): $R_f = 0.46$ (1:1 EtOAc:hexane); ¹H NMR δ 0.71 (d, 3 H, $J = 6.8$ Hz, CH₃ Val), 0.78 (d, 3 H, $J = 6.8$ Hz, CH₃ Val), 1.45 (s, 9 H CH₃ Boc), 1.85 (m, 1 H, CH Val), 2.90 (s, 3 H, CH₃ N), 3.00 (s, 3 H, CH₃ N), 4.38 (m, 1 H, CH _{α} Val), 5.27 (d br, 1 H, $J = 5.9$ Hz, NH Boc); ¹³C NMR δ 17.1 (CH₃ Val), 19.3 (CH₃ Val), 28.1 (CH₃ Boc), 31.3 (CH Val), 35.4 (CH₃ N), 37.1 (CH₃ N), 54.7 (C _{α} Val), 79.1 (C_q Boc), 155.7 (CO Boc), 178.0 (CO Val).

***N',N'*-Dimethyl L-valinamide Trifluoroacetate** ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}\cdot\text{Val-N}(\text{Me})_2$, **33**). **General procedure B** was followed using Boc-Val-N(Me)₂ (**32**, 33 mg, 0.135 mmol) and gave the desired salt **33** which was used directly in the next reaction.

$\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}\cdot\text{Val-N}(\text{Me})_2$ (**33**, 35 mg, 100%): $R_f = 0.31$ (10:1 EtOAc:MeOH); ¹H NMR (CD₃OD) δ 0.70 (d, 3 H, $J = 6.8$ Hz, CH₃ Val), 0.80 (d, 3 H, $J = 6.8$ Hz, CH₃ Val), 1.85 (m, 1 H, CH Val), 2.90 (s, 3 H, CH₃ N), 3.00 (s, 3 H, CH₃ N), 4.40 (m, 1 H, CH_α Val).

(**3S**, **6S**, **9S**)-*N',N'*-Dimethyl **2-Oxo-3-*N*-(Boc)amido-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carbonyl-L-valinamide** ((**3S**, **6S**, **9S**)-Boc-IAA-Val-N(Me)₂, **34**). **General procedure A** was followed using (**3S**, **6S**, **9S**)-Boc-IAA-OH (**1**, 36 mg, 0.12 mmol, 100 mol %), $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}\cdot\text{Val-N}(\text{Me})_2$ (**33**, 35 mg, 0.135 mmol, 113 mol %), TBTU (43 mg, 0.133 mmol, 110 mol %) and trimethylamine (35.2 μL , 0.27 mmol, 210 mol %) in acetonitrile (1 mL). Flash column chromatography, using 9:1 EtOAc:MeOH as eluant, and evaporation of the collected fractions yielded the desired peptide **34** as a white solid.

(**3S**, **6S**, **9S**)-Boc-IAA-Val-N(Me)₂ (**34**, 45 mg, 89 %): $R_f = 0.41$ (5:1 EtOAc:MeOH); mp 65-66 °C; $[\alpha]_D^{20} -29^\circ$ (c 1.0, CHCl₃); ¹H NMR δ 0.84 (d, 3 H, $J = 6.8$ Hz, CH₃ Val), 0.92 (d, 3 H, $J = 6.8$ Hz, CH₃ Val), 1.47 (s, 9 H, CH₃ Boc), 1.65-1.68 (m, 2 H, CH₂ IAA-4,5), 1.68-1.80 (m, 1 H, CH₂ IAA-7), 1.92-2.05 (m, 2 H, CH Val, CH₂ IAA-8), 2.05-2.15 (m, 1 H, CH₂ IAA-5), 2.15-2.20 (m, 1 H, CH₂ IAA-7), 2.25-2.34 (m, 1 H, CH₂ IAA-8), 2.44 (m, 1 H, CH₂ IAA-4), 2.94 (s, 3 H, CH₃ N), 3.06 (s, 3 H, CH₃ N), 3.63 (m, 1 H, CH IAA-6), 4.16 (m, 1 H, CH IAA-3), 4.45 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, CH IAA-9), 4.77 (m, 1 H, CH_α Val), 5.78 (d br, 1 H, $J =$

4.8 Hz, NH_{Boc}), 7.24 (d br, 1 H, $J = 5.8$ Hz, NH_{Val}); ¹³C NMR δ 17.2 (CH₃_{Val}), 19.7 (CH₃_{Val}), 26.6 (CH₂_{IAA-C5}), 27.3 (CH₂_{IAA-C4}), 28.3 (CH₃_{Boc}), 28.3 (CH₂_{IAA-C8}), 31.5 (CH_{Val}), 32.4 (CH₂_{IAA-C7}), 35.6 (CH₃_N), 37.2 (CH₃_N), 50.2 (CH_{IAA-C3}), 53.6 (CH _{α} _{Val}), 56.9 (CH_{IAA-C6}), 59.7 (CH_{IAA-C9}), 79.4 (C_q_{Boc}), 155.7 (CO_{Boc}), 169.9 (CO_{IAA-Val}), 170.6 (CO_{IAA-C3}), 171.3 (CO_{Val}); HRMS calcd for C₂₁H₃₇N₄O₅ (MH⁺) 425.2764, found 425.2740.

(3S, 6S, 9S)-N',N'-Dimethyl 2-Oxo-3-amido-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carbonyl-L-valinamide Trifluoroacetate ((3S, 6S, 9S)-CF₃CO₂H•IAA-Val-N(Me)₂, 34a). General procedure B was followed using (3S, 6S, 9S)-Boc-Val-IAA-Val-N(Me)₂ (34, 42 mg, 0.10 mmol) and gave the desired salt 34a which was used directly in the next reaction.

(3S, 6S, 9S)-CF₃CO₂H•IAA-Val-N(Me)₂ (34a, 44 mg, 100%): $R_f = 0.26$ (4:1:1 *n*-BuOH:AcOH:H₂O); ¹H NMR δ 0.82 (d, 3 H, $J = 6.8$ Hz, CH₃_{Val}), 0.88 (d, 3 H, $J = 6.8$ Hz, CH₃_{Val}), 1.60-1.70 (m, 2 H, CH₂_{IAA-4,5}), 1.80-2.30 (m, 6 H, CH_{Val}, CH₂_{IAA-5,7,7,8,8}), 2.44 (m, 1 H, CH₂_{IAA-4}), 2.95 (s, 3 H, CH₃_N), 3.12 (s, 3 H, CH₃_N), 3.72 (m, 1 H, CH_{IAA-6}), 4.18 (m, 1 H, CH_{IAA-3}), 4.53 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, CH_{IAA-9}), 4.68 (m, 1 H, CH _{α} _{Val}), 7.68 (d, 1 H, $J = 4.6$ Hz, NH_{Val}), 8.20 (s br, 2 H, NH₂_{IAA}).

(3S, 6S, 9S)-N',N'-Dimethyl 2-Oxo-3-N-(Boc)-L-valinamido-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carbonyl-L-valinamide ((3S, 6S, 9S)-Boc-Val-IAA-Val-N(Me)₂, 35). General procedure A was followed using (3S, 6S, 9S)-CF₃CO₂H•IAA-Val-N(Me)₂ (34a, 44 mg, 0.10 mmol, 100 mol %), *N*-(Boc)-L-valine (27.6 mg, 0.12 mmol, 120 mol %), TBTU (41 mg, 0.13 mmol, 120 mol %) and triethylamine (32 μ L, 0.25 mmol, 220 mol %) in

acetonitrile (1 mL). Flash column chromatography, using 10:1 CHCl₃:isopropanol as eluant, and evaporation of the collected fractions yielded the desired peptide **35** as a white solid.

(3*S*, 6*S*, 9*S*)-Boc-Val-IAA-Val-N(Me)₂ (**35**, 43 mg, 82 %): *R_f* = 0.57 (10:1 CHCl₃:isopropanol); mp 77-79 °C; [α]²⁰_D -13.3° (*c* 1.2, CHCl₃); ¹H NMR δ 0.80-0.91 (m, 12 H, CH₃ Val), 1.38 (s, 9 H, CH₃ Boc), 1.51-1.63 (m, 2 H, CH₂ IAA-4,5), 1.63-1.76 (m, 1 H, CH₂ IAA-7), 1.90-2.24 (m, 6 H, 2 CH Val, CH₂ IAA-5,7,8,8), 2.38-2.50 (m, 1 H, CH₂ IAA-4), 2.91 (s, 3 H, CH₃ N), 3.03 (s, 3 H, CH₃ N), 3.60 (m, 1 H, CH IAA-6), 4.00 (m, 1 H, CH_α Val), 4.35 (m, 1 H, CH IAA-3), 4.41 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz, CH IAA-9), 4.72 (dd, 1 H, *J* = 8.5, 8.5 Hz, CH_α Val), 5.15 (d br, 1 H, *J* = 6.0 Hz, NH Boc), 7.03 (m br, 2 H, NH Val, NH IAA); ¹³C NMR δ 17.3 (CH₃ Val), 17.5 (CH₃ Val'), 19.2 (CH₃ Val'), 19.7 (CH₃ Val), 26.7 (CH₂ IAA-C5), 26.8 (CH₂ IAA-C4), 28.3 (CH₃ Boc), 29.7 (CH₂ IAA-C8), 31.4 (CH Val), 31.8 (CH Val'), 32.2 (CH₂ IAA-C7), 35.8 (CH₃ N), 37.3 (CH₃ N), 49.3 (CH IAA-C3), 53.6 (CH_α Val'), 57.2 (CH IAA-C6), 59.3 (CH_α Val), 59.9 (CH IAA-C9), 79.5 (C_q Boc), 156.0 (CO Boc), 169.2 (CO IAA-Val), 170.6 (CO IAA-C3), 171.4, 171.5 (2 CO Val); HRMS calcd for C₂₆H₄₆N₅O₆ (MH⁺) 524.3448, found 524.3457.

(3*S*, 6*S*, 9*S*)-*N,N*'-Dimethyl 2-Oxo-3-(*N*-L-valinamido)-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carbonyl-L-valinamide Hydrochloride ((3*S*, 6*S*, 9*S*)-HCl•Val-IAA-Val-N(Me)₂, **35a**). General procedure C was followed using (3*S*, 6*S*, 9*S*)-Boc-Val-IAA-Val-N(Me)₂ (**35**, 40 mg, 0.076 mmol) and gave the desired salt **35a** which was used directly in the next reaction.

(3*S*, 6*S*, 9*S*)-HCl•Val-IAA-Val-N(Me)₂ (**35a**, 35 mg, 100%): *R_f* = 0.26 (4:1:1 *n*-BuOH:AcOH:H₂O); ¹H NMR (CD₃OD) δ 0.90-1.00 (2 d, 6 H, *J* = 6.8, 6.8 Hz, CH₃ Val), 1.00-1.10 (2 d, 6 H, *J* = 6.8, 6.8 Hz, CH₃ Val), 1.68 (m, 1 H, CH₂

IAA-4), 1.80 (m, 1 H, CH₂ IAA-5), 1.88 (m, 1 H, CH₂ IAA-7), 1.95-2.18 (m, 5 H, 2.00 CH_{Val}, CH₂ IAA-5,7,8), 2.18-2.28 (m, 2 H, CH₂ IAA-4,8), 2.95 (s, 3 H, CH₃ N), 3.17 (s, 3 H, CH₃ N), 3.69-3.75 (m, 2 H, CH_α Val', CH IAA-6), 4.40-4.50 (m, 2 H, CH IAA-3, CH_α Val), 4.64 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz, CH IAA-9); ¹³C NMR (CD₃OD) δ 20.5 (CH₃ Val), 20.9 (CH₃ Val'), 21.1 (CH₃ Val'), 22.0 (CH₃ Val), 29.5 (CH₂ IAA-C5), 30.7 (CH₂ IAA-C4), 32.4 (CH₂ IAA-C8), 33.9 (CH Val), 34.3 (CH Val'), 35.0 (CH₂ IAA-C7), 38.2 (CH₃ N), 40.2 (CH₃ N), 52.0 (CH IAA-C3), 58.3 (CH_α Val'), 62.2 (CH IAA-C6), 62.6 (CH_α Val), 63.4 (CH IAA-C9), 171.6, 171.9 (2 CO IAA), 175.6, 175.9 (2 CO Val).

(3*S*, 6*S*, 9*S*)-*N,N'*-Dimethyl 2-Oxo-3-(*N*-*L*-valinamido)-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carbonyl-*L*-valinamide Trifluoroacetate ((3*S*, 6*S*, 9*S*)-CF₃CO₂H•Val-IAA-Val-N(Me)₂, 35b). General procedure B was followed using (3*S*, 6*S*, 9*S*)-Boc-Val-IAA-Val-N(Me)₂ (35, 13 mg, 0.025 mmol) and gave the desired salt 35b which was used directly in the next reaction.

(3*S*, 6*S*, 9*S*)-CF₃CO₂H•Val-IAA-Val-N(Me)₂ (35b, 13.4 mg, 100%): *R_f* = 0.27 (4:1:1 *n*-BuOH:AcOH:H₂O); ¹H NMR (CD₃OD) δ 0.89-0.95 (m, 6 H, CH₃ Val), 1.03-1.08 (m, 6 H, CH₃ Val), 1.67 (m, 1 H, CH₂ IAA-4), 1.76 (m, 1 H, CH₂ IAA-5), 1.88 (m, 1 H, CH₂ IAA-7), 1.97-2.16 (m, 5 H, 2 CH_{Val}, CH₂ IAA-5,7,8), 2.18-2.24 (m, 2 H, CH₂ IAA-4,8), 2.93 (s, 3 H, CH₃ N), 3.16 (s, 3 H, CH₃ N), 3.63-3.73 (m, 2 H, CH_α Val', CH IAA-6), 4.35-4.45 (m, 2 H, CH IAA-3, CH_α Val), 4.60 (m, 1 H, CH IAA-9).

(3S, 6S, 9S)-N',N'-Dimethyl 2-Oxo-3-(N-acetyl-L-valinamido)-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carbonyl-L-valinamide ((3S, 6S, 9S)-Ac-Val-IAA-Val-N(Me)₂, 25). General procedure D was followed using (3S, 6S, 9S)-HCl•Val-IAA-Val-N(Me)₂ (35a, 35 mg, 0.076 mmol). HPLC purification yielded the desired acetamide 25.

(3S, 6S, 9S)-Ac-Val-IAA-Val-N(Me)₂ (25, 28 mg, 80%); Retention time = 13.7 min; ¹H NMR (CD₂Cl₂) δ 0.80-1.00 (m, 12 H, CH₃ Val), 1.29 (m, 1 H, CH Val), 1.65-1.70 (m, 2 H, CH₂ IAA-5,7), 1.78 (m, 1 H, CH₂ IAA-4), 2.00 (s, 3H, CH₃ Ac), 2.00-2.07 (m, 2 H, 2 CH Val', CH₂ IAA-8), 2.12 (m, 1 H, CH₂ IAA-5), 2.14-2.20 (m, 2 H, CH₂ IAA-7,8), 2.32 (m, 1 H, CH₂ IAA-4), 2.95 (s, 3 H, CH₃ N), 3.09 (s, 3 H, CH₃ N), 3.65 (m br, 1 H, CH IAA-6), 4.32 (m br, 1 H, CH IAA-3), 4.38 (m br, 1 H, CH_α Val), 4.43 (d, 1 H, CH IAA-9), 4.64 (m br, 1 H, CH_α Val'), 6.40 (s br, 1 H, NH Val), 7.09 (s br, 1 H, NH Val'), 7.31 (s br, 1 H, NH IAA);

¹H NMR δ 0.85-1.00 (m, 12 H, CH₃ Val), 1.30 (m, 1 H, CH Val), 1.65-1.81 (m, 3 H, CH₂ IAA-4,5,7), 2.00-2.27 (m, 5 H, 2 CH Val', CH₂ IAA-5,7,8,8), 2.13 (s, 3H, CH₃ Ac), 2.33 (m, 1 H, CH₂ IAA-4), 2.98 (s, 3 H, CH₃ N), 3.10 (s, 3 H, CH₃ N), 3.67 (m br, 1 H, CH IAA-6), 4.38 (m br, 1 H, CH IAA-3), 4.45 (m br, 1 H, CH_α Val), 4.51 (m, 1 H, CH IAA-9), 4.65 (m br, 1 H, CH_α Val'), 6.38 (s br, 1 H, NH Val), 7.15 (s br, 1 H, NH Val'), 7.30 (s br, 1 H, NH IAA);

¹³C NMR (CD₂Cl₂) δ 21.9 (CH₃ Val), 22.8 (CH₃ Val'), 23.6 (CH₃ Val'), 24.3 (CH₃ Val), 27.7 (CH₃ Ac), 31.5 (CH₂ IAA-C5), 32.5 (CH₂ IAA-C4), 33.7 (CH₂ IAA-C8), 34.3 (CH Val), 36.2 (CH Val'), 37.0 (CH₂ IAA-C7), 40.6 (CH₃ N), 42.4 (CH₃ N), 54.2 (CH IAA-C3), 58.9 (CH_α Val'), 63.0 (CH IAA-C6), 63.3 (CH_α Val), 65.5 (CH IAA-C9), 172.9 (CO Ac), 173.8, 174.2 (2 CO IAA), 175.6, 176.0 (2 CO Val);

¹³C NMR δ 17.2 (CH₃ Val), 18.3 (CH₃ Val'), 19.1 (CH₃ Val'), 19.8 (CH₃ Val), 26.3 (CH₃ Ac), 28.6 (CH₂ IAA-C5), 29.4 (CH₂ IAA-C4), 30.9 (CH₂ IAA-C8), 31.3

(CH Val), 31.8 (CH Val'), 35.9 (CH₂ IAA-C7), 37.4 (CH₃ N), 38.6 (CH₃ N), 49.2 (CH IAA-C3), 53.4 (CH_α Val'), 57.3 (CH IAA-C6), 57.9 (CH_α Val), 60.0 (CH IAA-C9), 168.7 (CO Ac), 170.0, 170.2 (2 CO IAA), 171.0, 171.6 (2 CO Val).

When general procedure D was used with (3*S*, 6*S*, 9*S*)-CF₃CO₂H•Val-IAA-Val-N(Me)₂ (**35b**, 13 mg, 0.024 mmol), a mixture of (3*S*, 6*S*, 9*S*)-Ac-Val-IAA-Val-N(Me)₂ (**25**) and (3*S*, 6*S*, 9*S*)-Ac-Val-IAA-Val-N(Me)₂ (**36**) was obtained (**36** was assigned as the trifluoroacetate compound by analogy with compound **25**).

(3*S*, 6*S*, 9*S*)-Ac-Val-IAA-Val-N(Me)₂ (**25**, 4.8 mg, 42%): R_f = 0.55 (5:1 EtOAc:MeOH); Retention time = 13.71 min; (3*S*, 6*S*, 9*S*)-CF₃CO-Val-IAA-Val-N(Me)₂ (**36**, 3.9 mg, 34%): R_f = 0.2 (5:1 EtOAc:MeOH); Retention time = 12.88 min.

Conformational Analysis.

Molecular Modeling Calculations.

Molecular modeling calculations were performed on a Silicon Graphics Personal Iris Workstation using the AMBER or OPLS-AMBER force field and the GB/SA solvent model for chloroform or water within the Macromodel program 4.5x. The modeling protocol on amides **12**, **18**, **21**, **24** and **25** was conducted as follows. For each *N*-acetyl *N'*-methanamide derivative, a *trans*-isomer amide bond was drawn and minimized in the appropriate solvent using the Steepest Descent (SD) procedure followed by a Full Matrix Newton Raphson (FMNR) method until a 0.001 kJ/Å.mol gradient was reached. The resulting structure was then used as the starting point for the generation of the conformational search and conformational energy maps. For the conformational search, the Monte Carlo searches of torsional space were done with BATCHMIN [M5] (version 4.5x) in order to give tables 1, 2 and 5. For the bicyclic system, one ring closure bond was defined (in the 6 ring). The global minima for the amide derivatives were obtained using a similar protocol as described above in which no constraints were placed on the ϕ and ψ dihedral angle geometries. For the conformational energy maps, the ϕ and ψ dihedral angles were rotated by about 30° increments in order to generate 144 conformers. For each conformer, two ring puckerings were applied in order to generate 288 starting conformers that were then minimized in chloroform using a Polack-Ribiere Conjugate Gradient (PRCG) and a force of 1000 kJ/mol in order to restrain the ϕ and ψ dihedral angles. The

resulting minima were then plotted against the ϕ and ψ dihedral angles using the Mathematica program in order to furnish maps 1-3.

FT-IR Experiments.

FT-IR spectras were mesured at 25°C and low-temperature on a Perkin-Elmer 1600 FT-IR spectrometer using a DTGS detector at 4 cm^{-1} resolution using dichloromethane distilled from P_2O_5 . Peptide solutions were examined in a 1 mm quartz glass Infracil cell with a concentration as noted in text and the spectra were recorded with 16 scans.

Circular Dichroism Experiments.

CD spectra were recorded on a JASCO J-710 spectropolarimeter using a quartz cell of 1 mmn pathlength at 298 K using spectroscopic grade solvents (DCE and Methanol) or distilled water. Concentration was 3.95 10^{-3} g/mL for peptides **12** and **18**, 1.72 10^{-3} g/mL for **25**, 0.1 and 0.3 mM mL^{-1} for peptide **26**. The Cotton effect was characterized by the molar ellipticity $[\theta]$.

5.9 Références.

- 1 Voir le chapitre 2 et les références contenues.
- 2 Voir le chapitre 4.
- 3 Pour des revues et articles majeurs sur les repliements β , voir les références 6 et 7 du chapitre 1.
- 4 Pour les détails des analyses conformationnelles, se référer à la section 1.5.3 du chapitre 1.
- 5 L'importance des repliements β de type II' pour la formation de conformation d'épingles à cheveux β est présentée dans: (a) "Mirror Image Reverse Turns Promote β -Hairpin Formation", Haque, T. S.; Little, J. C.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4105; (b) "Stereochemical Requirement for β -Hairpin Formation: Model Studies with Four-Residue Peptides and Depsipeptides", Haque, T. S.; Little, J. C.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6975.
- 6 (a) "Synthesis of a Bicyclic Dipeptide with the Shape of a β -Turn Central Part", Nagai, U.; Sato, K. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 647; (b) "Bicyclic Dipeptide Unit with Semi-Rigid β -Turn Conformation", Nagai, U.; Sato, K. *Peptide, Structure and Function. Pro. Ninth. Am. Pept. Symposium* 1985, 465.
- 7 "Synthesis of Potential β -Turn Bicyclic Dipeptide Mimetics", Baldwin, J. E.; Hulme, C.; Schofield, C. J.; Edwards, A. J. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1993**, 935.
- 8 "Bicyclic Thiazolidine Lactam Peptidomimetics of the Dopamine Receptor Modulating Peptide Pro-Leu-Gly-NH₂", Subasinghe, N. L.;

- Bontems, R. J.; McIntee, E.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2356.
- 9 (a) "2-Amino-3-oxohexahydroindolizino[8,7-*b*]indole-5-carboxylate Derivatives as New Scaffolds for Mimicking β -Turn Secondary Structures. Molecular Dynamics and Stereoselective Synthesis", De la Figuera, N.; Alkorta, I.; García-López, M. T.; Herranz, R.; González-Muñiz, R. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 7841; (b) "2(*S*)-Amino-3-oxo-11*b*(*R*)-hexahydroindolizino[8,7-*b*]indole-5(*S*)-carboxylate as New type of β -Turn Dipeptide Mimetic", de la Figuera, N.; Rozas, I.; Garcia-Lopez T.; Gonzalez-Muniz, R. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1994**, 613.
- 10 (a) "Pro-D-NMe-Amino Acid and D-Pro-NMe-Amino Acid: Simple, Efficient Reverse-Turn Constraints", Chalmers, D. K.; Marshall, G. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5927; (b) "Electrochemical Cyclisation of Dipeptides to Form Novel Bicyclic, Reverse-Turn Peptidomimetics. 2. Synthesis and Conformational Analysis of 6,5-Bicyclic Systems", Slomczynska, U.; Chambers, D. K.; Cormille, F.; Smythe, M. L.; Beusen, D. D.; Moëller, K. D.; Marshall, G. R. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1198.
- 11 "Solution Structure of a Biologically Active Cyclic LDV Peptide Analogue Containing a Type II' β -Turn Mimetic", Doule, P. M.; Harris, J. C.; Moody, C. M.; Sadler, P. J.; Sims, M.; Thornton, J. M.; Uppenbrink, J.; Viles, J. H. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1996**, *47*, 427.
- 12 "Cyclic Hexapeptides and Chimeric Peptides as Mimics of Tendamistat", Etzkorn, F. A.; Guo, T.; Lipton, M. A.; Goldberg, S. D.; Bartlett, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10412.
- 13 "Synthesis and Analysis of Leu-Enkephalin Analogues Containing Reverse Turn Peptidomimetics", Claridge, T. D. W.; Hulme, C.; Kelly, R.

- J.; Lee, V.; Nash, I. A.; Schofield, C. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 485.
- 14 (a) "Bicyclic Turned Dipeptide (BTD) as a β -Turn Mimetic; Its Design, Synthesis and Incorporation into Bioactive Peptides", Nagai, U.; Sato, K.; Nakamura, R.; Kato, R. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3577; (b) "Synthesis of an LH-RH Analog with Restricted Conformation by Incorporation of a Bicyclic β -Turn Dipeptide", Nagai, U.; Nakamura, R.; Kato, K.; Ying, S.-Y. *Peptide Chemistry 1986*: T Miyazawa (Ed.), Protein Research Foundation, Osaka, 1987, 295.
- 15 "Conformation and Biological Activity of Cyclic Peptides", Kessler, H.; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 512.
- 16 "The Evaluation of Type I and Type II β -Turn Mixtures", Perczel, A.; Holosi, M.; Sandor, P.; Fasman, G. D. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1993**, *41*, 223.
- 17 "Peptide Structure from NMR", Williamson, M. P.; Waltho, J. P. *Chem. Soc. Rev.* **1992**, 227.
- 18 (a) "The Conformation Analysis of Peptides using FT-IR Spectroscopy, Haris, P. I.; Chapman, D. *Biopolymers* **1995**, *37*, 251; (b) "FT-IR Spectroscopy Guided Analysis of the Circular Dichroism Spectra of Polypeptides", Perczel, A.; Mjer, Z.; Holly, S.; Machytka, D.; Fasman, G. D.; Hollosi, M. *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 591.
- 19 La nomenclature utilisée dans le chapitre est la suivante: les suffixes β et γ placés après le numéro d'un composé désignent respectivement une conformation de repliement β et γ , tandis que n signifie aucune conformation préférentielle.

- 20 Dans le cas des peptides modèles *N*-acétyl *N'*-méthyl amide, l'amide acétyle est désignée par N-HAc et est représentée en rouge tandis que l'amide méthyle est désignée par N-HMe et est représentée en vert.
- 21 "O-Benzotriazolyl-*N-N-N'*-*N'*-tetramethyluronium Hexafluorophosphate as Coupling Reagent for the Synthesis of Peptides of Biological Interest", Dourtoglou, V.; Gross, B. *Synthesis* **1994**, 572.
- 22 "Steric Effects on the Amide Isomer Equilibrium of Prolyl Peptides. Synthesis and Conformational Analysis of *N*-Acetyl-5-*tert*-butylproline *N'*-Methylamides", Beausoleil, E.; Lubell, W. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12902.
- 23 "An Alternative Procedure for the Aluminum-Mediated Conversion of Esters to Amides", Levin, J. I.; Turos, E.; Weinreb, S. M. *Synth. Commun.* **1982**, *12*, 989 et les références contenues.
- 24 (a) Le programme MacroModel: "MacroModel-An Integrated Software System for Modeling Organic and Bioorganic Molecules using Molecular Mechanics", Mohamadi, F.; Richards, N. G. J.; Guida, W. C.; Liskamp, R.; Lipton, M.; Caufield, C.; Chang, G.; Hendrickson, T.; Still, W. C. *J. Comput. Chem.* **1990**, *11*, 440; (b) La recherche conformationnelle: "An Internal Coordinate Monte Carlo Method for Searching Conformational Space", Chang, G.; Guida, W. C.; Still, W. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4379; (c) Le modèle de solvation GB/SA: "A Rapid Approximation to the Solvent Accessible Surface Areas of Atoms", Hasel, W.; Hendrickson, T. F.; Still, W. C. *Tetrahedron Comput. Method.* **1988**, *1*, 103; "Semianalytical Treatment of Solvation for Molecular Mechanics and Dynamics", Still, W. C.; Tempczyk, A.; Hawley, R. C.; Hendrickson, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6127; (d)

Pour de plus amples informations sur le programme et ses diverses applications voir le site internet <http://www.columbia.edu/cu/chemistry/mmod/mmod.html> et les références contenues.

- 25 (a) "A New Force Field for Molecular Mechanical Simulation of Nucleic Acids and Proteins", Weiner, S. J.; Kollman, P. A.; Case, D. A.; Singh, U. C.; Chio, C.; Alagona, G.; Profeta, S.; Weiner, P. J. *Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 765; "An All-Atom Force Field for Simulations of Proteins and Nucleic Acids", Weiner, S. J.; Kollman, P. A.; Case, D. A. *J. Comput. Chem.* **1986**, *7*, 230; (b) "AMBER* Torsional Parameters for the Peptide Backbone", McDonald, D. Q.; Still, W. C. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 7743; (c) "A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids and Organic Molecules", Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Gould, I. R.; Merz, K. M.; Ferguson, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5179.
- 26 (a) "Intramolecular Hydrogen Bonding in Derivatives of β -Alanine and γ -Amino Butyric Acid: Model Studies for the Folding of Unnatural Polypeptide Backbone", Gellman, S. H.; Dado, G. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1054; (b) "Conformation-Directing Effects of a Single Intermolecular Amide-Amide Hydrogen Bond: Variable-Temperature NMR and IR Studies on a Homologous Diamide Series", Gellman, S. H.; Dado, G. P.; Liang, G.-B.; Adams, B. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1164 et les références contenues.
- 27 " γ -Turn Conformation Induced by α,α -Disubstituted Amino Acids with a Cyclic Six-Membered Side Chain", Paradisi, M. P.; Torrini, I.;

- Zecchini, G. P.; Lucente, G.; Gavuzzo, E.; Mazza, F.; Pochetti, G. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 2379.
- 28 "Calibration of the Angular Dependence of the Amide Proton-C α Proton Coupling Constants, $^3J_{\text{HN}\alpha}$, in a Globular Protein", Pardi, A.; Billeter, M.; Wüthrich, K. *J. Mol. Biol.* **1984**, *180*, 741.
- 29 (a) "Thermodynamic Analysis of β -Turn Formation in ProAla, Pro-Gly, and Pro-Val Model Peptides in Methylene Chloride", Liang, G. B.; Rito, C. J.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *115*, 4440; (b) "Conformation-Directing Effects of a Single Intramolecular Amide-Amide Hydrogen Bond: Variable-Temperature NMR and IR Studies on a Homologous Diamide Series", Gellman, S. H.; Dado, G. P.; Liang, G.-B.; Adams, B. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1054.
- 30 " β -Turns in Bridged Proline-Containing Cyclic Peptide Models", Hollosi, M.; Kover, K. E.; Holly, S.; Radics, L.; Fasman, G. D. *Biopolymers* **1987**, *26*, 1555.
- 31 "Studies of Theoretical Circular Dichroism of Polypeptides: Contributions of β -Turns", Woody, R. M., in *Peptides, Polypeptides and Proteins*, Blout, E. R.; Boverly, F. A.; Goodman, M., Loton, N., eds., John Wiley, New York, **1974**, pp. 338-350.
- 32 "Studies on the β -Turn of Peptides. II. Syntheses and Conformational Properties of *N*-(2,4-Dinitrophenyl) Tetrapeptides *p*-Nitroanilides Related to the β -Turn part of Gramicidin S", Nagai, U.; Sato, K., *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1983**, *56*, 1527.
- 33 "Studies on the β -Turn of Peptides. I. β -Turn Preferences of Tetrapeptide Sequences as Analyzed by CD Spectra of their Dnp-pNA Derivatives", Sato, K.; Kawai, K.; Nagai, U. *Biopolymers* **1981**, *20*, 1921.

- 34 "Studies on the β -Turn of Peptides. VI. NMR Study on the Conformations of *N*-(2,4-Dinitrophenyl) Tetrapeptide *p*-Nitroanilides Related to the β -Turn Part of Gramicidin S", Nagai, U.; Sato, K., *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1983**, *56*, 3323.
- 35 "Comments on the Use of a Dichromophoric Circular Dichroism Assay for the Identification of β -Turns in Peptides", Baldwin, J. E.; Claridge, T. D. W.; Hulme, C.; Rodger, A.; Schofield, C. J. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, *44*, 180.
- 36 "The OPLS Potential Functions for Peptides. Energy Minimizations for Crystals of Cyclic Peptides and Crambin", Jorgensen, W. L.; Tirado-Rives, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1657.

CHAPITRE 6

*Synthèse et évaluation d'un analogue de la Gramicidine S
incorporant l'acide aminé indolizidinone.***6.1 Introduction.**

Les analyses conformationnelles par modélisation moléculaire des dérivés (3*S*, 6*S*, 9*S*)-*N'*-méthyl 2-oxo-3-acétamido-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxamide et du stéréoisomère (6*R*) ont prédit que chacun des deux isomères peut fonctionner comme un substitut peptidomimétique des résidus *i*+1 et *i*+2 dans une conformation de repliement β de type II', car les angles de torsion ϕ et ψ sont similaires à ceux du type II' idéal.

Les peptidomimétiques sont utilisés pour étudier les fragments peptidiques et les structures secondaires dans les domaines principaux suivants qui sont les neuropeptides (opiacés, tachykinines), les antibiotiques (gramicidine S), les hormones (somatostatine, angiotensine II, hormone de croissance humaine) et les enzymes (métalloprotéases, protéases serine ou aspartyle). Pour étudier la capacité de l'AAI d'induire un repliement β de type II', le choix s'est porté sur la synthèse d'un analogue de la gramicidine S. Le remplacement des résidus D-Phe-Pro de

la gramicidine S par des peptidomimétiques est devenu une bonne méthode pour mesurer la capacité de ces motifs à induire une conformation de repliement β de type II'. La gramicidine S, qui est un composé très étudié soit sous sa forme naturelle soit sous la forme d'analogues, peut servir non seulement comme un modèle physique mais aussi comme un système biologique modèle. Ce chapitre présente les études relatives à la synthèse de l'analogue [AAI^{4-5,4'-5'}]-GS, qui incorpore deux résidus AAI, pour permettre d'effectuer des analyses biologiques et des études conformationnelles nécessaires pour prouver notre concept de peptidomimétique.

6.2 Article.

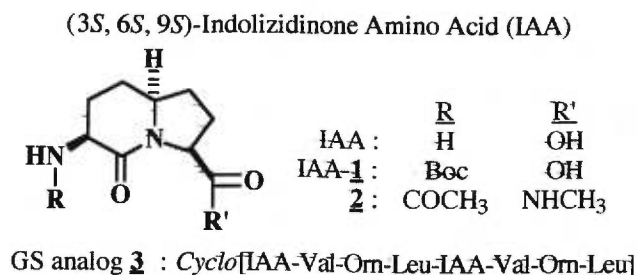
Use of Azabicycloalkane Amino Acids to Stabilize β -Turn Conformations in Model Peptides and Gramicidin S.**H.-G. Lombart and W. D. Lubell***In Peptides: Chemistry, Structure and Biology,*

P. T. P Kaumaya and R. S. Hodges, Editors; ESCOM Sci. Pub. B.V.: Leiden,
The Netherlands, 1996, p.695.

Introduction

We recently communicated a methodology for synthesizing a new variety of conformationally rigid β -turn analogues via a Claisen condensation / reductive amination / lactam cyclization sequence [1]. Improvements in our procedure now provide gram quantities of enantiopure indolizidinone amino acids (IAAs). For example, (3*S*, 6*S*, 9*S*)-IAA-1 is synthesized in 45% overall yield from L-*N*-(phenylfluorenyl)glutamate γ -methyl α -*t*-butyl diester. From L-glutamate, we have also synthesized diastereomeric indolizidinone amino acids (3*S*, 6*R*, 9*S*)- and (3*S*, 6*S*, 9*R*)-IAA-1 [1]. In addition, we have synthesized (3*R*, 6*R*, 9*R*)- and (3*R*, 6*S*, 9*R*)-IAA-1 via the same strategy from D-glutamate. Since our route gives easy access to these azabicycloalkane amino acid analogs, we have turned to study the stereochemical and structural factors governing the conformational preferences of IAAs in peptides. In this

communication, we report syntheses of *N*-acetyl *N'*-methylamide **2** as well as gramicidin S (GS) analog **3**.



Results and Discussion

The incorporation of IAA-1 into peptides is readily accomplished using TBTU in acetonitrile [2]. *N*-Acetyl *N'*-methylamide (3*S*, 6*S*, 9*S*)-**2** was synthesized in 81% overall yield from IAA-1 by coupling to MeNH₂, cleaving the Boc group with HCl in dioxane, and acetylating with acetic anhydride. Model studies on **2** as well as preliminary conformational analysis using NMR and FT-IR indicate that (3*S*, 6*S*, 9*S*)-**2** can adopt γ -turn as well as type II' β -turn conformations. The γ -turn structure is predicted to be the lower energy conformation for amide **2**. In addition, the IAA stereochemistry influences the potential for β -turn formation which decreases in the order of (3*S*, 6*R*, 9*S*)- > (3*S*, 6*S*, 9*S*)- > (3*S*, 6*S*, 9*R*)-**2**.

Since the modification of GS with thiaindolizidinone amino acids was shown to give analogs possessing conformations and antibacterial activities similar to that of the native peptide [3,4], the replacement of the

D-Phe-Pro residues in GS by rigid dipeptide derivatives has become a standard method for measuring their capacity to serve as surrogates of the $i + 1$ and $i + 2$ residues in type II' β -turns [5-7]. Therefore, we have synthesized GS analog **3** using (3*S*, 6*S*, 9*S*)-IAA-1 in order to examine the consequence of replacing the thiaindolizidinone sulfur by a methylene group as well as the effect of inverting the bridgehead stereochemistry.

A convergent approach and solution-phase techniques were used to synthesize GS analog **3**. IAA-1 was coupled to H-Val-(Z)-Orn-Leu-allyl•TFA using TBTU and Et₃N in CH₃CN which provided Boc-IAA-Val-(Z)-Orn-Leu-allyl in 82% yield after chromatography on silica gel with 0-5 % MeOH in EtOAc as eluant. This material was then divided and independently deprotected at the C-terminal with Pd(PPh₃)₄ and morpholine in THF (94%) and at the N-terminal with TFA in CH₂Cl₂ (98%). The two tetrapeptides were then coupled with TBTU to furnish Boc-IAA-Val-(Z)-Orn-Leu-IAA-Val-(Z)-Orn-Leu-allyl in good yield. Deprotection of the allyl ester and Boc group as described above, followed by cyclization with TBTU furnished the protected GS analog ($m/z = [MH]^+$ 1282.3). No traces of dimeric nor polymeric products were observed by MS analysis of the cyclization reaction. Final hydrogenolysis of the Cbz protecting groups with Pd-black as catalyst in MeOH•HCl gave GS analog **3** ($m/z = [M]^+$ 1013.9). In conclusion, we have used IAA-1 to synthesize peptides **2** and **3**. Conformational analysis of **2** and **3** using NMR, FT-IR, and CD, as well as bioactivity studies of **3** are now in progress in order to further examine the use of IAAs to stabilize turn conformations in peptides.

Acknowledgments

This research was supported in part by the NSERC of Canada and FCAR of Québec. W.D.L. thanks Bio-Méga/Boehringer Ingelheim Recherche Inc. for a Young Investigator Award.

References

1. Lombart, H.-G. and Lubell, W.D., *J. Org. Chem.*, 59 (1994) 6147.
2. Lombart, H.-G. and Lubell, W.D., In Maia H.L.S. (Ed.), *Peptides 1994* (Proceedings of the 23rd European Peptide Symposium), Escom, Leiden, The Netherlands, 1995, p.696.
3. Sato, K. and Nagai, U., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, (1986) 1231.
4. Bach, A.C., II, Markwalder, J.A. and Ripka, W.C., *Int. J. Pept. Protein Res.*, 38 (1991) 314
5. De la Figuera, N., Jiménez, M. A., Biacs, M., García-López, M. T., González-Muñiz, R. and Andreu, D., In Maia H.L.S. (Ed.), *Peptides 1994* (Proceedings of the 23rd European Peptide Symposium), Escom, Leiden, The Netherlands, 1995, p.702.
6. Ripka, W.C., De Lucca, G.V., Bach, A.C., II, Pottorf, R.S. and Blaney, J.M., *Tetrahedron*, 49 (1993) 3609.
7. Graciani, N.R., Tsang, K.Y., McCutchen, S.L. and Kelly, J.W., *Bioorg. Med. Chem.* 2 (1994) 999.

6.3 Article.

***Exploring Relationships Between Peptide Conformation and
Biological Activity Using Indolizidinone Amino Acids.
Synthesis of a Potent Gramicidin S Analog Having Reduced
Hemolytic Activity.***

Henry-Georges Lombart[†] and William D. Lubell*

Journal of Organic Chemistry, 1997, Submitted for publication.

6.3.1 Abstract.

Methodology for the incorporation of indolizidinone amino acids (IAAs) into peptide structures has been developed as a novel means for exploring relationships between peptide conformation and biological activity. Targeting on gramicidin S (GS), solution-phase techniques have been used to introduce IAA residues at the turn regions of this antimicrobial peptide. Specifically, [IAA^{4-5,4'-5'}]-GS (1) was synthesized using (3*S*, 6*S*, 9*S*)-IAA (2) in order to study the relationships between turn geometry, activity and specificity of the native antimicrobial peptide. Peptide 1 and GS exhibit similar circular dichroism spectra as well as similar antibacterial and antifungal activities as GS. In addition, [IAA^{4-5,4'-5'}]-GS (1) possessed reduced hemolytic activity relative to GS. By demonstrating that the antieucaryotic and antibacterial activities of GS can

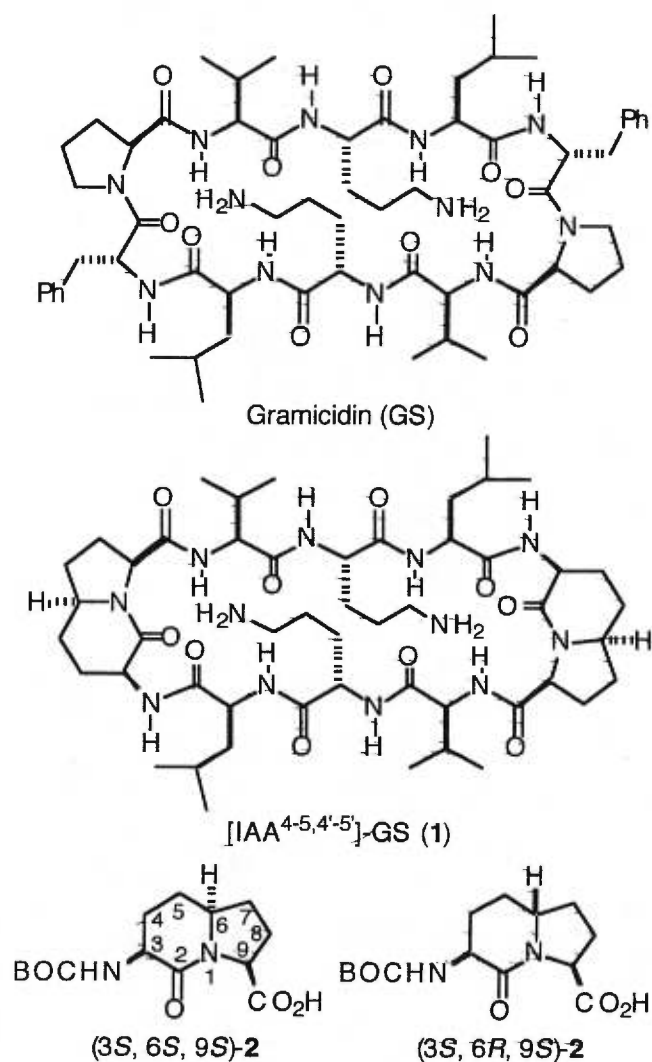
be dissociated through modification at the peptide turn regions, the introduction of IAAs into GS has furnished significant insight for the future design of antimicrobial peptides.

6.3.2 Introduction

As microbial organisms exhibiting clinically significant drug resistance have emerged,^{1,2} an urgent need has been created for new agents that combat infectious disease by novel modes of action.³⁻⁶ Among leads for the development of antibacterial agents, antimicrobial peptides are particularly attractive candidates because they function generally by mechanisms of action that are different from their non-peptide counterparts.^{6,7} Furthermore, antimicrobial peptides offer an economical means for confronting bacterial pathogens, because they can be assembled efficiently from inexpensive amino acid starting materials. For similar reasons, antimicrobial peptide libraries may be synthesized for drug discovery using combinatorial methods of diversification.⁸ Although the employment of antimicrobial peptides in clinic has been limited because of their non-specific cytotoxic activities, specifically hemolytic activity,^{6,7,9} analogs that retain high antimicrobial activity, but lose their eucaryotic cell killing activity may be synthesized by altering the natural peptide structure. For example, the synthesis of a retroenantio derivative of mellitin, the principal toxic component of bee venom, has produced a fully active antibacterial agent that exhibited no hemolytic effects.⁶ In

addition, structural modifications may also be made to improve the metabolic stability and bioavailability of antimicrobial peptides.

Figure 1.
Gramicidin S, Peptide 1 and IAAs 2



In this manuscript, we describe modification of the structure and specificity of the antimicrobial peptide gramicidin S (GS figure 1). We have synthesized and used indolizidinone amino acid 2 (IAA 2) to prepare [IAA^{4-5,4'-5'}]-GS (1) which exhibits similar antimicrobial activity to that of

native GS, yet reduced hemolytic activity.¹⁰ Gramicidin S [*cyclo*-(Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro)₂] is a naturally occurring peptide that displays potent antibacterial effects against both gram-negative and gram-positive bacteria.¹¹ Although GS is a topical antibiotic,^{12,13} its employment is restricted because of high hemolytic activity, as illustrated by the lysis of red blood cells.^{9,11} The antieucaryotic and antibacterial activities can be dissociated in GS analogs, as recently demonstrated by the synthesis and analysis of GS derivatives possessing varying ring sizes.⁹ The antibacterial activity of GS has been shown to be contingent on the peptide conformation in which the D-Phe-Pro residues adopt the central positions of type II' β -turns that stabilize an antiparallel β -pleated sheet.¹⁴ The structure of GS is amphiphatic possessing charged ammonium groups of the ornithine residues projecting from one side of the sheet and neutral hydrophobic residues extending from the opposite side. Although the mode of GS action is not understood, these structural features are believed to enable the peptide to bind to the cell membrane of sensitive microorganisms and thereby cause changes in membrane permeability.¹⁴⁻

21

Numerous analogues of GS have previously been synthesized with the aim of producing more potent antibiotic peptides.^{20,21} Although many structural modifications have resulted in decreased activity, an important exception was found when the (3*S*, 6*S*, 9*S*)-7-thiaindolizidinone amino acid, BTD,²² was introduced at the turn regions of GS.^{23,24} The resulting analogs [BTD^{4-5,4'-5'}]-GS and [BTD⁴⁻⁵]-GS possessed spectral characteristics and antibacterial activities similar to that of the native

peptide.^{23,24} Several rigid dipeptide derivatives have since been used to replace the D-Phe-Pro residues in GS.²⁵⁻²⁹ Similar antibiotic activity as well as matching spectral properties to that of GS have been suggested as a measurement of the capacity of these rigid dipeptide mimics to serve as surrogates of the $i + 1$ and $i + 2$ residues of type II' β -turns.²³⁻²⁹

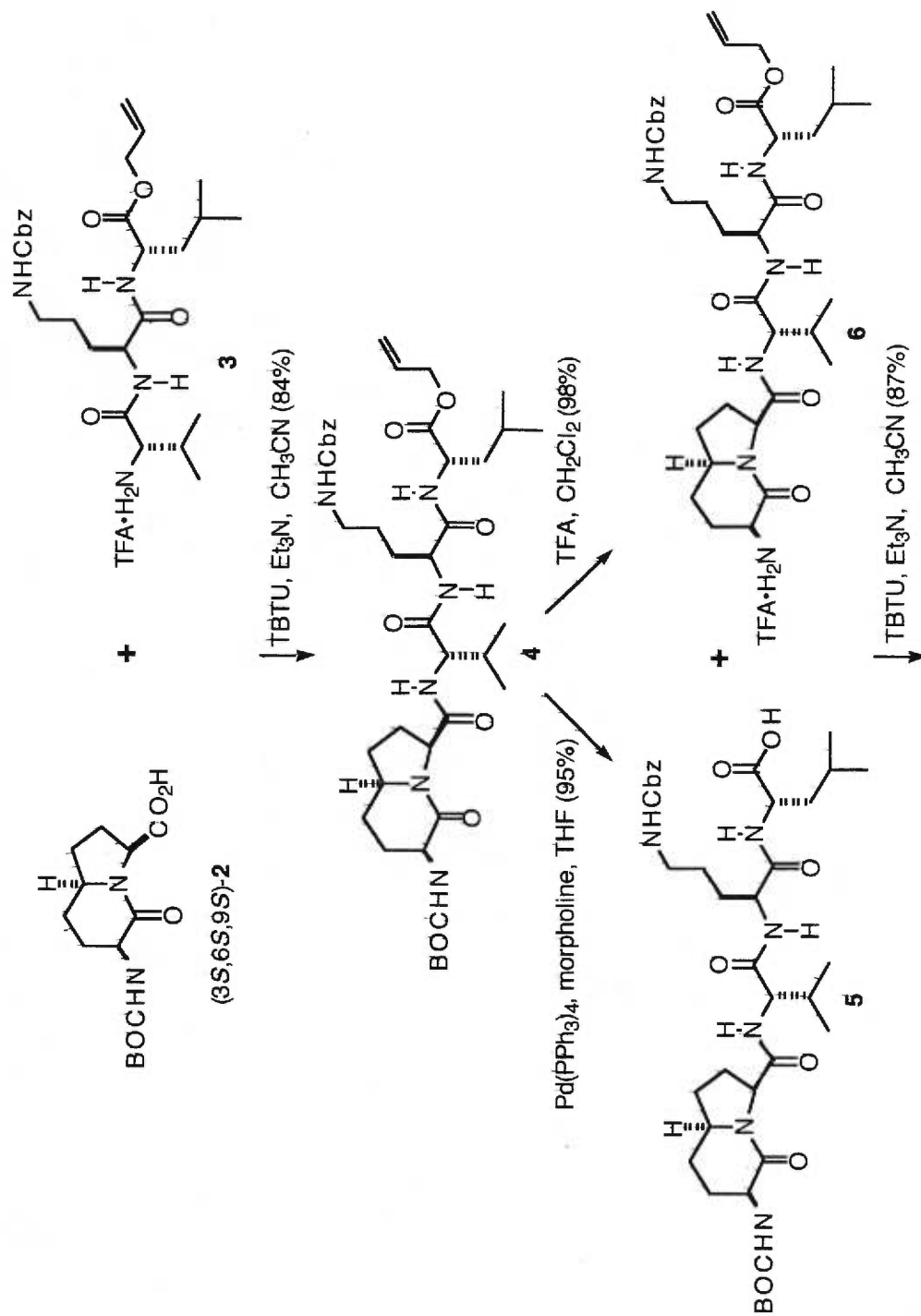
With an expedient method for synthesizing enantiopure indolizidinone amino acids in hand,^{30,31} we selected to initially synthesize GS analogues using 2-oxo-3-*N*-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic acids (**2**, Figure 1) in order to demonstrate their use in peptide synthesis.¹⁰ By introducing the (3*S*, 6*S*, 9*S*)-IAA isomer into [IAA^{4-5,4'-5'}]-GS (**1**), we have begun to examine the consequence of IAA stereochemistry on turn geometry in order to better define the relationship between peptide conformation and antimicrobial activity. Although the concave (3*S*, 6*S*, 9*S*)-IAA isomer was predicted to adopt a type II' β -turn conformation less effectively than its convex (3*S*, 6*R*, 9*S*)-isomer in model studies of the *N*-acetamido indolizidinone *N'*-methyamides,¹⁰ we began our study with this analog in order to observe the consequences of ring-fusion stereochemistry on conformation and activity. Increased metabolic stability is expected to be an added benefit of studying the all carbon indolizidinone analogs which do not possess the masked aldehyde found in their 7-thiaindolizidinone counterparts. Furthermore, by testing [IAA^{4-5,4'-5'}]-GS analogues for activity against yeast, gram-positive and gram-negative bacteria, as well as for hemolytic activity, we may investigate the relationship between peptide conformation and antimicrobial specificity.

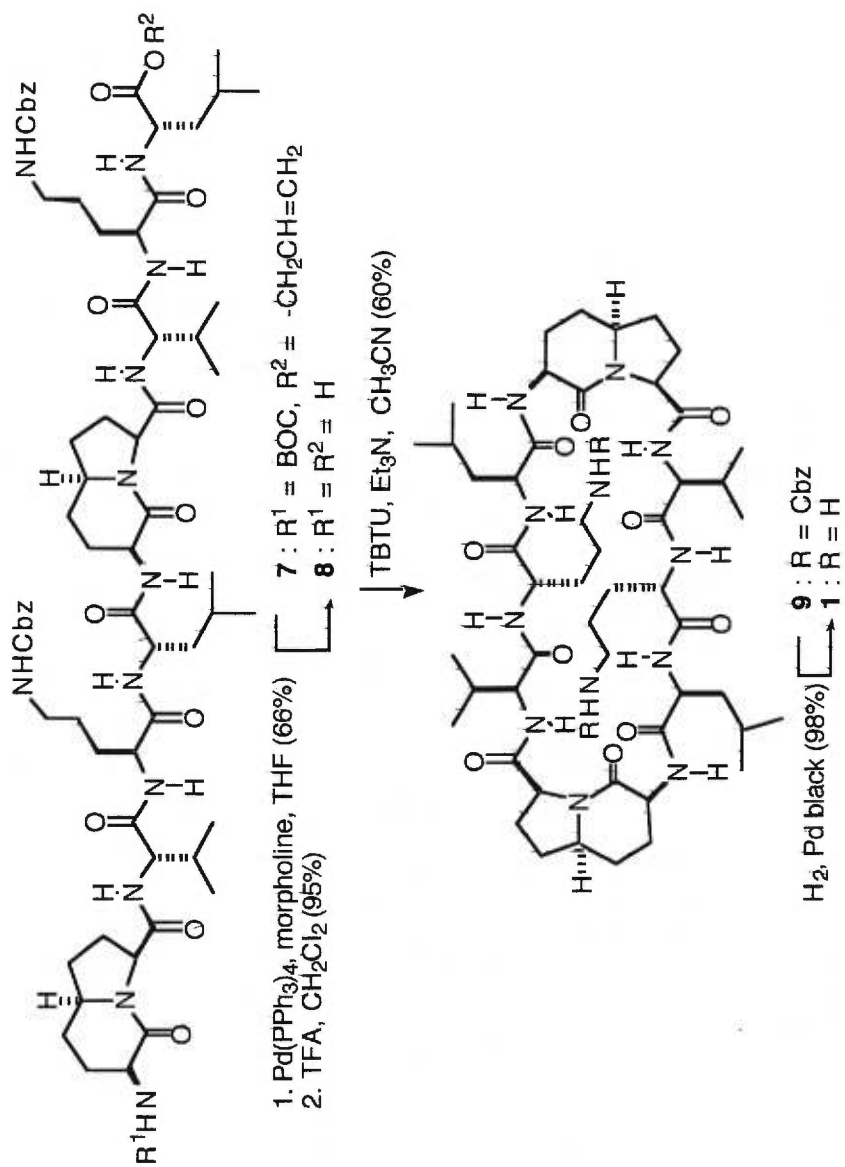
6.3.3 Synthesis of [IAA^{4-5,4'-5'}]-GS (1)

A convergent approach and solution-phase techniques were used to synthesize [IAA^{4-5,4'-5'}]-GS (1, Scheme 1).¹⁰ The starting material, enantiopure (3*S*, 6*S*, 9*S*)-indolizidinone *N*-(BOC)amino acid **2** was efficiently synthesized via our Claisen condensation / reductive amination / lactam formation sequence from glutamic acid as chiral educt.^{30,31} The tripeptide **3**, Val-(Cbz)Orn-Leu-Oallyl•TFA, was synthesized from L-leucine allyl ester *p*-toluenesulfonate,³² L-*N*^α-(BOC)-*N*^δ-(Cbz)ornithine and L-*N*-(BOC)valine in four steps and 65% overall yield using benzotriazol-1-yl-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate (TBTU) for peptide couplings,³³⁻³⁵ TFA for BOC group removals, and chromatography on silica gel to isolate several intermediates as described in detail in the experimental section.

Indolizidinone amino acid **2** was coupled to tripeptide **3** using TBTU and Et₃N in CH₃CN to provide tetrapeptide **4**, BOC-IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu-Oallyl, in 84% yield after chromatography on silica gel with EtOAc in hexane as eluant. The tetrapeptide material was then divided into two portions. In one pot, the C-terminal allyl ester of **4** was deprotected with Pd(PPh₃)₄ and morpholine in THF to furnish carboxylic acid **5** in 95% yield.³⁶ In another pot, the *N*-terminal BOC group of **4** was removed quantitatively with TFA in CH₂Cl₂ to give amine **6** as its trifluoroacetate salt. The two tetrapeptides, **5** and **6**, were then coupled with TBTU to furnish the protected octapeptide **7**, BOC-IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu-IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu-Oallyl, in 87% yield.

Scheme 1. Synthesis of Peptide 1





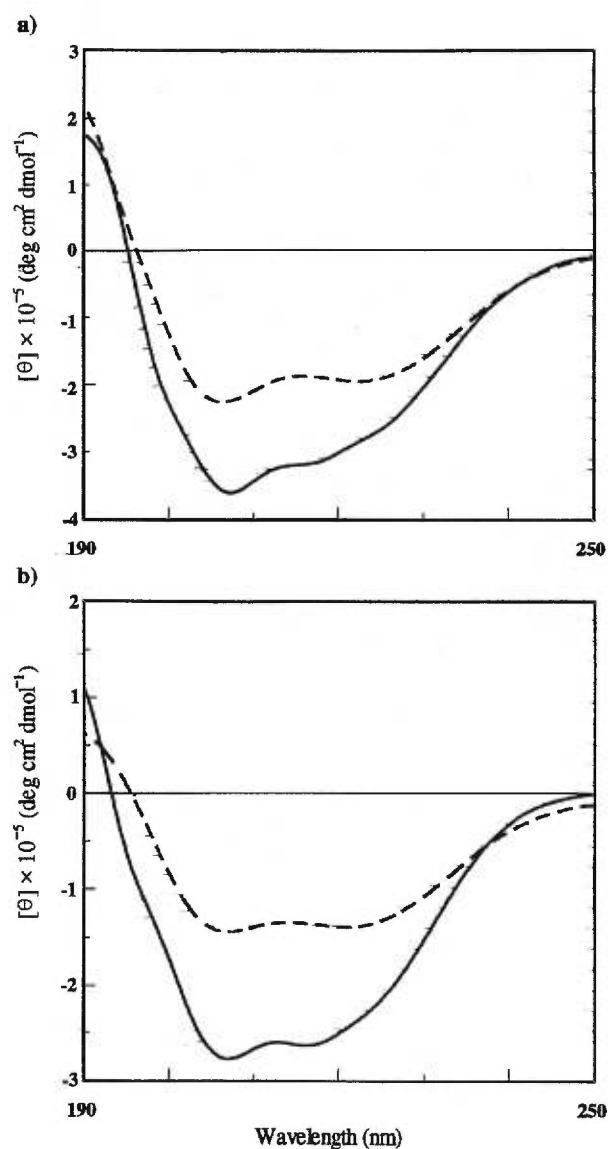
Similar deprotection conditions were then used to remove the allyl ester and BOC groups of peptide 7 in 66% and 95% respective yields and furnished linear precursor 8. Macrocyclization was performed at high dilution using TBTU and 1-hydroxybenzotriazole (HOBT) with diisopropylethylamine in DMF and was monitored by analytical HPLC which showed complete reaction after 1 h. A crude product was isolated in 85% recovery after aqueous work-up. Subsequent purification using reverse-phase HPLC and lyophilization of the collected fractions gave the pure protected GS analogue 9 in 60% yield ($m/z = [MH]^+ 1282.3$). No traces of dimeric nor polymeric products were observed by MS analysis of the crude cyclization material. The use of TBTU to activate the carboxylate and effect macrocyclization in good yield is a notable alternative to traditional methods that involve carboxylate activation via *N*-hydroxysuccinimide esters and azides prior to cyclization.²¹ Hydrogenolysis of the Cbz protecting groups, using Pd-black as catalyst in MeOH•HCl,²¹ gave quantitatively [IAA^{4-5,4'-5'}]-GS (1, $m/z = [M]^+ 1013.7$) as a white hydrochloride salt after isolation by reverse phase HPLC (Scheme 1).

6.3.4 Circular Dichroism Spectral Analysis

The circular dichroism (CD) spectra for peptide 1 and for GS are presented in Figure 2.^{37,38} In methanol, the spectral characteristics of [IAA^{4-5,4'-5'}]-GS are similar to those of GS (Figure 2a). Both exhibit a negative maximum situated at ca. 207 nm, a positive maximum at ca. 190

and a negative shoulder in methanol. Overall, the similarities between the spectra of **1** and GS suggest that the peptides adopt similar conformations in methanol.

Figure 2. Circular Dichroism Spectra of [IAA^{4-5,4'-5'}]-GS (---) and GS (—) in a) MeOH and b) H₂O.



In water, the CD spectra for peptide 1 and GS show bands similar to those described above (Figure 2b). However, the spectrum for peptide 1 in water displays nearly equal negative band intensities for the maximum and the shoulder. Such changes in band intensity with variation of solvent indicates that peptide 1 is more flexible than GS and suggests that 1 adopts different preferred conformations in methanol and water.

6.3.5 Antimicrobial and Hemolytic Activities

The antimicrobial and hemolytic activities of peptide 1 and GS were compared using liquid-based assays.¹¹ A liquid broth assay was used to evaluate the antimicrobial activity of [IAA^{4-5,4'-5'}]-GS, because in this solution-based assay, GS had been found to show activity against gram-negative bacteria as well as antifungal activity, two characteristics that were previously not detected in examinations of GS using the more common agar-based assays.¹¹ The antibacterial and antifungal activities of [IAA^{4-5,4'-5'}]-GS (1) and GS are presented as the lowest concentration of compound necessary for the >50% inhibition of the growth of the microorganism (MICs in $\mu\text{g}/\text{mL}$) in Table 1. In general, peptide 1 exhibits similar antibacterial and antifungal activities to those exhibited by GS. The MIC values for 1 against gram-negative and gram-positive bacteria range usually from equal potency down to 4-fold less potency than GS. In the antifungal assay, peptide 1 was equal in potency to GS against *Candida albicans*.

Table 1.
Antimicrobial Activity (MIC: $\mu\text{g}/\text{mL}$)
of Gramicidin S (GS) and [IAA^{4-5,4'-5'}]-GS (1)

	GS	1
Gram-negative Bacteria		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> H187	25	>200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> H188	6.2	12.5
<i>Escherichia coli</i> UB1005	12.5	12.5
<i>Escherichia coli</i> DC2	6.2	12.5
<i>Salmonella typhimurium</i> C587	12.5	25
<i>Salmonella typhimurium</i> C610	12.5	25
Gram-positive Bacteria		
<i>Staphylococcus aureus</i> SAP0017	1.5	6.2
<i>Staphylococcus aureus</i> K147	1.5	6.2
<i>Staphylococcus epidermidis</i> c621	3.1	6.2
<i>Bacillus subtilis</i>	3.1	12.5
<i>Enterococcus faecalis</i>	3.1	3.1
<i>Corynebacterium xerose</i>	0.8	1.5
Yeast		
<i>Candida albicans</i> CAND105	6.2	6.2

Table 2. Hemolytic Activity ($\mu\text{g} / \text{mL}$)

	4 h	24 h
Gramicidin S (GS)	25	12.5
[IAA ^{4-5,4'-5'}]-GS (1)	100	50

The concentration of [IAA^{4-5,4'-5'}]-GS required for complete lysis of red blood cells was determined after four and after twenty-four hours (Table 2). In this assay, peptide 1 exhibited 4-fold less hemolytic activity than GS. The antieucaryotic and antimicrobial activities of GS can thus be dissociated through modification at the peptide turn regions using (3S, 6S, 9S)-indolizidinone amino acid.

6.3.6 Discussion and Conclusion

We have developed methodology for incorporating indolizidinone amino acids into peptide structures. The concave azabicycloalkane amino acid, (3*S*, 6*S*, 9*S*)-2 was introduced at the turn regions of the antimicrobial peptide gramicidin S using solution-phase techniques employing the coupling reagent TBTU. The resulting peptide, [IAA^{4-5,4'-5'}]-GS (1), was then examined using circular dichroism spectroscopy and evaluated for antibacterial, antifungal and hemolytic activities in order to study the influence of turn geometry on the potency and specificity of the native peptide.

The significance of the type II' β -turn conformation to the antibacterial potency of GS against gram-positive organisms has previously been illustrated by replacement of the D-Phe-Pro residues with different peptide sequences,^{20,21,37,39-42} as well as with peptide mimics.²¹⁻²⁹ Antibacterial activity against gram-positive bacteria persisted or was slightly decreased by modifications that maintained the type II' geometry; however, activity was lost when the type II' β -turn was significantly perturbed. In GS, the type II' β -turns stabilize an anti-parallel β -pleated sheet geometry essential for antibacterial activity by favoring formation of 10- and 14-membered hydrogen-bonds.^{43,44} Stabilization of such a sheet structure by an organic nucleator has also led to antibacterial activity in a linear analogue.²⁸ Potent antibacterial analogues exhibiting similar CD and NMR spectra to that of native GS have also been generated by the

incorporation of the convex thiaindolizidinone amino acid, BTD, at the turn regions of GS.^{23,24}

In order to examine the effect of the configuration of indolizidinone amino acid **2** on the conformation and bioactivity of GS, we synthesized [IAA^{4-5,4'-5'}]-GS (**1**) using the concave (3*S*, 6*S*, 9*S*)-isomer. Circular dichroism spectroscopy of [IAA^{4-5,4'-5'}]-GS (**1**) in solution demonstrated that solvent composition influenced the preferred conformation of peptide **1**. The CD spectrum of **1** was similar to that of GS in methanol, yet the CD band intensities of **1** differed from those of GS in water. Relative to GS, peptide **1** exhibited equal potency down to 4-fold less activity against gram-positive and gram-negative bacteria as well as the same antifungal activity. On the other hand, peptide **1** showed reduced hemolytic activity, 4-fold less than GS. The antimicrobial and antieucaryotic cytolytic activities of GS were thus differentiated by this modification at the peptide turn region.

Besides influencing peptide conformation, substitution of (3*S*, 6*S*, 9*S*)-**2** for the D-Phe-Pro residues also removed the aromatic side-chains at the turn regions of GS. Replacements of D-phenylalanine by D-cyclohexylalanine and by D-alanine in GS have caused slight reductions in antibacterial potency,³⁷ indicating that aromatic groups may be removed with little loss in potency as long as the conformation and hydrophobicity at the turn region are retained. In one study, hemolytic activity has been shown to be contingent on the aromatic character at the turn region.¹¹ The reduced activity of peptide **1** may thus result in part from removal of

the aromatic side-chains, which may have more pronounced consequences on antieucaryotic rather than antimicrobial activity.

The relationships between the turn conformations in GS and this peptide's antimicrobial potency and cytolytic specificity have been highlighted via the use of IAA 2 in the synthesis of [IAA^{4-5,4'-5'}]-GS (**1**). Analysis of peptide **1** by CD has revealed that greater conformational liberty can result through the introduction of local structural constraint between adjacent residues at the β -turn regions of GS. This effect is presently being examined by NMR. The efficient introduction of IAA 2 into peptide **1** as well as the interesting biological profile of **1**, both support future use of IAAs to explore turn regions in various bioactive peptides. Moreover, because our general strategy for synthesizing IAA 2 can deliver various ring-sized azabicyclo[X.Y.0]alkane amino acids with stereocontrol and capacity for attaching side-chain groups onto ring carbons,^{25,31} the potential exists to use a spectrum of these heterocyclic amino acids for studying systematically conformational effects at peptide turn regions. We are using Gramicidin S to develop this approach in order to provide insight for the future design of peptide mimics as well as to produce novel antimicrobial agents for combating infectious disease.

6.3.7 Experimental Section

General: Unless otherwise noted all reactions were run under argon atmosphere and distilled solvents were transferred by syringe. Tetrahydrofuran (THF) was distilled from sodium / benzophenone immediately before use; CH₂Cl₂, DMF and acetonitrile were distilled from CaH₂; Et₃N was distilled from BaO. Final reaction mixture solutions were dried over Na₂SO₄. Melting points are uncorrected. Mass spectral data, HRMS and MS (EI and FAB), were obtained by the Université de Montréal Mass Spectroscopy facility. Unless otherwise noted, ¹H NMR (300/400 MHz) and ¹³C NMR (75/100 MHz) spectra were recorded in CDCl₃. Chemical shifts are reported in ppm (δ units) downfield of internal tetramethylsilane ((CH₃)₄Si), or relative to residual chloroform (δ 7.27 and 77 ppm) or residual methanol (δ 3.31 and 49.15 ppm). Analytical thin-layer chromatography (TLC) was performed by using 2 × 6 cm aluminum-backed silica plates coated with a 0.2 mm thickness of silica gel 60 F254 (Merck). Chromatography was performed using Kieselgel 60 (230-400 mesh). Analytical HPLC was performed on an inverse-phase column Prep DeltaPak HR C-18 (6 μm, 60 Å, 8 × 100 mm) with an inverse-phase precolumn Prep NovaPak HR C-18 (6 μm 60 Å) eluting with a linear gradient of 90:10:0.01 to 0:100:0.01 (v/v) H₂O:CH₃CN:TFA over 30 min with a flow rate of 1.5 mL min⁻¹ and detection at 220 nm. CD spectra were recorded on a JASCO J-710 spectropolarimeter using a quartz cell of 1 mm path length at 298 K, with 0.1 mM peptide concentration. The Cotton effect was evaluated by the molar ellipticity [θ]. Biological examination of 1 and GS, antimicrobial and hemolytic tests, were performed by Ms. Susan

W. Farmer and Professor Robert E. W. Hancock in the Department of Microbiology and Immunology at the University of British Columbia according to the protocols described in references 9 and 11.

BOC-(Cbz)Orn-Leu-OAllyl Ester. A solution of N^{α} -(BOC)- N^{δ} -(Cbz)ornithine (Sigma, 733 mg, 2 mmol, 100 mol %) in CH_3CN (16 mL) was treated with L-leucine allyl ester *p*-toluenesulfonate³² (914 mg, 2.2 mmol, 110 mol %) followed by Et_3N (0.62 mL, 44 mmol, 220 mol %) and TBTU (626 mg, 2.2 mmol, 110 mol %), and stirred at rt for 12 h when TLC (20:1 EtOAc:AcOH) showed complete consumption of starting material. Brine (50 mL) was added, the mixture was extracted with EtOAc (3 × 15 mL), the combined organic layers were washed with 2 N HCl (2 mL), H_2O (2 mL), 5% NaHCO_3 (2 mL) and H_2O (2 mL), dried, and evaporated to a solid that was chromatographed with 1:1 EtOAc:hexane as eluant to give a white solid, BOC-(Cbz)Orn-Leu-Oallyl ester (992 mg, 95 %): $R_f = 0.7$ (1:1 EtOAc:hexane); ^1H NMR δ 0.82 (m, 6 H), 1.3 (s, 9 H), 1.42-1.65 (m, 6 H), 1.75 (m br, 1 H), 3.04 (m, 1 H), 3.21 (m, 1 H), 4.27 (m, 1 H), 4.48 (m br, 3 H), 4.9 (m, 2 H), 5.15 (m, 2 H), 5.6 (d br, 1 H, $J = 15.6$ Hz), 5.65 (m br, 1 H), 5.7 (m, 1 H), 7.19 (s br, 1 H), 7.2 (s, 5 H); ^{13}C NMR δ 21.3, 22.5, 24.3, 25.5, 27.9, 29.6, 39.5, 40.4, 50.5, 52.7, 65.3, 66.1, 79.1, 118.1, 127.6, 128.0 (2 C), 131.4, 136.3, 155.4, 156.7, 172.0, 172.2.

BOC-Val-(Cbz)-Orn-Leu-OAllyl Ester. A solution of BOC-(Cbz)Orn-Leu-Oallyl ester (990 mg, 1.90 mmol, 100 mol %) in TFA (15 mL) and CH_2Cl_2 (30 mL) was stirred for 30 h at rt when TLC (1:1 EtOAc:hexane) showed complete disappearance of starting carbamate and the formation of a

ninhydrin positive product at a lower R_f value ($R_f = 0.07$ using 4:1:1 *n*-BuOH:AcOH:H₂O). The volatiles were removed under vacuum and the trifluoroacetate salt was dissolved in CH₃CN (16 mL), treated with *N*-(BOC)valine (454 mg, 2.09 mmol, 110 mol %), Et₃N (0.60 mL, 3.97 mmol, 210 mol %) and TBTU (595 mg, 2.09 mmol, 110 mol %), and stirred for 12 h at rt when TLC (4:1:1 *n*-BuOH:AcOH:H₂O) showed complete consumption of starting material. Brine (50 mL) was added, the mixture was extracted with EtOAc (3 × 15 mL), and the combined organic layers were washed with 2 N HCl (2 mL), H₂O (2 mL), 5% NaHCO₃ (2 mL) and H₂O (2 mL), dried, and evaporated to a solid that was chromatographed with 2:1 EtOAc:hexane as eluant to give a white solid that recrystallized from Et₂O in hexane. BOC-Val-(Cbz)Orn-Leu-Oallyl ester (826 mg, 70 %): $R_f = 0.68$ (4:1 EtOAc:hexanes); mp 141°C; $[\alpha]_D^{20} -8.7^\circ$ (*c* 1, CHCl₃); ¹H NMR δ 0.88-0.94 (m, 12 H), 1.42 (s, 9 H), 1.5-1.7 (m, 6 H), 1.82-1.95 (m br, 1 H), 2-2.14 (m, 1 H), 3.08-3.2 (m br, 1 H), 3.3-3.47 (m br, 1 H), 3.95-4.05 (m, 1 H), 4.50-4.55 (m, 1 H), 4.55-4.62 (m, 2 H), 4.62-4.74 (m br, 1 H), 5.08 (dd, 2 H), 5.18-5.35 (dd, 2 H), 5.29 (d br, 1 H), 5.8-5.95 (m br, 1 H), 6.95 (d br, 1 H), 7.15 (d br, 1 H), 7.2 (s, 5 H); ¹³C NMR δ 17.7, 19.2, 21.6, 22.8, 24.7, 26.1, 28.3, 29.8, 31.0, 39.6, 40.8, 50.9, 51.6, 59.8, 65.7, 66.6, 79.8, 118.6, 128.0, 128.4 (2 C), 131.6, 136.5, 155.8, 157.1, 171.6, 171.9, 172.3; HRMS calcd for C₃₂H₅₁N₄O₈ (MH⁺) 619.3706, found 619.3731.

Val-(Cbz)Orn-Leu-Oallyl Ester Trifluoroacetate (3) was prepared from BOC-Val-(Cbz)Orn-Leu-Oallyl ester (235 mg, 0.380 mmol) using the protocol for BOC group removal described above. Val-(Cbz)Orn-Leu-Oallyl ester trifluoroacetate (**3**, 150 mg, 98 %): $R_f = 0.07$ (4:1:1 *n*-

BuOH:AcOH:H₂O); ¹H NMR δ 0.85 (m, 6 H), 0.95 (m, 6 H), 1.5-1.7 (m, 6 H), 1.7-1.8 (m br, 1 H), 2.1-2.3 (m, 1 H), 3-3.2 (s br, 2 H), 3.9-4.0 (s br, 1 H), 4.45-4.55 (m, 3 H), 4.70 (s br, 1 H), 5.05 (s br, 2 H), 5.2-5.4 (dd, 2 H), 5.4 (d br, 1 H), 5.8-5.9 (m, 1 H), 7.3 (s, 5 H), 6.95 (d br, 1 H), 7.15 (d br, 1 H); HRMS calcd for C₂₇H₄₃N₄O₆ (MH⁺) 519.3182, found 519.3180.

BOC-IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu-OAllyl Ester (4) was prepared from trifluoroacetate **3** (237 mg, 0.380 mmol, 103 mol %) and (3*S*, 6*S*, 9*S*)-methyl 2-oxo-3-*N*-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate, ((3*S*, 6*S*, 9*S*)-2, 110.3 mg, 0.370 mmol, 100 mol %) using the coupling procedure described above. Chromatography with 1:5 hexane:EtOAc as eluant gave a white solid that recrystallized from Et₂O/hexane. BOC-IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu-Oallyl ester (**4**, 249 mg, 84 %): R_f = 0.41 (EtOAc); mp 91-92°C; [α]²⁰_D -36.9° (*c* 1, CHCl₃); ¹H NMR δ 0.84-0.88 (m, 12 H), 1.37 (s, 9 H), 1.45-1.7 (m, 8 H), 1.77-1.9 (m, 2 H), 2-2.15 (m, 4 H), 2.2-2.3 (m, 2H), 3.1 (m br, 1 H), 3.3 (m br, 1 H), 3.55 (m, 1 H), 3.95 (m, 1 H), 4.15 (dd, 1 H), 4.45-4.52 (m, 3 H), 4.56 (m, 2 H), 5.0 (dd, 2 H), 5.2 (dd, 2 H), 5.35 (s br, 1 H), 5.35 (d, 1 H), 5.8 (m br, 1 H), 6.9 (d br, 2 H), 7.2-7.3 (m, 6 H); ¹³C NMR δ 17.9, 19.3, 21.5, 22.7, 24.6, 25.7, 26.6, 27.5, 28.2, 28.3, 29.2, 30.2, 32.2, 39.9, 40.5, 49.7, 50.8, 52.1, 57.4, 58.7, 59.8, 65.5, 66.4, 79.6, 118.3, 127.9, 128.2, 128.3, 131.7, 136.5, 155.6, 156.8, 170.3, 171.0, 171.2, 171.5, 172.2; HRMS calcd for C₄₁H₆₃N₆O₁₀ (MH⁺) 799.4607, found 799.4573.

BOC-IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu (5) A solution of allyl ester **4** (60 mg, 0.075 mmol) in THF (1.3 mL) was treated with Pd(PPh₃)₄ (8.7 mg, 0.0075 mmol, 10 mol%) and morpholine (65 μL, 0.75 mmol, 1000 mol%) then stirred for 4

h when TLC (20:1 EtOAc:AcOH) showed complete disappearance of **4**. The solvent was evaporated, the residue was taken up in 2.4 mL of CH₂Cl₂ and washed with 2N HCl (3 × 2.4 mL), dried and evaporated to a solid that was chromatographed with 1:5 isopropanol:CHCl₃ as eluant to give BOC-IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu (**5**, 54 mg, 95 %) as a white solid (on larger scale, 135 mg of **4** yielded 76% of **5**): R_f = 0.27 (3:1 CHCl₃:isopropanol); R_f = 0.24 (1:1 EtOAc:MeOH); ¹H NMR (CD₃OD) δ 0.89-0.98 (m, 12 H), 1.44 (s, 9 H), 1.52-1.72 (m, 8 H), 1.74-1.89 (m br, 2 H), 1.98-2.18 (m, 6 H), 3.08-3.20 (m br, 2 H), 3.66 (m br, 1 H), 4.07-4.15 (m, 2 H), 4.37 (m, 1 H), 4.42-4.48 (m br, 1 H), 5.06 (m, 2 H), 7.29-7.3; ¹³C NMR (CD₃OD) δ 19.2, 20.1, 22.1, 23.8, 26.1, 27.0, 27.3, 28.9, 29.4, 30.2, 30.5, 31.9, 33.0, 41.4, 42.4, 50.7, 53.7, 54.3, 60.3, 60.7, 61.0, 67.6, 80.7, 129.0, 129.1, 129.6, 138.5, 158.1, 159.0, 171.0, 173.6 (2 C), 174.4, 179.0; HRMS calcd for C₃₈H₅₉N₆O₁₀ (MH⁺) 759.4293, found 759.4322.

IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu-Oallyl Ester Trifluoroacetate (6). A solution of BOC-IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu-Oallyl ester (**4**, 124 mg, 0.155 mmol) in CH₂Cl₂ (6 mL) was treated with TFA (1.5 mL) at 25 °C and stirred for 15 h when TLC (4:1 EtOAc:hexanes) showed complete disappearance of starting material and the formation of a new ninhydrin positive product at a lower R_f value (R_f = 0.07). The volatiles were evaporated and the salt was used directly in the next reaction. IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu-Oallyl ester trifluoroacetate (**6**, 123 mg, 98 %): R_f = 0.07 (4:1:1 *n*-BuOH:AcOH:H₂O); ¹H NMR (CD₃OD) δ 0.88-0.97 (m, 12 H), 1.66-1.74 (m, 8 H), 1.78-1.95 (m, 2 H), 2.04-2.19 (m, 5 H), 2.34 (m, 1H), 3.10-3.21 (m, 2 H), 3.72 (m, 1 H), 3.94 (t, 1 H, *J* = 8.1), 4.18 (m, 1 H), 4.45-4.62 (m, 5 H), 5.06 (m, 2 H), 5.21 (dd, 1 H, *J* = 1.3, 10.5), 5.30 (dd, 1 H, *J* = 1.5, 17.2), 5.90 (m, 1 H), 7.27-7.32 (m, 5 H); ¹³C NMR

(CD₃OD) δ 18.9, 19.9, 21.9, 23.4, 25.6, 25.9, 26.9, 27.1, 30.57, 30.64, 32.2, 32.9, 41.2, 41.5, 49.8, 52.2, 53.7, 59.2, 60.4, 60.9, 66.9, 67.5, 119.0, 128.9, 129.1, 129.6, 133.3, 138.4, 159.0, 167.2, 173.4, 173.7 (2 C), 174.0; HRMS calcd for C₃₆H₅₅N₆O₈ (MH⁺) 699.4081, found 699.4101.

BOC-IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu-IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu-Oallyl Ester (7).

Trifluoroacetate **6** (123 mg, 0.151 mmol, 120 mol%) in CH₃CN (1.5 mL) was treated with BOC-IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu (**5**, 96 mg, 0.127 mmol, 100 mol %) followed by TBTU (49.4 mg, 0.152 mmol, 120 mol %) and Et₃N (40 μ l, 0.279 mmol, 220 mol %), and stirred at rt for 12 h. Brine (2 mL) was added, the mixture was extracted with EtOAc (3 \times 2 mL), and the combined organic layers were washed with 2 N HCl (0.2 mL), H₂O (0.2 mL), 5% NaHCO₃ (0.2 mL) and H₂O (0.2 mL), dried, and evaporated to a solid that was chromatographed with a gradient of 0-10 % MeOH in EtOAc as eluant to give BOC-IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu-IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu-Oallyl ester (**7**, 158 mg, 87 %) as a white solid: R_f = 0.67 (5:1 EtOAc:AcOH); mp 142-143°C; $[\alpha]_D^{20}$ -50.5° (*c* 1, CHCl₃); ¹H NMR δ 0.8-1.05 (m, 24 H), 1.32 (s, 9 H), 1.5-1.8 (m, 16 H), 1.8-1.95 (m, 4 H), 2.0-2.2 (m, 8 H), 2.25-2.4 (m, 4H), 3-3.25 (m, 4 H), 3.45-3.68 (m, 3 H), 3.81 (m, 1 H), 3.95 (m, 1 H), 4.05 (m, 1 H), 4.15-4.38 (m, 5 H), 4.5 (m, 1 H), 4.55-4.6 (m, 2 H), 4.90-4.99 (dd, 2 H), 5.01-5.08 (dd, 2 H), 5.11 (dd, 1 H), 5.24 (dd, 1 H), 5.68 (s br, 1 H), 5.90 (s br, 1 H), 5.90 (m, 1 H), 6.1 (s br, 1 H), 6.5-8.0 (s, 7 H), 7.2-7.4 (m, 10 H); ¹³C NMR δ 19.2, 19.5, 20.1, 20.7, 21.0, 21.6, 22.9, 23.0, 24.3, 24.7, 25.0, 25.4, 25.6, 26.4, 27.0, 27.6, 28.3, 28.5, 29.2 (2 C), 29.6, 30.6, 31.4, 31.8, 32.0, 39.7, 40.3, 40.6, 41.1, 48.7, 50.8 (2 C), 52.7, 53.8, 54.5, 59.6, 60.3, 60.8 (2C), 61.6, 62.9, 65.5, 66.4, 66.6, 79.9, 117.9, 127.5, 127.8, 127.9, 128.3 (2 C), 128.5, 132.1, 136.5, 136.9, 155.9, 156.3, 156.6, 169.0, 170.1,

171.3, 171.7, 172.2, 172.4, 172.7, 173.1, 173.4, 173.6; MS calcd for $C_{74}H_{110}N_{12}O_{17}$ (M) 1439.77, found (M^+) 1439.9.

IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu-IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu Trifluoroacetate (8). A solution of protected peptide **7** (158 mg, 0.11 mmol) in THF (1.9 mL) was treated with $Pd(PPh_3)_4$ (12.7 mg, 0.011 mmol, 10% mol) and morpholine (96 μ l, 1.10 mmol, 1000 mol%), and stirred 4 h when TLC (5:1 EtOAc:MeOH) showed complete disappearance of ester **7**. The solvent was evaporated, the residue was taken up in 3 mL of CH_2Cl_2 , extracted three times with 2 mL of 2N HCl, dried and evaporated to a solid, that was filtered through a plug a silica gel. BOC-IAA-Val-(Cbz)-Orn-Leu-IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu (101 mg, 66 %): $R_f = 0.56$ (20:1 EtOAc:AcOH); retention time (R. T.) = 24.2 min; 1H NMR (CD_3OD) δ 0.8-1.05 (m, 24 H), 1.32 (s, 9 H), 1.5-1.8 (m, 16 H), 1.8-1.95 (m, 4 H), 2-2.2 (m, 8 H), 2.25-2.4 (m, 4 H), 3-3.25 (m, 4 H), 3.45-3.68 (m, 3 H), 3.81 (m, 1 H), 3.95 (m, 1 H), 4.05 (m, 1 H), 4.15-4.38 (m, 5 H), 4.5 (m, 1 H), 4.90-4.99 (dd, 2 H), 5.01-5.08 (dd, 2 H), 7.2-7.4 (m, 10 H); MS calcd for $C_{71}H_{106}N_{12}O_{17}$ (M) 1399.71, found (M^+) 1399.3.

A solution of BOC-IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu-IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu (96 mg) in CH_2Cl_2 (5 mL) was treated with TFA (1 mL) at 25°C and stirred for 15 h when TLC (20:1 EtOAc:AcOH) showed complete disappearance of starting material and the formation of a new ninhydrin positive product at a lower R_f value ($R_f = 0.47$, 4:1:1 *n*-BuOH:AcOH:H₂O). The volatiles were evaporated yielding trifluoroacetate salt **8**. Analysis by HPLC showed complete consumption of the BOC-derivative (R. T. = 22.2 min) and appearance of a new peak for **8** at R. T. = 19.3 min. IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu-IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu trifluoroacetate salt (**8**, 92 mg, 95 %): $R_f = 0.47$ (4:1:1

n-BuOH:AcOH:H₂O); ¹H NMR (CD₃OD) δ 0.8-1.05 (m, 24 H), 1.5-1.8 (m, 16 H), 1.8-1.95 (m, 4 H), 2-2.2 (m, 8 H), 2.25-2.4 (m, 4H), 3-3.25 (m, 4 H), 3.45-3.68 (m, 3 H), 3.81 (m, 1 H), 3.95 (m, 1 H), 4.05 (m, 1 H), 4.15-4.38 (m, 5 H), 4.5 (m, 1 H), 4.90-4.99 (dd, 2 H), 5.01-5.08 (dd, 2 H), 7.2-7.4 (m, 10 H); ¹³C NMR δ 20.5, 20.7, 21.6 (2 C), 23.5, 23.8, 25.2 (2 C), 27.5, 27.3, 27.6 (2 C), 28.8 (4 C), 30.5, 31.9, 32.2 (2 C), 33.7, 33.8, 32.4, 34.5, 42.9 (2 C), 43.4, 43.8, 53.6 (2 C), 54.8 (2 C), 55.5 (2 C), 60.8 (2 C), 62.1 (2 C), 62.5 (2 C), 69.0 (2 C), 130.5, 130.6, 130.7, 131.2 (2 C), 131.6, 131.7, 134.7, 134.8, 135.5, 133.9, 140.1, 160.5 (2 C), 168.8, 172.8, 174.9, 175.0, 175.3, 175.4, 175.5, 175.6, 175.7, 177.5; MS calcd for C₆₆H₉₈N₁₂O₁₅ (M) 1299.6, found (MH⁺) 1300.6.

Cyclo-(IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu)₂ (9). A solution of trifluoroacetate salt **8** (92 mg, 0.065 mmol, 100 mol%) in DMF (43.3 mL, $c = 1 \times 10^{-3}$ M) was treated with TBTU (62.4 mg, 0.195 mmol, 300 mol %) and 1-hydroxybenzotriazole hydrate (HOBt, 26.2 mg, 0.195 mmol, 300 mol %) at rt. After a vigorous agitation, diisopropylethylamine (DIEA, 68 μL, 0.390 mmol, 600 mol %) was added and the mixture was stirred for 1 h when HPLC showed complete disappearance of starting material (**8**, R. T. = 19.3 min). After concentration of the volatiles, brine (8 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3 × 8 mL). The combined organic layers were washed successively with 2 N HCl (0.8 mL), H₂O (0.8 mL), 5% NaHCO₃ (0.8 mL) and H₂O (0.8 mL), dried, and evaporated to a solid (72 mg, 85%). Purification by HPLC on a preparative inverse phase Watman column C-18 (10 μm, 100 Å, 22 × 500 mm) eluting with a linear gradient of 60:40:0.01 to 0:100:0.01 (v/v) H₂O:CH₃CN:TFA over 60 min with a flow rate of 20 mL min⁻¹ and detection at 220 nm, followed by lyophilization of the

appropriate fractions afforded the cyclic decapeptide, *cyclo*-(IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu)₂ (**9**, 50.2 mg, 60 %): R. T. = 27.5 min; mp 182-183°C; $[\alpha]^{20}_{\text{D}} +201.3^{\circ}$ (*c* 1, CHCl₃); ¹H NMR (C₂ symmetry) δ 0.75-0.76 (m, 18 H), 0.83 (d, 3 H, *J* = 5.7 Hz), 1.32-1.50 (m, 7 H), 1.72-1.77 (m, 1 H), 1.82-1.91 (m, 4 H), 1.99-2.06 (m, 3 H), 2.18 (m, 1H), 2.89 (m, 1 H), 3.02 (m, 1 H), 3.26 (m, 1 H), 3.41 (d, 1 H, *J* = 7.2), 3.89 (dd, 1 H, *J* = 9), 4.29-4.34 (m, 2 H), 4.75 (m, 1 H), 4.94 (ddd, 2 H, *J* = 11, 11, 12), 4.97 (s, 1 H), 7.12-7.23 (m, 5 H), 7.6-7.67 (m, 2 H), 8.23 (d, 1 H), 8.64 (d, 1 H); ¹³C NMR (C₂ symmetry) δ 19.1, 19.4, 22.7, 22.8, 24.7, 25.1, 27.2, 29.4, 29.6, 29.9, 30.4, 31.1, 40.7, 41.4, 48.7, 50.7, 52.1, 59.5, 60.7, 61.0, 66.1, 127.5, 127.9, 128.2, 137.1, 156.9, 168.0, 170.8, 171.5, 171.7, 171.9; MS calcd for C₆₆H₉₆N₁₂O₁₄ (M) 1281.6, found (M) 1281.3 and (MH⁺) 1282.6.

***Cyclo*-(IAA-Val-Orn-Leu)₂ ([IAA^{4-5,4'-5'}]-GS, **1**).**¹⁷ A solution of *cyclo*-(IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu)₂ (**9**, 13.4 mg, 0.0104 mmol) in 90% aq MeOH (6.8 mL) was treated with 1 M HCl (30 μ l) and palladium black (1.4 mg, 10% by wt.), and stirred under 1 atm of hydrogen for 15 h. The catalyst was removed by filtration on Celite™ and the filtrate was concentrated under vacuum. Mass spectral analysis showed that only one Cbz group was removed (MS calcd for C₅₈H₉₀N₁₂O₁₂ (MH⁺) 1147.43, found 1148.0). The residue and fresh catalyst were resubmitted to the same hydrogenation conditions for 12 h. Filtration, evaporation of the volatiles and purification by HPLC on a preparative inverse-phase column NovaPak HR C-18 (6 μ m, 60 Å, 25 × 100 mm) equipped with a Prep NovaPak HR C-18 precolumn (6 μ m 60 Å) eluting with a linear gradient of 90:10:0.01 to 0:100:0.01 (v/v) H₂O:CH₃CN:TFA over 30 min with a flow rate of 10 mL min⁻¹ and detection at 220 nm afforded *cyclo*-(IAA-Val-Orn-Leu)₂ ([IAA⁴⁻

5,4'-5']-GS, **1**, 11 mg, 98 %) as a white hydrochloride salt: $R_f = 0.82$ (4:1:1 *n*-BuOH:AcOH:H₂O); R. T. = 18.2 min; mp 283-285 dec. °C; $[\alpha]_D^{20} -199.4^\circ$ (*c* 1, CH₃OH); ¹H NMR (CD₃OD, C₂ symmetry) δ 0.89-0.92 (m, 18 H), 1.02 (d, 3 H, $J = 6.6$), 1.48-1.65 (m, 4 H), 1.65-1.78 (m, 3 H), 1.98-2.07 (m, 3 H), 2.09-2.20 (m, 2 H), 2.21-2.32 (m, 3 H), 2.40 (m, 1H), 2.84 (m, 1 H), 3.02 (m, 1 H), 3.65-3.75 (m, 2 H), 4.06 (dd, 1 H, $J = 8.9$), 4.40 (d, 1 H, $J = 9.4$), 4.53 (m, 2 H), 5.02 (m, 1 H); ¹³C NMR (CD₃OD, C₂ symmetry) δ 19.9, 20.1, 23.3 (2 C), 24.5, 26.1, 28.3 (2 C), 30.9 (2 C), 31.5, 32.4, 40.5, 42.5, 50.2, 52.1, 52.3, 61.5, 62.7, 62.8, 170.6, 172.6, 172.9, 173.0, 174.7; MS calcd for C₅₀H₈₄N₁₂O₁₀ (M) 1013.3, found (M⁺) 1013.7 and (MH⁺) 1014.2.

Acknowledgment: This research was supported in part by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, and the Ministère de l'Éducation du Québec. W. D. L. thanks Bio-Méga/Boehringer Ingelheim Recherche Inc. for a Young Investigator Award. We thank Ms. Susan W. Farmer and Professor Robert E. W. Hancock for the execution of the antimicrobial and hemolytic analyses of **1** and GS. We thank Ms. Sylvie Bilodeau and Dr. M. T. Phan Viet of the Regional High-Field NMR Laboratory for assistance with NMR experiments. We thank Dr. Marc-André Poupart, Mr. Gulian Fazal and Bio-Méga/Boehringer Ingelheim Recherche Inc. for assistance with the HPLC purification of **9**. We thank Professor J. Turnbull for use of the CD spectrometer. We are grateful for the characterization of particular intermediates by Mr. Simon Roy.

Supporting Information Available: Spectral assignments, ¹H and ¹³C NMR spectra, DEPT, ¹H-¹H COSY and ¹H-¹³C COSY spectra for **1** and spectra for **3-9** and intermediates (38 pages). This material is contained in

libraries on microfiche, immediately follows this article in the microfilm version of the journal, and can be ordered from the ACS; see any current masthead page for ordering information.

6.3.8 References.

- † Present address: University Chemical Laboratory, Lensfield Road, Cambridge CB2 1EW, UK.
- 1 Garrett, L. "Revenge of the germs, or just keep inventing new drugs" In *The Coming Plague Newly Emerging Diseases in a World Out of Balance*; Penguin Books: New York, 1995; Ch. 13.
 - 2 Jaynes, B. H.; Dirlam, J. P.; Hecker, S. J. *Ann. Rep. Med. Chem.* **1996**, *31*, 121.
 - 3 Onishi, H. R.; Pelak, B. A.; Gerckens, L. S.; Silver, L. L.; Kahan, F. M.; Chen, M.-H.; Patchett, A. A.; Galloway, S. M.; Hyland, S. A.; Anderson, M. S.; Raetz, C. R. H. *Science* **1996**, *274*, 980 and refs 1-3 therein.
 - 4 Sundram, U. N.; Griffin, J. H.; Nicas, T. I. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 13107.
 - 5 Cooper, R. D. G.; Thompson, R. C. *Ann. Rep. Med. Chem.* **1996**, *31*, 131.
 - 6 Juvvadi, P.; Vunnam, S.; Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8989.
 - 7 Blondelle, S.; Houghten, R. A. *Ann. Rep. Med. Chem.* **1992**, *27*, 159.
 - 8 Pinilla, C.; Appel, J.; Dooley, C.; Blondelle, S.; Eichler, J.; Dörner, B.; Ostresh, J.; Houghten, R. A. In *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries* G. Jung Ed. VCH, New York, 1996; Ch. 5.

- 9 Kondejewski, L. H.; Farmer, S. W.; Wishart, D. S.; Kay, C. M.; Hancock, R. E. W.; Hodges, R. S. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 25261.
- 10 Preliminary results were presented in part in: (a) Lombart, H.-G.; Lubell, W. D. In *Peptides: Chemistry, Structure and Biology*, P. T. P. Kaumaya and R. S. Hodges, Editors; ESCOM Sci. Pub. B.V.: Leiden, The Netherlands, **1996**, p.695; (b) Lombart, H.-G.; Lubell, W. D. at the 213th Nat'l Meeting of the Am. Chem. Soc., April 13-17, 1997, San Francisco, CA; Abstract ORG 620.
- 11 Kondejewski, L. H.; Farmer, S. W.; Wishart, D. S.; Hancock, R. E. W.; Hodges, R. S. *Int. J. Peptides Protein Res.* **1996**, *47*, 460.
- 12 Gause G. F.; Brazhnikova, M. G. *Nature* **1944**, *154*, 703.
- 13 Lambert, H. P.; O'Grady, F. W. *Antibiotic and Chemotherapy*, 6th Ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, U.K., 1992; p.p. 232-233.
- 14 Reviewed in: Ovchinnikov, Y. A.; Ivanov, V. T. *Tetrahedron* **1975**, *31*, 2177.
- 15 Ando, S.; Nishikawa, H.; Takiguchi, H.; Lee, S.; Sugihara, G. *Biochem. Biophysica Acta* **1993**, *1147*, 42.
- 16 Ando, S.; Nishihama, M.; Nishikawa, H.; Takiguchi, H.; Lee, S.; Sugihara, G. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1995**, *46*, 97.
- 17 Tamaki, M.; Arai, I.; Akabori, S.; Muramatsu, I. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1995**, *45*, 299.
- 18 Zidovetzki, R.; Banerjee, U.; Harrington, D. W.; Chan, S. I. *Biochemistry*, **1988**, *27*, 5686.
- 19 Prenner, E. J.; Lewis, R. N. A. H.; McElhaney, R. N.; Kondejewski, L. H.; Hodges, R. S.; Neuman, K. C.; Gruner, S. M. *Biophysical J.* **1997**, *72* No. 2 Part 2 of 2, A191.

- 20 Waki, M.; Izumiya, N. "Chemical Synthesis and Bioactivity of Gramicidin S and Related Peptides" in *Biochemistry of Peptide Antibiotics*, H. Kleinkauf and H. von Döhren Editors; W. De Gruyter, Berlin, 1990, Ch. 9.
- 21 Izumiya, N.; Kato, T.; Aoyagi, H.; Waki, M.; Kondo, M. *Synthetic aspects of biologically active cyclic peptides-Gramicidin S and Tyrocidines*, Halsted press, New York 1979.
- 22 Synthesis of 2-oxo-3-phthalimido-7-thia-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic acid: Nagai, U.; Sato, K. *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 647. We have adopted the ring system numbering shown for IAA 2 in Scheme 1 in order to maintain clarity and consistency when comparing these different heterocyclic systems.
- 23 Sato, K.; Nagai, U. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1986**, 1231.
- 24 Bach, II, A. C.; Markwalder, J. A.; Ripka, W. C. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, 38, 314.
- 25 Reviewed in part: Hanessian, S.; McNaughton-Smith, G; Lombart, H.-G.; Lubell, W. D. *Tetrahedron* **1997**, 53, in press.
- 26 Ripka, W. C.; Delucca, G. V.; Bach, II, A. C.; Pottorf, R. S.; Blaney, J. M. *Tetrahedron* **1993**, 49, 3609.
- 27 Bach, II, A. C.; Pottorf, R. S.; Blaney, J. M.; De Luca, G. V.; Ripka, W. C. *In Peptides Chemistry and Biology, Proceeding of the 13th American Peptide Symposium*, R. S. Hodges and J. A. Smith, Editors; ESCOM Sci. Pub. B.V.: Leiden, The Netherlands, **1994**.
- 28 Graciani, N. R.; Tsang, K. Y.; McCutchen, S. L.; Kelly, J. W. *Bioorg. Med. Chem.* **1994**, 2, 999.

- 29 De la Figuera, N.; Jiménez, M. A.; Biacs, M.; García-López, M. T.; González-Muñiz, R.; Andreu, D. In *Peptides 1994, Proceedings of the 23rd European Peptide Symposium*, H. L. S. Maia, Editor; ESCOM, Leiden, The Netherlands, 1995, 702.
- 30 Lombart, H.-G.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 6147.
- 31 Lombart, H.-G.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9437.
- 32 Waldmann, H.; Kunz, H. *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 1712.
- 33 Dourtoglou, V.; Gross, B. *Synthesis* **1994**, 572.
- 34 Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bannwarth, W.; Gillessen D. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927.
- 35 The crystal structure of HBTU, the related PF₆ salt, substantiates a guanidinium-1-*N*-oxide salt for TBTU: Abdelmoty, I.; Albericio, F.; Carpino, L. A.; Foxman, B.; Kates, S.A. *Lett. Peptide Sci.* **1994**, *1*, 57.
- 36 Friedrich-Bochnitschek, S.; Waldmann, H.; Kunz, H. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 751.
- 37 Kawai, K.; Nagai, U. *Biopolymers* **1978**, *17*, 1549.
- 38 Woody, R. W. *Methods Enzymology* **1995**, *246*, 34.
- 39 Tamaki, M.; Araki, M.; Okitsu, T.; Sakamoto, H.; Takimoto, M.; Muramatsu, I. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1985**, *58*, 531.
- 40 Sato, K.; Kato, R.; Nagai, U. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1986**, *59*, 535.
- 41 Nagai, U.; Sato, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1983**, *56*, 3329.
- 42 Tamaki, M.; Araki, M.; Okitsu, T.; Sakamoto, H.; Takimoto, M.; Muramatsu, I. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1985**, *58*, 1469.
- 43 Haque, T.S.; Little, J. C.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4105 and refs therein.
- 44 Sibanda, B. L.; Thornton, J. M. *Nature* **1985**, *316*, 170.

6.3.9 Chemical Assignment of NMR Spectra

General: Protocols were followed as described in the general portion of the experimental section of the text. Proton and carbon NMR assignments were made using a combination of COSY and HMQC 2D experiments performed on selected products. For certain compounds, signals were then assigned by analogy with similar structures. Amino acid signals were assigned according to the examples presented in "Tabellon zur strukturaufklärung organischer verbindungen mit spektroskopischen methoden", Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1981. Amide NH protons were not visible due to exchange with the solvent when spectra were recorded in CD₃OD.

BOC-(Cbz)Orn-Leu-OAllyl Ester

¹H NMR δ 0.82 (m, 6 H, CH₃ Leu), 1.3 (s, 9 H, CH₃ BOC), 1.42-1.65 (m, 6 H, CH₂ Orn- γ α , CH₂ Leu, CH Leu), 1.75 (m br, 1 H, CH₂ Orn- α), 3.04 (m, 1 H, CH₂ Orn- β), 3.21 (m, 1 H, CH₂ Orn- β), 4.27 (m, 1 H, CH Orn- α), 4.48 (m br, 3 H, CH Leu- α , CH₂ allyl), 4.9 (m, 2 H, CH₂ Cbz), 5.15 (m, 2 H, CH₂ allyl), 5.6 (d br, 1 H, NH Orn- α , $J = 15.6$ Hz), 5.65 (m br, 1 H, NH Orn- δ), 5.7 (m, 1 H, CH allyl), 7.19 (s br, 1 H, NH Leu), 7.2 (s, 5 H Ar).

¹³C NMR δ 21.3 (CH₃ Leu), 22.5 (CH₃ Leu), 24.3 (CH Leu), 25.5 (CH₂ Orn- δ), 27.9 (CH₃ BOC), 29.6 (CH₂ Orn- β), 39.5 (CH₂ Orn- γ), 40.4 (CH₂ Leu), 50.5 (CH Leu- α), 52.7 (CH Orn- α), 65.3 (CH₂ allyl), 66.1 (CH₂ Cbz), 79.1 (C_q BOC), 118.1 (CH₂ allyl), 127.6 (CH Ar), 128.0 (CH Ar), 128.0 (CH Ar), 131.4 (CH allyl), 136.3 (C_q Ar), 155.4 (CO BOC), 156.7 (CO Cbz), 172.0 (CO Leu), 172.2 (CO Orn).

BOC-Val-(Cbz)Orn-Leu-OAllyl Ester.

^1H NMR δ 0.88-0.94 (m, 12 H, CH_3 Leu/Val), 1.42 (s, 9 H, CH_3 BOC), 1.5-1.7 (m, 6 H, CH_2 Orn- $\delta\delta\beta$, CH_2 Leu, CH Leu), 1.82-1.95 (m br, 1 H, CH_2 Orn- β), 2-2.14 (m, 1 H, CH Val), 3.08-3.2 (m br, 1 H, CH_2 Orn- γ), 3.3-3.47 (m br, 1 H, CH_2 Orn- γ), 3.95-4.05 (m, 1 H, CH Val- α), 4.50-4.55 (m, 1 H, CH Leu- α), 4.55-4.62 (m, 2 H, CH_2 allyl), 4.62-4.74 (m br, 1 H, CH Orn- α), 5.08 (dd, 2 H, CH_2 Cbz), 5.18-5.35 (dd, 2 H, CH_2 allyl), 5.29 (d br, 1 H, NH Val), 5.8-5.95 (m br, 1 H, CH allyl), 6.95 (d br, 1 H, NH Orn- α), 7.15 (d br, 1 H, NH Leu), 7.2 (s, 5 H, CH Ar).

^{13}C NMR δ 17.7 (CH_3 Val), 19.2 (CH_3 Val), 21.6 (CH_3 Leu), 22.8 (CH_3 Leu), 24.7 (CH Leu), 26.1 (CH_2 Orn- δ), 28.3 (CH_3 BOC), 29.8 (CH_2 Orn- β), 31.0 (CH Val), 39.6 (CH_2 Orn- γ), 40.8 (CH_2 Leu), 50.9 (CH Leu- α), 51.6 (CH Orn- α), 59.8 (CH Val- α), 65.7 (CH_2 allyl), 66.6 (CH_2 Cbz), 79.8 (C_q BOC), 118.6 (CH_2 allyl), 128.0 (CH Ar), 128.4 (CH_{Ar}), 128.4 (CH Ar), 131.6 (CH allyl), 136.5 (C_q Ar), 155.8 (CO BOC), 157.1 (CO Cbz), 171.6 (CO Val), 171.9 (CO Leu), 172.3 (CO Orn).

Val-(Cbz)Orn-Leu-OAllyl Ester Trifluoroacetate (3)

^1H NMR δ 0.85 (m, 6 H, CH_3 Leu/Val), 0.95 (m, 6 H, CH_3 Leu/Val), 1.5-1.7 (m, 6 H, CH_2 Orn- $\delta\delta\beta$, CH_2 Leu, CH Leu), 1.7-1.8 (m br, 1 H, CH_2 Orn- β), 2.1-2.3 (m, 1 H, CH Val), 3-3.2 (s br, 2 H, CH_2 Orn- γ), 3.9-4 (s br, 1 H, CH Val- α), 4.45-4.55 (m, 3 H, CH Leu- α / CH_2 allyl), 4.70 (s br, 1 H, CH Orn- α), 5.05 (s br, 2 H, CH_2 Cbz), 5.2-5.4 (dd, 2 H, CH_2 allyl), 5.4 (d br, 1 H, NH Orn- δ), 5.8-5.9 (m, 1 H, CH allyl), 7.3 (s, 5 H, CH Ar), 6.95 (d br, 1 H, NH Orn- α), 7.15 (d br, 1 H, NH Leu).

BOC-IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu-OAllyl Ester (4)

^1H NMR δ 0.84-0.88 (m, 12 H, CH_3 Leu/Val), 1.37 (s, 9 H, CH_3 BOC), 1.45-1.7 (m, 8 H, CH_2 IAA-4 α ,7, CH_2 Orn- $\delta\delta\beta$, CH_2 Leu, CH Leu), 1.77-1.9 (m, 2 H, CH_2

IAA-8, CH₂ Orn-β), 2-2.15 (m, 4 H, CH₂ IAA-5,5,7, CH Val), 2.2-2.3 (m, 2H, CH₂ IAA-4β,8), 3.1 (m br, 1 H, CH₂ Orn-γ), 3.3 (m br, 1 H, CH₂ Orn-γ), 3.55 (m, 1 H, CH IAA-6), 3.95 (m, 1 H, CH IAA-3), 4.15 (dd, 1 H, CH IAA-9), 4.45-4.52 (m, 3 H, CH Val-α/Leu-α/Orn-α), 4.56 (m, 2 H, CH₂ allyl), 5.0 (dd, 2 H, CH₂ Cbz), 5.2 (dd, 2 H, CH₂ allyl), 5.35 (s br, 1 H, NH Orn-δ), 5.35 (d, 1 H, NH IAA), 5.8 (m br, 1 H, CH allyl), 6.9 (d br, 2 H, NH Orn-α/Val), 7.2-7.3 (m, 6 H, NH Leu, CH_{Ar}).

¹³C NMR δ 17.9 (CH₃ Val), 19.3 (CH₃ Val), 21.5 (CH₃ Leu), 22.7 (CH₃ Leu), 24.6 (CH Leu), 25.7 (CH₂ Orn-δ), 26.6 (CH₂ IAA-C5), 27.5 (CH₂ IAA-C4), 28.2 (CH₃ BOC), 28.3 (CH₂ IAA-C8), 29.2 (CH₂ Orn-β), 30.2 (CH Val), 32.2 (CH₂ IAA-C7), 39.9 (CH₂ Orn-γ), 40.5 (CH₂ Leu), 49.7 (CH IAA-C3), 50.8 (CH Leu-α), 52.1 (CH Orn-α), 57.4 (CH IAA-C6), 58.7 (CH IAA-C9), 59.8 (CH Val-α), 65.5 (CH₂ allyl), 66.4 (CH₂ Cbz), 79.6 (C_q BOC), 118.3 (CH₂ allyl), 127.9 (CH Ar), 128.2 (CH Ar), 128.3 (CH Ar), 131.7 (CH allyl), 136.5 (C_q Ar), 155.6 (CO BOC), 156.8 (CO Cbz), 170.3 (CO IAA), 171.0 (CO IAA), 171.2 (CO Val), 171.5 (CO Leu), 172.2 (CO Orn).

BOC-IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu (5)

¹H NMR (CD₃OD) δ 0.89-0.98 (m, 12 H, CH₃ Leu/Val), 1.44 (s, 9 H, CH₃ BOC), 1.52-1.72 (m, 8 H, CH₂ Orn-δδβ, CH₂ Leu, CH Leu, CH₂ IAA-4α,7), 1.74-1.89 (m br, 2 H, CH₂ Orn-β, CH₂ IAA-8), 1.98-2.18 (m, 6 H, CH Val, CH₂ IAA-4β,5,5,7,8), 3.08-3.20 (m br, 2 H, CH₂ Orn-γ), 3.66 (m br, 1 H, CH IAA-6), 4.07-4.15 (m, 2 H, CH IAA-3,9), 4.37 (m, 1 H, CH Leu-α), 4.42-4.48 (m br, 1 H, CH Orn-α,Val-α), 5.06 (m, 2 H, CH₂ Cbz), 7.29-7.3 (m, 5 H, CH Ar).

¹³C NMR (CD₃OD) δ 19.2 (CH₃ Val), 20.1 (CH₃ Val), 22.1 (CH₃ Leu), 23.8 (CH₃ Leu), 26.1 (CH Leu), 27.0 (CH₂ Orn-δ), 27.3 (CH₂ IAA-C5), 28.9 (CH₃ BOC), 29.4 (CH₂ IAA-C4), 30.2 (CH₂ IAA-C8), 30.5 (CH₂ Orn-β), 31.9 (CH Val), 33.0

(CH₂ IAA-C7), 41.4 (CH₂ Orn-γ), 42.4 (CH₂ Leu), 50.7 (CH IAA-C3), 53.7 (CH Orn-α), 54.3 (CH Leu-α), 60.3 (CH IAA-C6), 60.7 (CH IAA-C9), 61.0 (CH Val-α), 67.6 (CH₂ Cbz), 80.7 (C_q BOC), 129.0 (CH Ar), 129.1 (CH Ar), 129.6 (CH Ar), 138.5 (C_q Ar), 158.1 (CO BOC), 159.0 (CO Cbz), 171.0 (CO IAA), 173.6 (CO IAA), 173.6 (CO Val), 174.4 (CO Orn), 179.0 (CO Leu).

IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu-OAllyl Ester Trifluoroacetate (6).

¹H NMR (CD₃OD) δ 0.88-0.97 (m, 12 H, CH₃ Leu/Val), 1.66-1.74 (m, 8 H, CH₂ IAA-4α,7, CH₂ Orn-δδβ, CH₂ Leu, CH Leu), 1.78-1.95 (m, 2 H, CH₂ IAA-8, CH₂ Orn-β), 2.04-2.19 (m, 5 H, CH₂ IAA-5,5,7,8, CH Val), 2.34 (m, 1H, CH₂ IAA-4β), 3.10-3.21 (m, 2 H, CH₂ Orn-γ), 3.72 (m, 1 H, CH IAA-6), 3.94 (t, 1 H, J = 8.1 Hz, CH IAA-3), 4.18 (m, 1 H, CH IAA-9), 4.45-4.62 (m, 5 H, CH Val-α/Leu-α/Orn-α, CH₂ allyl), 5.06 (m, 2 H, CH₂ Cbz), 5.21 (dd, 1 H, J = 1.3, 10.5 Hz, CH₂ allyl), 5.30 (dd, 1 H, J = 1.5, 17.2 Hz, CH₂ allyl), 5.90 (m, 1 H, CH allyl), 7.27-7.32 (m, 5 H, CH Ar).

¹³C NMR (CD₃OD) δ 18.9 (CH₃ Val), 19.9 (CH₃ Val), 21.9 (CH₃ Leu), 23.4 (CH₃ Leu), 25.6 (CH₂ IAA-C4), 25.9 (CH Leu), 26.9 (CH₂ Orn-δ), 27.1 (CH₂ IAA-C5), 30.57 (CH₂ IAA-C8), 30.64 (CH₂ Orn-β), 32.2 (CH Val), 32.9 (CH₂ IAA-C7), 41.2 (CH₂ Orn-γ), 41.5 (CH₂ Leu), 49.8 (CH IAA-C3), 52.2 (CH Leu-α), 53.7 (CH Orn-α), 59.2 (CH IAA-C6), 60.4 (CH IAA-C9), 60.9 (CH Val-α), 66.9 (CH₂ allyl), 67.5 (CH₂ Cbz), 119.0 (CH₂ allyl), 128.9 (CH Ar), 129.1 (CH Ar), 129.6 (CH Ar), 133.3 (CH allyl), 138.4 (C_q Ar), 159.0 (CO Cbz), 167.2 (CO IAA), 173.4 (CO Leu), 173.7 (CO IAA), 173.7 (CO Val), 174.0 (CO Orn).

BOC-IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu-IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu-OAllyl Ester (7)

^1H NMR δ 0.8-1.05 (m, 24 H, 2 CH_3 Leu/Val), 1.32 (s, 9 H, CH_3 BOC), 1.5-1.8 (m, 16 H, 2 CH_2 IAA-4 α ,7, 2 CH_2 Orn- $\delta\delta\beta$, 2 CH_2 Leu, 2 CH Leu), 1.8-1.95 (m, 4 H, 2 CH_2 IAA-8, 2 CH_2 Orn- β), 2-2.2 (m, 8 H, 2 CH_2 IAA-5,5,7, 2 CH Val), 2.25-2.4 (m, 4H, 2 CH_2 IAA-4 β ,8), 3-3.25 (m, 4 H, 2 CH_2 Orn- γ), 3.45-3.68 (m, 3 H, 2 CH IAA-6, CH IAA-3), 3.81 (m, 1 H, CH IAA'-3), 3.95 (m, 1 H, CH IAA'-9), 4.05 (m, 1 H, CH IAA-9), 4.15-4.38 (m, 5 H, 2 CH Val- α /Orn- α , CH Leu'- α), 4.5 (m, 1 H, CH Leu- α), 4.55-4.6 (m, 2 H, CH_2 allyl), 4.90-4.99 (dd, 2 H, CH_2 Cbz), 5.01-5.08 (dd, 2 H, CH_2 Cbz), 5.11 (dd, 1 H, CH_2 allyl), 5.24 (dd, 1 H, CH_2 allyl), 5.68 (s br, 1 H, NH IAA'), 5.90 (s br, 1 H, NH Orn- δ), 5.90 (m, 1 H, CH allyl), 6.1 (s br, 1 H, NH Orn- δ), 6.5-8.0 (s, 7 H, 2 NH Orn/Val/Leu, NH IAA), 7.2-7.4 (m, 10 H, CH Ar).

^{13}C NMR δ 19.2, 19.5 (2 CH_3 Val), 20.1, 20.7 (2 CH_3 Val), 21.0, 21.6 (2 CH_3 Leu), 22.9, 23.0 (2 CH_3 Leu), 24.7, 25.0 (2 CH Leu), 24.3, 25.4 (2 CH_2 Orn- δ), 25.6, 26.4 (2 CH_2 IAA-C5), 27.0, 27.6 (2 CH_2 IAA-C4), 28.3 (CH_3 BOC), 28.5, 29.2 (2 CH_2 IAA-C8), 29.2, 31.4 (2 CH_2 Orn- β), 29.6, 30.6 (2 CH Val), 31.8, 32.0 (2 CH_2 IAA-C7), 39.7, 40.3 (2 CH_2 Orn- γ), 40.6, 41.1 (2 CH_2 Leu), 48.7 (CH IAA'-C3), 50.8 (CH IAA-C3), 50.8 (CH Leu- α), 52.7 (CH Leu'- α), 53.8, 54.5 (2 CH Orn- α), 59.6, 60.3 (2 CH IAA-C6), 60.8, 60.8 (2 CH IAA-C9), 61.6, 62.9 (2 CH Val- α), 65.5 (CH_2 allyl), 66.4, 66.6 (2 CH_2 Cbz), 79.9 (C_q BOC), 117.9 (CH_2 allyl), 127.5, 127.8 (2 CH Ar Cbz), 127.9, 128.3 (2 CH Ar Cbz), 128.3, 128.5 (2 CH Ar Cbz), 132.1 (CH allyl), 136.5, 136.9 (2 C_q Ar Cbz), 155.9, 156.3, 156.6 (CO BOC, 2 CO Cbz), 169.0, 170.1, 171.3, 171.7, 172.2, 172.4, 172.7, 173.1, 173.4, 173.6 (4 CO IAA, 2 CO Val, 2 CO Leu, 2 CO Orn).

***N*-BOC-IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu-IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu-OH**

^1H NMR (CD_3OD) δ 0.8-1.05 (m, 24 H, 2 CH_3 Leu/Val), 1.32 (s, 9 H, CH_3 BOC), 1.5-1.8 (m, 16 H, 2 CH_2 IAA-4 α ,7, 2 CH_2 Orn- $\delta\delta\beta$, 2 CH_2 Leu, 2 CH Leu), 1.8-1.95 (m, 4 H, 2 CH_2 IAA-8, 2 CH_2 Orn- β), 2-2.2 (m, 8 H, 2 CH_2 IAA-5,5,7, 2 CH Val), 2.25-2.4 (m, 4 H, 2 CH_2 IAA-4 β ,8), 3-3.25 (m, 4 H, 2 CH_2 Orn- γ), 3.45-3.68 (m, 3 H, 2 CH IAA-6, CH IAA-3), 3.81 (m, 1 H, CH IAA'-3), 3.95 (m, 1 H, CH IAA'-9), 4.05 (m, 1 H, CH IAA-9), 4.15-4.38 (m, 5 H, 2 CH Val- α /Orn- α , CH Leu'- α), 4.5 (m, 1 H, CH Leu- α), 4.90-4.99 (dd, 2 H, CH_2 Cbz), 5.01-5.08 (dd, 2 H, CH_2 Cbz), 7.2-7.4 (m, 10 H, CH_{Ar} Cbz).

IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu-IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu Trifluoroacetate (8).

^1H NMR (CD_3OD) δ 0.8-1.05 (m, 24 H, 2 CH_3 Leu/Val), 1.5-1.8 (m, 16 H, 2 CH_2 IAA-4 α ,7, 2 CH_2 Orn- $\delta\delta\beta$, 2 CH_2 Leu, 2 CH Leu), 1.8-1.95 (m, 4 H, 2 CH_2 IAA-8, 2 CH_2 Orn- β), 2-2.2 (m, 8 H, 2 CH_2 IAA-5,5,7, 2 CH Val), 2.25-2.4 (m, 4 H, 2 CH_2 IAA-4 β ,8), 3-3.25 (m, 4 H, 2 CH_2 Orn- γ), 3.45-3.68 (m, 3 H, 2 CH IAA-6, CH IAA-3), 3.81 (m, 1 H, CH IAA'-3), 3.95 (m, 1 H, CH IAA'-9), 4.05 (m, 1 H, CH IAA-9), 4.15-4.38 (m, 5 H, 2 CH Val- α /Orn- α , CH Leu'- α), 4.5 (m, 1 H, CH Leu- α), 4.90-4.99 (dd, 2 H, CH_2 Cbz), 5.01-5.08 (dd, 2 H, CH_2 Cbz), 7.2-7.4 (m, 10 H, CH_{Ar} Cbz).

^{13}C NMR δ 20.5, 20.7 (2 CH_3 Val), 21.6, 21.6 (2 CH_3 Val), 23.5, 23.8 (2 CH_3 Leu), 25.2, 25.2 (2 CH_3 Leu), 27.5, 27.6 (2 CH Leu), 27.3, 27.6 (2 CH_2 Orn- δ), 28.8, 28.8 (2 CH_2 IAA-C5), 28.8, 28.8 (2 CH_2 IAA-C4), 30.5, 31.9 (2 CH_2 IAA-C8), 32.2, 32.2 (2 CH_2 Orn- β), 33.7, 33.8 (2 CH Val), 32.4, 34.5 (2 CH_2 IAA-C7), 42.9, 42.9 (2 CH_2 Orn- γ), 43.4, 43.8 (2 CH_2 Leu), 53.6, 53.6 (2 CH IAA-C3), 54.8, 54.8 (2 CH Leu- α), 55.5, 55.5 (2 CH Orn- α), 60.8, 60.8 (2 CH IAA-C6), 62.1, 62.1 (2 CH IAA-C9), 62.5, 62.5 (2 CH Val- α), 69.0, 69.0 (2 CH_2 Cbz), 130.5, 130.6, 130.7, 131.2, 131.2,

131.6, 131.7, 134.7, 134.8, 135.5 (10 CH_{Ar} Cbz), 133.9, 140.1 (2 C_q Ar Cbz), 160.5, 160.5 (2 CO Cbz), 168.8, 172.8, 174.9, 175.0, 175.3, 175.4, 175.5, 177.5, 175.6, 175.7 (4 CO_{IAA}, 2 CO_{Val}, 2 CO_{Leu}, 2 CO_{Orn}).

Cyclo-(IAA-Val-(Cbz)Orn-Leu)₂ (9).

¹H NMR (C₂ symmetry) δ 0.75-0.76 (m, 18 H, 2 CH₃_{Leu}, CH₃_{Val}), 0.83 (d, 3 H, CH₃_{Val}, *J* = 5.7 Hz), 1.32-1.50 (m, 7 H, CH₂_{Leu}, CH_{Leu}, CH₂_{Orn-δδβ}, CH₂_{IAA-7}), 1.72-1.77 (m, 1 H, CH₂_{IAA-4α}), 1.82-1.91 (m, 4 H, CH₂_{IAA-5,7,8}, CH₂_{Orn-β}), 1.99-2.06 (m, 3 H, CH_{Val}, CH₂_{IAA-5,8}), 2.18 (m, 1H, CH₂_{IAA-4β}), 2.89 (m, 1 H, CH₂_{Orn-γ}), 3.02 (m, 1 H, CH₂_{Orn-γ}), 3.26 (m, 1 H, CH_{IAA-6}), 3.41 (d, 1 H, CH_{IAA-3}, *J* = 7.2 Hz), 3.89 (dd, 1 H, CH_{IAA-9}, *J* = 9 Hz), 4.29-4.34 (m, 2 H, CH_{Val-α/Leu-α}), 4.75 (m, 1 H, CH_{Orn-α}), 4.94 (ddd, 2 H, CH₂_{Cbz}, *J* = 11, 11, 12 Hz), 4.97 (s, 1 H, NH_{Orn-δ}), 7.12-7.23 (m, 5 H, CH_{Ar}_{Cbz}), 7.6-7.67 (m, 2 H, NH), 8.23 (d, 1 H, NH), 8.64 (d, 1 H, NH).

¹³C NMR (C₂ symmetry) δ 19.1 (CH₃_{Val}), 19.4 (CH₃_{Val}), 22.7 (CH₃_{Leu}), 22.8 (CH₃_{Leu}), 24.7 (CH_{Leu}), 25.1 (CH₂_{Orn-δ}), 27.2 (CH₂_{IAA-C5}), 29.4 (CH₂_{IAA-C4}), 29.6 (CH₂_{IAA-C8}), 29.9 (CH_{Val}), 30.4 (CH₂_{Orn-β}), 31.1 (CH₂_{IAA-C7}), 40.7 (CH₂_{Orn-γ}), 41.4 (CH₂_{Leu}), 48.7 (CH_{IAA-C3}), 50.7 (CH_{Leu-α}), 52.1 (CH_{Orn-α}), 59.5 (CH_{IAA-C6}), 60.7 (CH_{IAA-C9}), 61.0 (CH_{Val-α}), 66.1 (CH₂_{Cbz}), 127.5, 127.9, 128.2 (3 CH_{Ar}_{Cbz}), 137.1 (C_q Ar Cbz), 156.9 (CO Cbz), 168.0, 170.8, 171.5, 171.7, 171.9 (2 CO_{IAA}, CO_{Val}, CO_{Leu}, CO_{Orn}).

Cyclo-(IAA-Val-Orn-Leu)₂ ([IAA^{4-5,4'-5'}]-GS, 1)

¹H NMR (CD₃OD, C₂ symmetry) δ 0.89-0.92 (m, 18 H, 2 CH₃_{Leu}, CH₃_{Val}), 1.02 (d, 3 H, CH₃_{Val}, *J* = 6.6 Hz), 1.48-1.65 (m, 4 H, CH₂_{Leu}, CH_{Leu}, CH₂_{Orn-δ}), 1.65-1.78 (m, 3 H, CH₂_{Orn-δβ}, CH₂_{IAA-7}), 1.98-2.07 (m, 3 H, CH₂_{IAA-4α,8},

CH₂ Orn-β), 2.09-2.20 (m, 2 H, CH₂ IAA-5,7), 2.21-2.32 (m, 3 H, CH Val, CH₂ IAA-5,8), 2.40 (m, 1H, CH₂ IAA-4β), 2.84 (m, 1 H, CH₂ Orn-γ), 3.02 (m, 1 H, CH₂ Orn-γ), 3.65-3.75 (m, 2 H, CH IAA-6, CH Val-α), 4.06 (dd, 1 H, J = 8.9 Hz, CH IAA-3), 4.40 (d, 1 H, J = 9.4 Hz, CH IAA-9), 4.53 (m, 2 H, CH Leu-α), 5.02 (m, 1 H, CH Orn-α).

¹³C NMR (CD₃OD, C₂ symmetry) δ 19.9 (CH₃ Val), 20.1 (CH₃ Val), 23.3 (CH₃ Leu), 23.3 (CH₃ Leu), 24.5 (CH₂ Orn-δ), 26.1 (CH Leu), 28.3 (CH₂ IAA-C5), 28.3 (CH₂ IAA-C4), 30.9 (CH₂ IAA-C8), 30.9 (CH₂ Orn-β), 31.5 (CH Val), 32.4 (CH₂ IAA-C7), 40.5 (CH₂ Orn-γ), 42.5 (CH₂ Leu), 50.2 (CH IAA-C3), 52.3 (CH Leu-α), 52.1 (CH Orn-α), 61.5 (CH IAA-C6), 62.7 (CH IAA-C9), 62.8 (CH Val-α), 170.6, 172.6, 172.9, 173.0, 174.7 (2 CO IAA, CO Val, CO Leu, CO Orn).

CHAPITRE 7

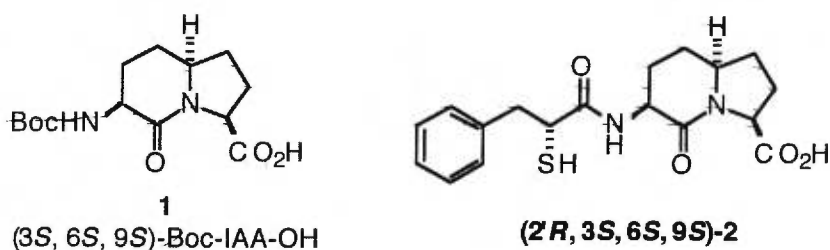
Synthèse de composés pseudodipeptidiques mercapto-acyles incorporant l'acide aminé indolizidinone: application pour l'inhibition double de l'ACE et de la NEP.

7.1 Introduction.

La liberté du mouvement peptidique peut être restreinte grâce à la formation de liaisons covalentes entre les chaînes latérales et les atomes du squelette pour conduire à des peptidomimétiques avec des hautes barrières d'interconversion. Ils sont des outils excellents pour les études de reconnaissance récepteur-site, la détermination des conformations biologiquement actives et la conception d'analogues potentiels de peptides naturels.¹ La conception de peptides conformationnellement restreints et leur utilisation dans des synthèses de molécules bioactives ont été le sujet de nombreuses études depuis les dix dernières années.²

L'élaboration d'une synthèse énantiosélective efficace a donné accès à ce type d'outils que sont les peptidomimétiques azabicycloalcanes tel que le bicyclic indolizidinone AAI 1. La fonction de ce peptidomimétique peut être perçue à travers deux aspects. L'AAI a été conçu pour induire une conformation de repliement β de type II'. Pour cela, il a été incorporé dans

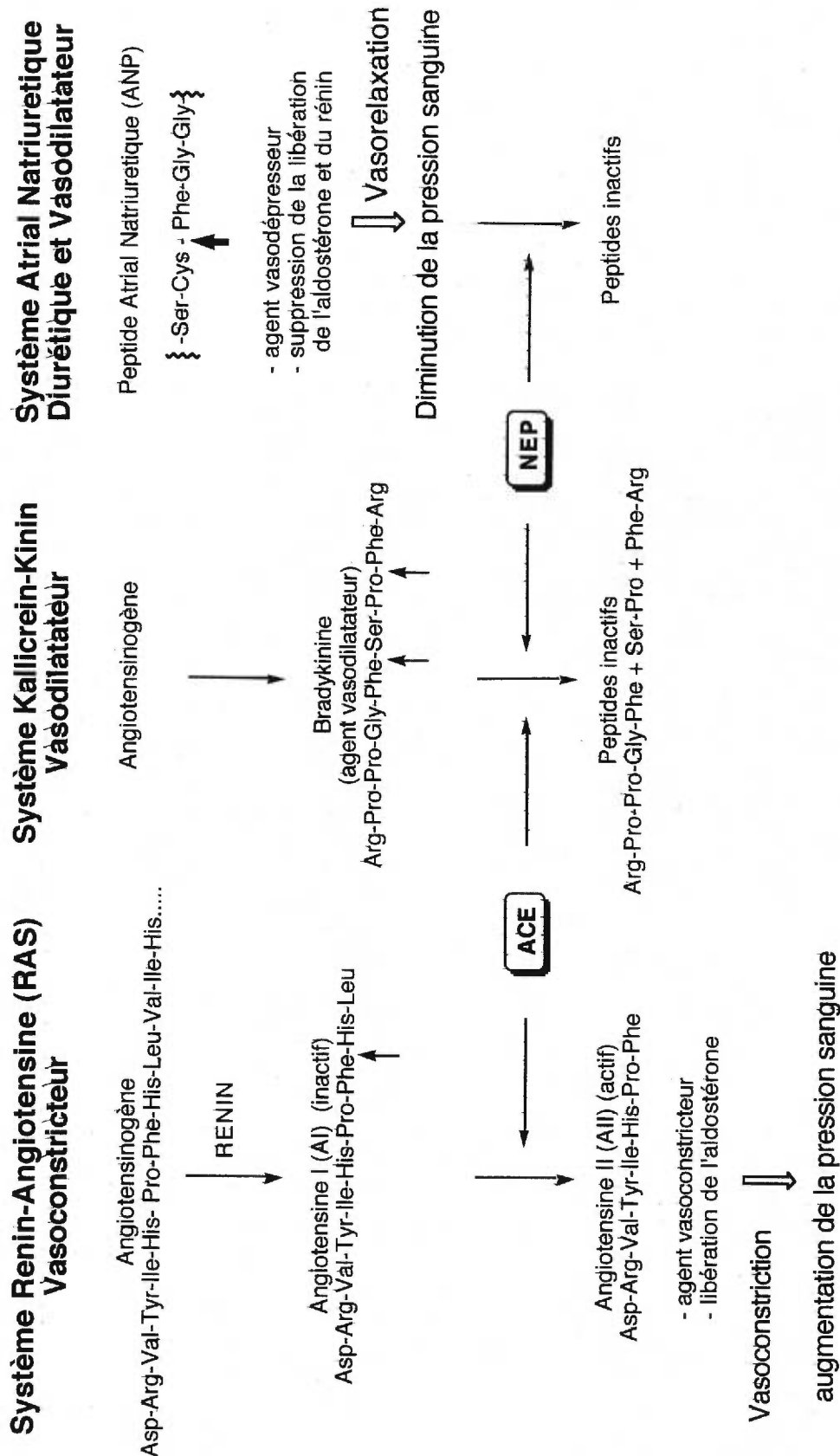
un analogue de la gramicidine S, [AAI^{4-5,4'-5'}]-GS. D'un autre côté, l'AAI peut être utilisé comme motif conformationnellement restreint du dipeptide alanyl-proline. Pour consolider cette affirmation, le choix s'est porté sur la synthèse d'un analogue mercapto-acyle, (2'R, 3S, 6S, 9S)-2 utilisé pour une inhibition conjointe de l'enzyme de conversion de l'angiotensin (Angiotensin converting enzyme, ACE) et de l'endopeptidase neutre (Neutral endopeptidase, NEP). Facilement accessible, cet inhibiteur peut démontrer l'efficacité de notre mimétique à partir d'un concept connu.



7.2 Le rôle des enzymes ACE et NEP.

La régulation de la pression artérielle et de la balance électrolytique (homéostasie hydrosodée) est sous la dépendance principale de trois systèmes peptidergiques, l'angiotensine II (AII) vasoconstricteur, la bradykinine³ (Bk) vasodilatatrice et le peptide atrial natriurétique⁴ (ANP) diurétique et vasodilatateur (figure 1)⁵. La régulation de ces différents peptides est contrôlée par deux systèmes enzymatiques, l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) et l'endopeptidase neutre (NEP),

Figure 1. Schéma des principaux systèmes peptidiques intervenant dans la régulation de la pression sanguine.



toutes les deux des métallopeptidases zinciques ayant des mécanismes d'action similaires.⁶

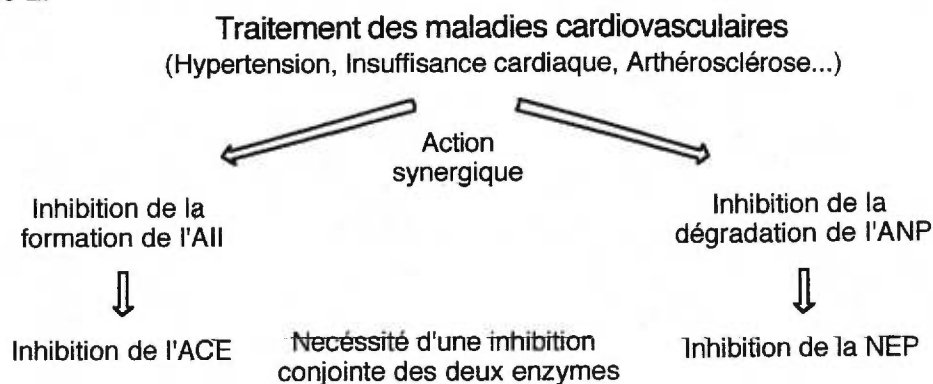
L'ACE est une carboxypeptidase dipeptidyle qui catalyse l'hydrolyse du décapeptide angiotensine I (AI) à l'octapeptide vasoconstricteur angiotensine II (AII).⁷ L'AII, une composante majeure du système RAS (renin-angiotensin-aldosteron system), est responsable de l'augmentation de la pression sanguine à la fois par l'augmentation de la résistance vasculaire et par la libération de la production du stéroïde aldostérone (qui est rétenteur de sodium et d'eau). La NEP (E.C. 3.4.21.11), qui est une métalloprotéase de membrane de liaison, est responsable pour une grande part de l'inactivation de l'ANP par dégradation de la partie cyclique de ce peptide.⁸ L'ANP est une hormone peptidique à 28 acides aminés sécrétée par le coeur en réponse aux distensions atriales qui permet les diminutions des sécrétions d'aldostérone et de rénin. La bradykinine est métabolisée à la fois par l'ACE et la NEP,⁹ en fonction de sa localisation endothéliale ou épithéliale. La régulation de ces peptides endogènes représente donc un moyen de contrôler de pression artérielle au cours de des différentes pathologies du système cardiovasculaire.

Bien que des inhibiteurs sélectifs de l'ACE¹⁰ suscitent beaucoup d'intérêt pour le traitement de l'hypertension artérielle et de l'insuffisance cardiaque (congestive heart failure, CHF), ils souffrent d'effets secondaires qui sont dûs à l'association de diurétiques classiques.

D'autre part, des inhibiteurs sélectifs de la NEP¹¹ ont été également développés, initialement dans le but d'inhiber l'inactivation des enképhalines dans le cerveau.

Comme les actions hormonales de l'AII et de l'ANP, telles que la résistance vasculaire et la sécrétion d'aldostérone, sont fondamentalement opposées, une inhibition simultanée de la formation de l'AII et de la dégradation de l'ANP doit être faite conjointement pour conduire à un effet synergique bénéfique sur la baisse de la résistance vasculaire (figure 2).

Figure 2.



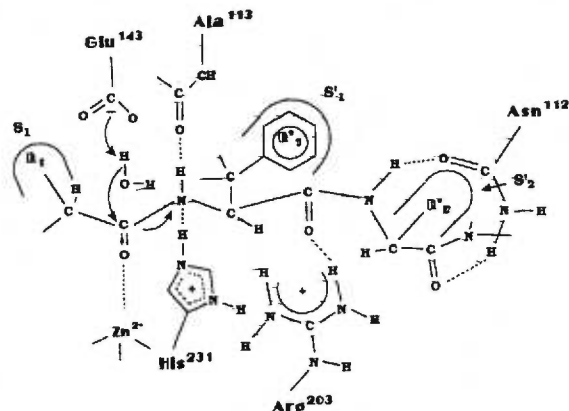
Il existe donc un intérêt thérapeutique important d'inhiber en même temps l'ACE pour éviter la formation de l'angiotensine II, et la NEP pour éviter la dégradation de l'ANP. Ainsi une admission double d'inhibiteurs sélectifs de l'ACE et de la NEP dans des modèles d'hypertension et de faiblesse cardiaque a montré son efficacité.¹² De nombreuses recherches ont donc été conduites pour concevoir des inhibiteurs mixtes de ces deux métalloprotéases.

7.3 Le mécanisme d'action des enzymes ACE et NEP.

La conception d'inhibiteurs mixtes ACE/NEP a été facilitée par le fait que ces deux enzymes appartiennent à la même famille, celles des métallopeptidases. Le mécanisme d'action des métallopeptidases est bien connu grâce aux études par rayons X de la carboxypeptidase A¹³, qui est une exopeptidase, et de la thermolysine (TLN)¹⁴ qui est une endopeptidase bactérienne, cristallisées seules ou en présence d'inhibiteurs.

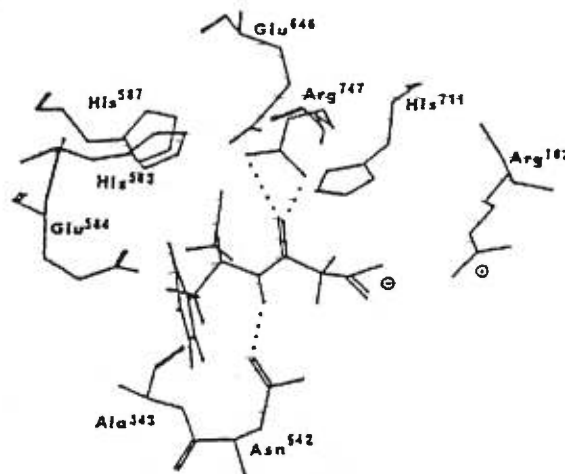
De façon schématique, le mécanisme d'hydrolyse d'un peptide par une métallopeptidase peut être résumé en deux étapes principales (figure 3)⁵: 1) la fonction carboxyle de la liaison peptidique qui va être coupée interagit avec le cation métallique Zn^{2+} , ce qui accentue la polarisation de ce groupement; 2) le carbone de ce même carbonyle subit une attaque nucléophile par une molécule d'eau située dans le site actif. Cette attaque est favorisée par un résidu glutamate (Glu¹⁴³ dans la TLN), ce qui induit une catalyse basique généralisée. La liaison amide ainsi fragilisée est alors rompue et les deux fragments peptidiques sont libérés.

La stabilisation du complexe de Michaelis est assurée par un certain nombre de liaisons de faible énergie entre le substrat et l'enzyme (figure 3). Ce modèle de site actif s'est révélé très général et a permis de concevoir des inhibiteurs de métalloenzymes alors même que leurs séquences et leurs structures demeuraient inconnues.

Figure 3. Schéma du site actif de la thermolysine.

Les structures primaires de la NEP¹⁵ et de l'ACE¹⁶ ont été déterminées après clonage de leur gène. Des expériences de mutagenèse dirigée effectuées sur la NEP ont permis de déterminer les acides aminés présents au site actif de cette enzyme, et de montrer son étroite analogie avec le site actif de la TLN¹⁷ (figure 4).⁵ La seule différence notable est la présence d'une seule arginine (Arg²⁰³) dans le site actif de la TLN, ce qui lui confère son caractère d'endopeptidase et la présence de deux arginines, (Arg¹⁰² et Arg⁷⁴⁷) dans le site actif de la NEP, responsables de son double caractère d'endo et d'exopeptidase.^{17b}

Figure 4. Modèle du site actif de la NEP, déduit des expériences de mutagenèse dirigée.

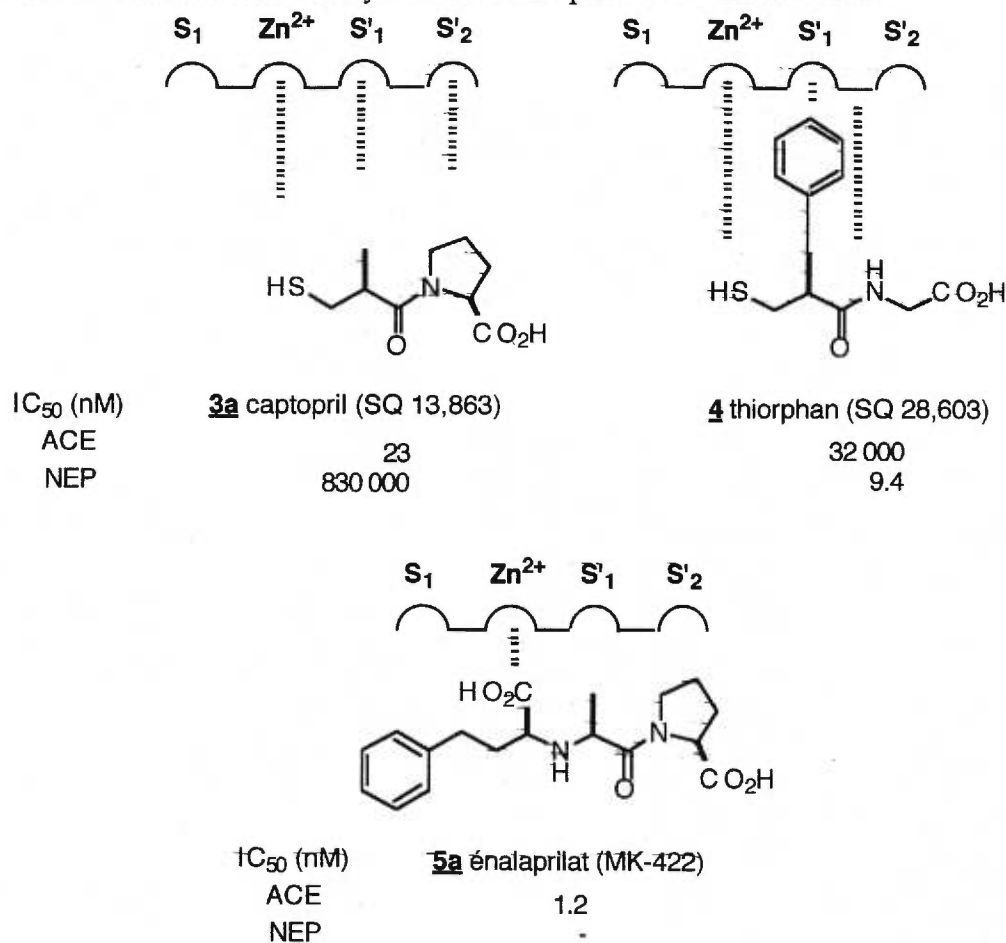


7.4 La conception d'inhibiteur des enzymes ACE et NEP.

Connaissant le mécanisme d'action des métalloprotéases, il a été possible de concevoir des inhibiteurs sélectifs et efficaces de ces enzymes. L'introduction d'un groupement chélatant le zinc sur une structure peptidique a conduit à des inhibiteurs de ces métallopeptidases. Pour l'ACE et la NEP, deux grandes familles d'inhibiteurs ont été décrites (figure 5). La première est constituée des composés du type pseudodipeptidique, interagissant avec les sous-sites S₁' et S₂' des enzymes et possédant un groupement thiol comme ligand du zinc. Ce modèle a conduit à la préparation du captopril **3a**^{10a} (Squibb, SQ 13,863) et du thiorphan **3**¹¹ (Squibb, SQ 28,603), inhibiteurs sélectifs de l'ACE et de la NEP respectivement. La seconde famille est constituée des composés du

type pseudotripeptidique, interagissant avec les sous-sites S_1 , S'_1 et S'_2 des enzymes et possédant un groupement carboxylate comme ligand du zinc. Ce modèle est illustré par la découverte de l'énalaprilat **5a**^{10b} (Merck, MK-422).

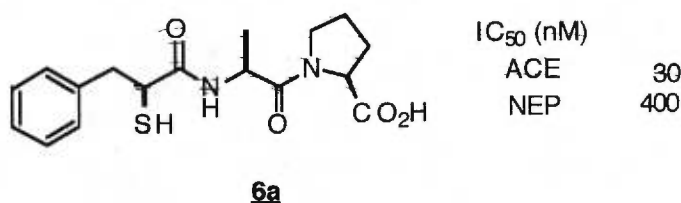
Figure 5. Interactions proposées des inhibiteurs de l'ACE et de la NEP avec les sites actifs des deux enzymes et leurs pouvoirs inhibiteurs.



Ces différents inhibiteurs ont été conçus après prise en compte de la spécificité des sous-sites de liaisons des deux enzymes. Pour l'ACE, le sous-site S'_1 reconnaît, de préférence, des résidus hydrophobes de petite taille, le

sous-site S'2 des résidus hydrophobes aromatiques ou non aromatiques¹⁸ et le sous-site S₁ des résidus hydrophobes aromatiques.^{10d} Pour la NEP, le sous-site S'1 reconnaît préférentiellement un groupement benzyle, le sous-site S'2 des résidus hydrophobes de taille variée¹⁹ et le sous-site S₁, qui est encore mal défini, semble accepter des résidus hydrophobes plutôt aromatiques.²⁰

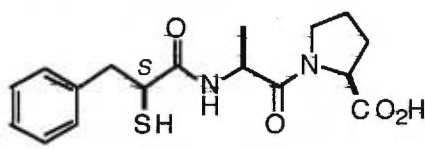
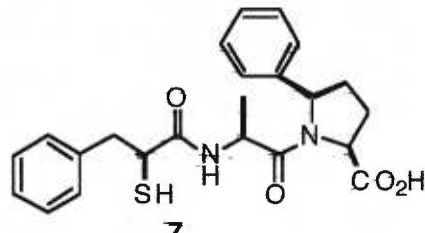
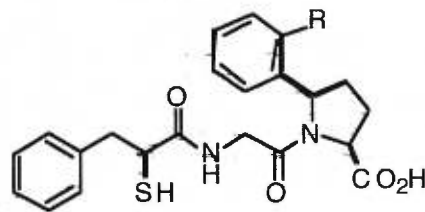
Pour la conception d'inhibiteurs mixtes ACE/NEP, il a fallu combiner la spécificité des deux sites actifs. Une série de molécules pseudotripeptidiques a été ainsi développée avec des structures possédant une proline, une alanine, un résidu benzylique et une fonction thiol, tel que **6a**.²¹ Cette série possède un pouvoir inhibiteur sur l'ACE comparable au captopril avec une certaine inhibition contre la NEP.



Des composés pseudotripeptidiques mercapto-acyles (α -thiol) conformationnellement restreints de la partie alanylproline ont été développés tels des lactames monocycliques (pouvant porter des hétéroatomes,^{22a} tels que des diazépines^{22c}). Les tableaux 1a et 1b présente des exemples sélectifs d'inhibiteurs mixtes et leurs pouvoirs inhibiteurs contre l'ACE et la NEP.²³

Le composé **6a** étant pris comme référence, la plupart de ces inhibiteurs présentent de meilleurs pouvoirs inhibiteurs.

Tableau 1a. Pouvoirs inhibiteurs sur l'ACE et la NEP de composés pseudotripeptidiques mercaptoacétyles représentatifs.

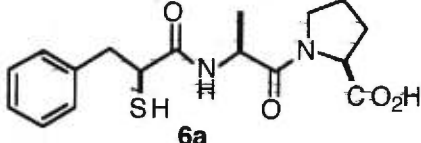
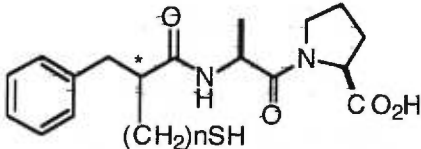
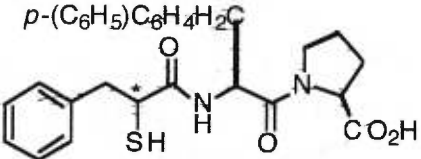
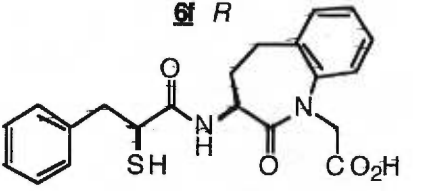
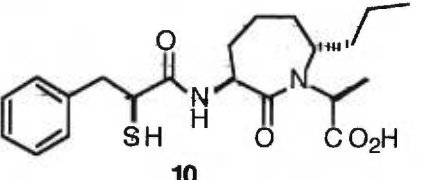
Entrée	Composés	IC ₅₀ (nM)		ACE AI pression ^c ED ₅₀ (μmol/kg iv)	Ref.
		ACE ^a	NEP ^b		
1	 <p>6a</p>	0.3 ± 0.1	3.8 ± 0.6	-	23
2	 <p>7</p>	45 ± 5	10 ± 2	-	24
3	 <p>8a R = H 8b R = OH</p>	0.55 ± 0.05 0.5 ± 0.1	1.6 ± 0.3 1 ± 0.5	-	25

^a Les composés ont été testés avec le N-Cbz-Phe-His-leucine comme substrat.

^b Les composés ont été testés avec le N[³H]Tyr-D-Ala²-Leu-enképhaline comme substrat.

^c Représente la dose requise pour 50% d'inhibition de la réponse de la pression AI chez des rats hypertendus.

Tableau 1b. Pouvoirs inhibiteurs sur l'ACE et la NEP de composés pseudotripeptidiques mercaptoacétyles représentatifs.

Entrée	Composés	IC ₅₀ (nM)		ACE AI pression ^c ED ₅₀ (μmol/kg iv)	Ref.
		ACE ^a	NEP ^b		
1	 6a	30	400	0.06	21
2	 (CH ₂) _n SH	6b	4	6.6	21
		6c	80	285	
		6d	210	45	
<p>6b n = 1, S 6c n = 0, R 6d n = 1, R</p>					
3	 <i>p</i> -(C ₆ H ₅)C ₆ H ₄ H ₂ C	6e	57	117	25
		6f	229	59	
<p>6e S 6f R</p>					
4	 9	12	6	0.02	22f
5	 10	5	17	0.12	22f

^a Les composés ont été testés avec le hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL) comme substrat.

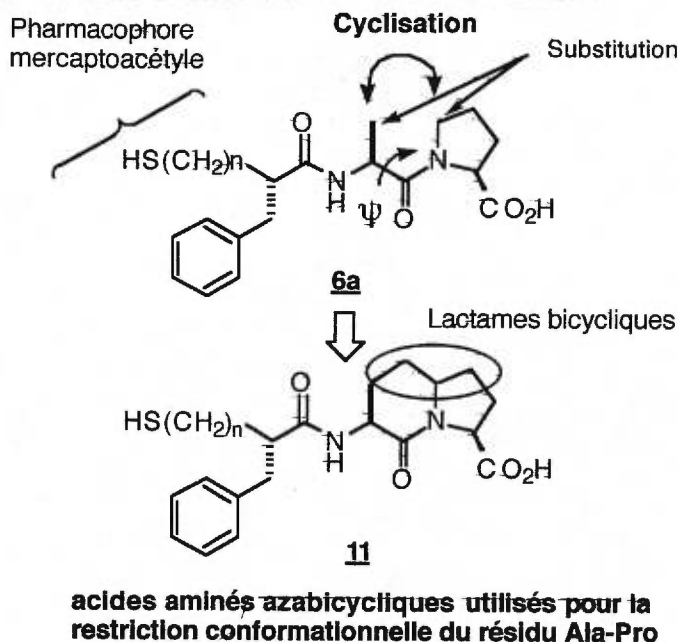
^b Les composés ont été testés avec le ansyl-Gly-Phe-Arg comme substrat.

^c Représente la dose requise pour 50% d'inhibition de la réponse de la pression AI chez des rats hypertendus.

7.5 Les peptidomimétiques utilisés comme inhibiteurs des enzymes ACE et NEP.

De nombreux efforts ont été consacrés pour la conception de nouveaux inhibiteurs des deux métalloprotéases. L'attention s'est donc portée sur le développement de cibles dans lesquelles le résidu alanyl-proline de **6a** a été remplacé par un motif dipeptidique conformationnellement restreint (figure 6).

Figure 6. Restriction conformationnelle du résidu Ala-Pro dans la conception d'inhibiteurs mixtes de l'ACE et de la NEP.



La restriction de l'angle ψ du résidu alanine peut se faire soit par la substitution de la position 5 de la proline ou du méthyle de l'alanine ou soit par la cyclisation entre ces mêmes positions. Les peptidomimétiques de type lactame bicyclique sont donc des candidats parfaits pour la

restriction conformationnelle du résidu Ala-Pro. Ainsi, ils ont été utilisés dans la conception de nouveaux inhibiteurs.

7.5.1 Inhibiteurs de l'ACE.

La restriction du dipeptide alanyl-proline de l'énalaprilat a conduit au développement de nouveaux inhibiteurs prometteurs de l'ACE avec une augmentation de la durée d'action et de la biodisponibilité. Le tableau 2 présente des exemples sélectifs de composés pseudotripeptidiques incorporant des peptidomimétiques inhibiteurs de l'ACE.²⁹ Ces recherches ont conduit à la synthèse de l'inhibiteur **18**,³⁰ le plus actif appartenant à cette catégorie (K_i de 0.004 nM). Par contre, son pouvoir inhibiteur envers la NEP est presque nul.

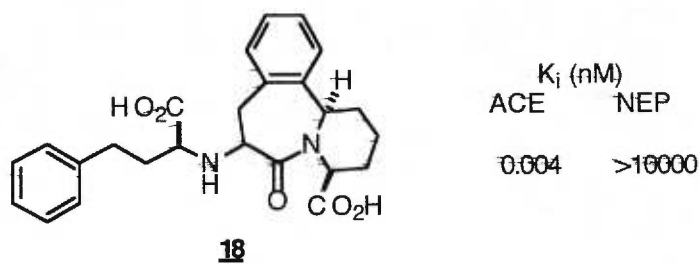
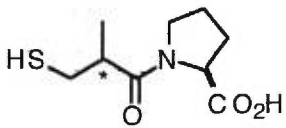
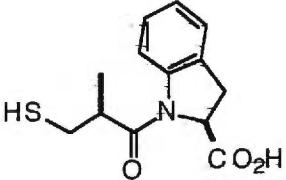
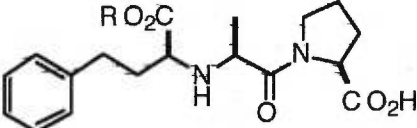
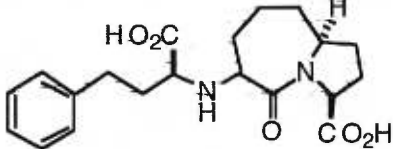
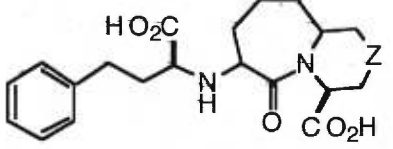
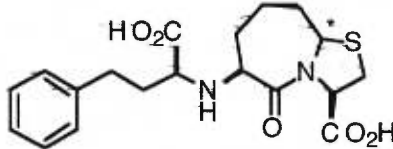
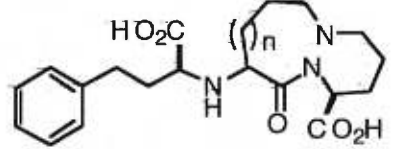
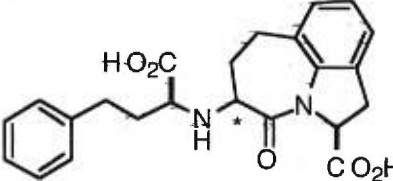
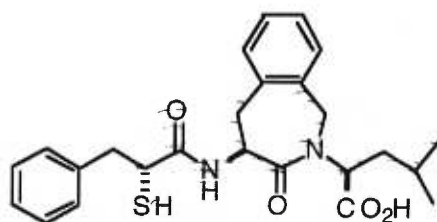


Tableau 2. Pouvoirs inhibiteurs sur l'ACE de composés pseudodipeptidiques représentatifs.

Entrée	Composés	IC ₅₀ (nM)		Ref.	
		ACE	NEP		
1		3a captopril, <i>S</i> (SQ13,863) 3b <i>R</i>	23 2300	830000 -	10a 1c
2		12	3.7	-	27
3		5a R = Et énalapril (MK421) 5b R = H énalaprilat (MK422)	4.5 1.2	- -	1c 27
4		13	2.9	-	28
5		14a MDL27,088 Z = CH ₂ 14b MDL27,788 Z = S	3.8 46	- -	27 1c
6		15a <i>R</i> 15b <i>S</i>	0.6 4	- -	27/28
7		16a n = 0 (racemic) 16b n = 1 cilazapril (RO31-2848)	56 1.8	- -	27
8		17a <i>S</i> 17b <i>R</i>	5.2 15	- -	27

7.5.2 Inhibiteurs de la NEP.

Peu d'exemples d'inhibiteurs de la NEP incorporent des peptidomimétiques. Un exemple est le composé **19**, un mimétique pseudotripeptidique restreint de Phe-Leu, inhibiteur de la NEP.³¹

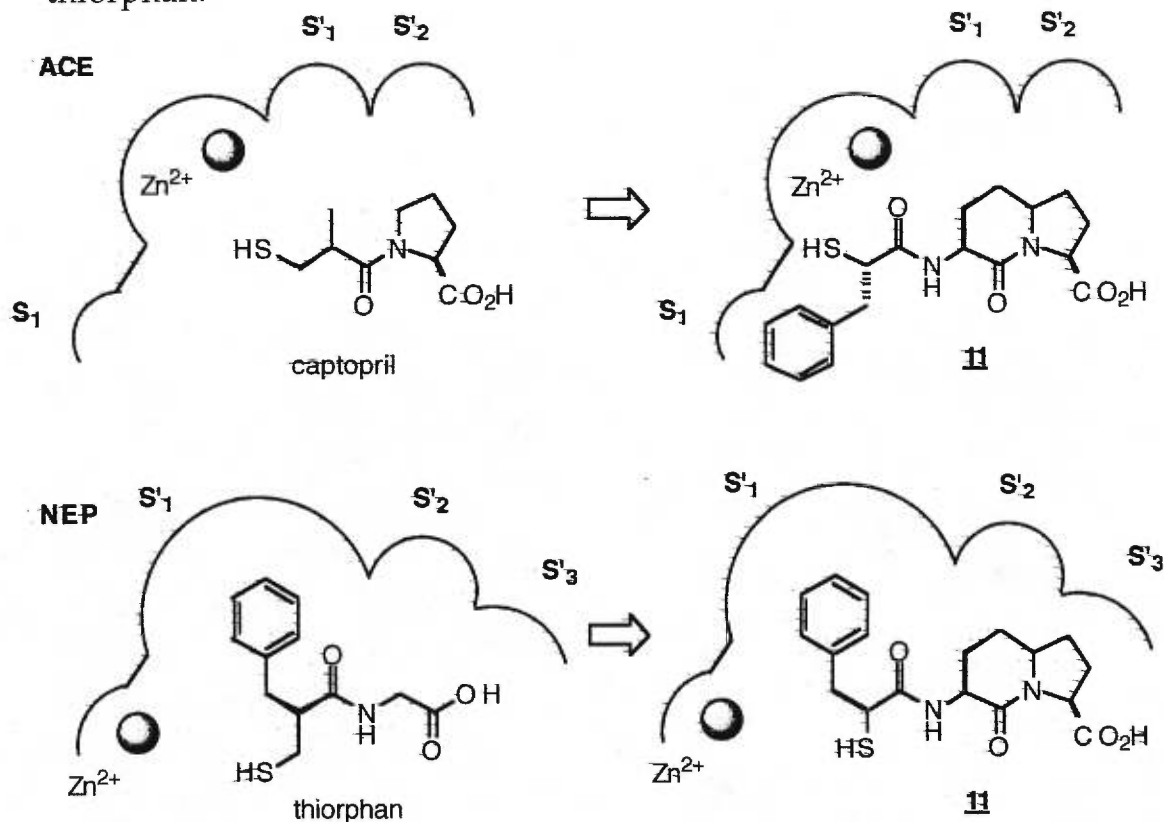


19 MDL100,407
 $K_i = 0.4 \text{ nM}$

7.5.3 Inhibiteurs mixtes ACE/NEP.

Pour la conception d'inhibiteurs mixtes ACE/NEP, il a fallu prendre en compte la spécificité des deux sites actifs des deux enzymes, en particulier les interactions avec les sous-sites S'1 et S'2 de l'ACE et avec les sous-sites S1, S'1 et S'2 de la NEP (figure 7)^{32b,c}.

Figure 7. Modes de liaisons proposés pour les analogues de type 11 dans les sites actifs de l'ACE et de la NEP par rapport à ceux du captopril et du thiorphan.



Le changement du pharmacophore acide par un pharmacophore thiol, comme ligand du zinc, a permis le développement d'inhibiteurs efficaces des deux métalloprotéases, l'ACE et la NEP. Par exemple, les entrées 19 et 20 du tableau 3 montrent deux analogues possédant les deux pharmacophores, avec une amélioration très sensible du pouvoir inhibiteur contre la NEP, tout en gardant une bonne inhibition contre l'ACE.

La conception d'inhibiteurs des métalloprotéases ACE et NEP a été menée avec l'utilisation des acides aminés azabicycliques. Ces lactames bicycliques, conformationnellement restreints, sont des cibles presque parfaites pour le remplacement de la partie Ala-Pro. Le tableau 3 présente quelques exemples d'inhibiteurs doubles et leurs pouvoirs inhibiteurs contre l'ACE et la NEP *in vitro* et certaines activités contre l'ACE *in vivo*.

Au niveau du choix du pharmacophore, l'activité contre l'ACE des dérivés mercapto-acyles (type A ou B, figure 8) est supérieure *in vivo* par rapport aux dérivés mercapto-propanoyles (type C, figure 4); cependant, *in vitro*, de meilleures activités contre l'ACE et la NEP sont enregistrées pour les dérivés mercapto-propanoyles (**20a** vs **21b**, entrée 1, tableau 3a). Une inhibition *in vitro* optimale de l'ACE est obtenue avec une stéréochimie *S* du pharmacophore (type B, figure 4); par contre, les inhibitions *in vitro* de la NEP sont équivalentes avec une stéréochimie *S* ou *R* du pharmacophore (type A ou B, figure 4; **30a** vs **30b**, entrées 20 et 21, tableau 3a). En général, de meilleurs pouvoirs inhibiteurs contre à la fois l'ACE et

Tableau 3. Pouvoirs inhibiteurs sur l'ACE et la NEP d'analogues azabicycliques.

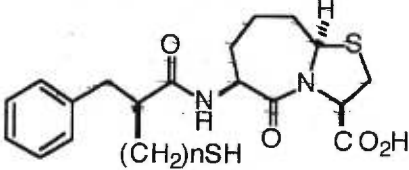
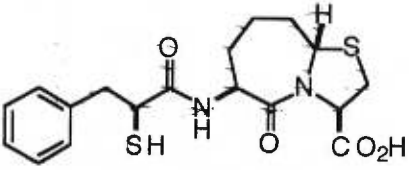
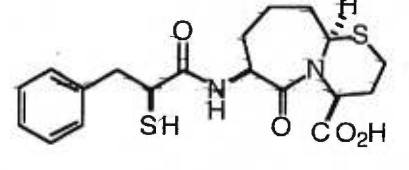
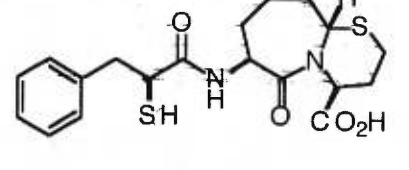
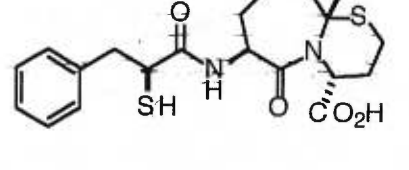
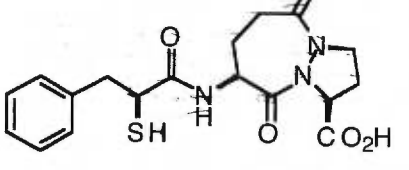
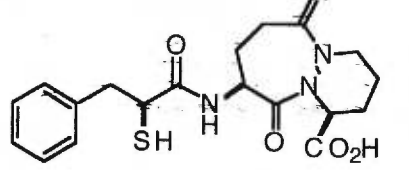
Entrée	Composés	IC ₅₀ (nM)		ACE AI pressor ^c ED ₅₀ (μmol/kg iv)	Ref.	
		ACE	NEP			
1	 $(CH_2)_nSH$	20a n = 0	16	11.5	0.07	22e
		20b n = 1	5.5	1.1	0.80	
2		20c	11.5	2820	-	22e
3		21a	25	42	-	22e
4		21b	11.6	133	-	22e
5		21c	205	937	-	22e
6		22a x = H	12	22	0.12	22c
		22b x = O	20	140	-	
7		23a x = H	8	3	0.01	22c
		23b x = O	7	16	0.23	

Tableau 3a. Suite.

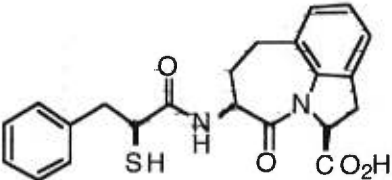
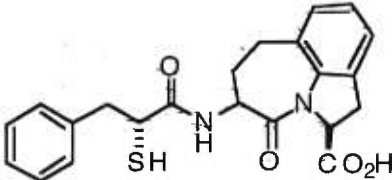
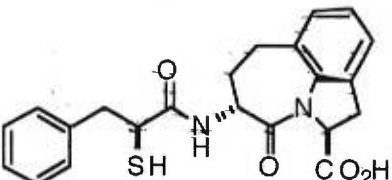
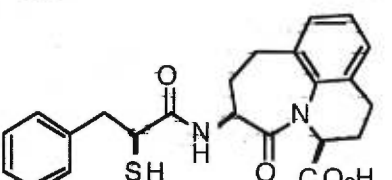
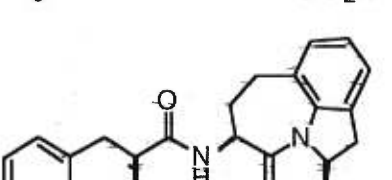
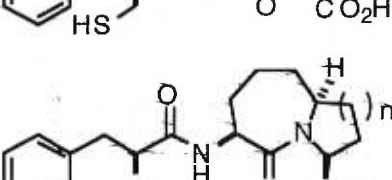
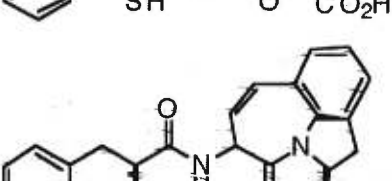
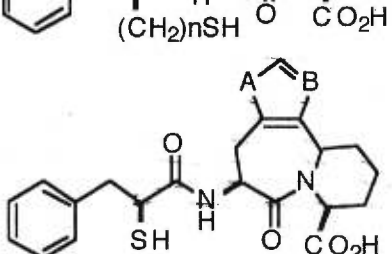
Entrée	Composés	IC ₅₀ (nM)		ACE AI pression ED ₅₀ (μmol/kg iv)	Ref.	
		ACE	NEP			
8		40	48	-	32b	
		13	50	-	33	
		9.9	50	0.013	22g	
9		288	83	-	32b	
10		62	>1000	-	32b	
11		9.9	17	0.013	33 22g	
12		3.7	1.0	1.75	22g	
13		25 n = 1	5	18	0.06	22f
		25 n = 2	11	25	0.12	
14		27a n = 0	19.7	102	-	22g
		27b n = 1	17.7	17.7	-	
15		28a A = S, B = C	8.5	5.3	0.011	22g
		28b A = C, B = S	7.8	4.9	0.04	

Tableau 3a. Suite.

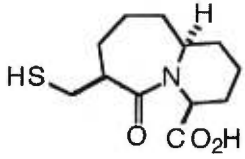
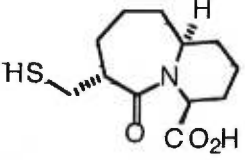
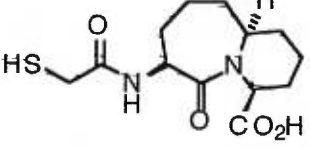
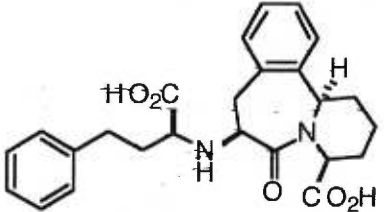
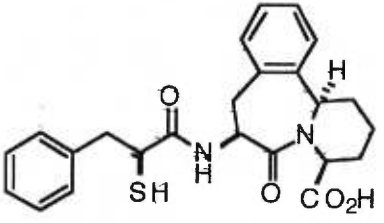
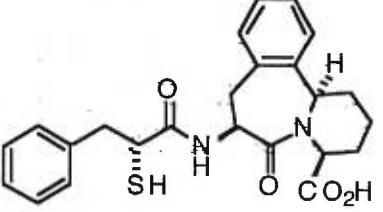
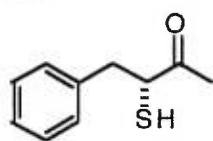
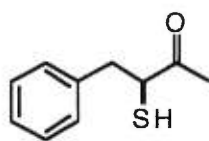
Entrée	Composés	IC ₅₀ (nM)		Ref.	
		ACE	NEP		
16		29a	2	>300	29c
17		29b	>7	45	29c
18		29c	2	5	29c
19		18	0.004	>10000	29c
20		30a	0.11	0.08	29c
21		30b	4.5	0.07	29c

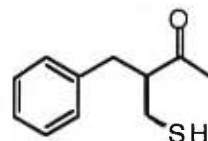
Figure 8. Pharmacophores thiol utilisés dans les inhibiteurs de l'ACE et de la NEP.



A: mercapto-acétyle
dérivé de
l'acide (*R*)-2-mercapto-
3-phénylpropanoïque



B: mercapto-acétyle
dérivé de
l'acide (*S*)-2-mercapto-
3-phénylpropanoïque

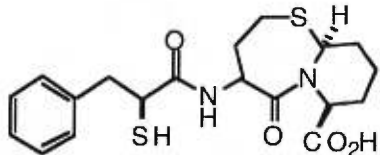
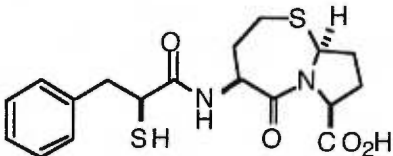
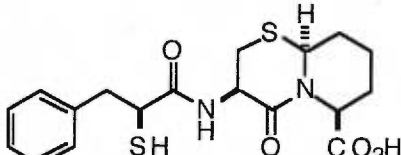
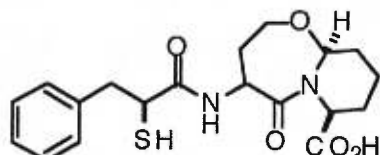
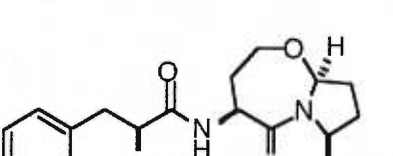
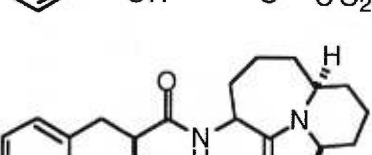
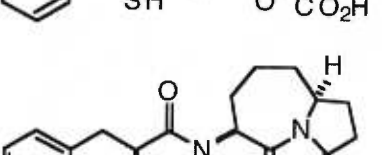


C: mercapto-propanoyle
dérivé de
l'acide (*R*)-3-mercapto-
3-benzylpropanoïque

La configuration de la tête de pont a effet accru sur le potentiel inhibiteur contre la NEP que contre l'ACE. Par exemple, l'analogue concave **20a** présente une plus grande activité contre la NEP que l'analogue convexe **20c** (entrées 1 et 2, tableau 3a). Dans tous les cas, les fonctions carboxyle et amine doivent être sur la même face du système azabicyclique. Les analogues azabicycliques de type [X.5.0], tel que **25**, présentent généralement des activités supérieures à celles des analogues azabicycliques de type [X.6.0], tel que **26** (entrée 13, tableau 3a).

Récemment, une étude comparative avec des dérivés thiazépinones et oxazépinones bicycliques a été publiée (tableau 3b).³⁴ Ces analogues sont des inhibiteurs potentiels des deux enzymes à la fois *in vitro* et *in vivo*. La recherche d'inhibiteurs du système double ACE/NEP a fait des progrès récents en utilisant des acides aminés azabicycliques au point qu'un analogue comme **26b** (tableau 3b, entrée 1) a été choisi pour un développement en phase clinique (phase II) pour le traitement de l'hypertension et de l'insuffisance cardiaque.

Tableau 3b. Pouvoirs inhibiteurs sur l'ACE et la NEP d'analogues azabicycliques.

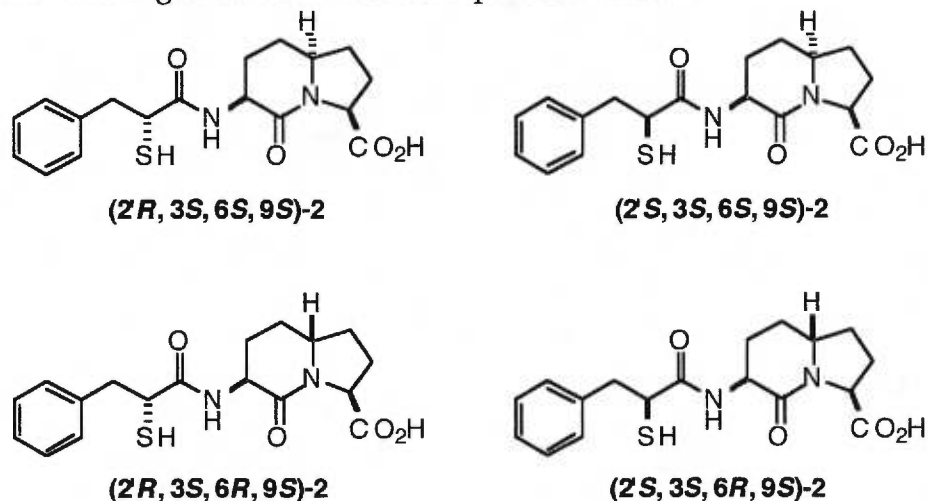
Entrée	Composés	IC ₅₀ (nM) ACE	NEP	ACE AI pression ED ₅₀ (μmol/kg iv)	Ref.
1		5	8	0.07	34
2		4	4	0.03	34
3		5	42	0.23	34
4		8	9	0.05	34
5		7	26	0.06	34
6		11	25	0.12	22f
7		5	18	0.06	22f

7.6 Stratégie et synthèse des analogues incorporant l'AAI.

7.6.1 Stratégie.

A travers les études de modélisation moléculaire et l'examen de modèles physiques, l'insertion d'une chaîne polyméthylène entre la position 5 de la proline et le méthyle de l'alanine permet une restriction de l'angle ψ de l'alanine.^{10d} Notre synthèse de l'AAI nous donne accès à ce type de peptidomimétique, qui peut être utilisé comme motif conformationnellement restreint d'analogue alanylproline. Pour cela, en liant l'unité AAI à un résidu mercaptoacycle, quatre composés **2** ont été considérés afin d'examiner leurs activités biologiques contre l'ACE et de la NEP (figure 9).

Figure 9. Analogues considérés incorporant l'AAI.



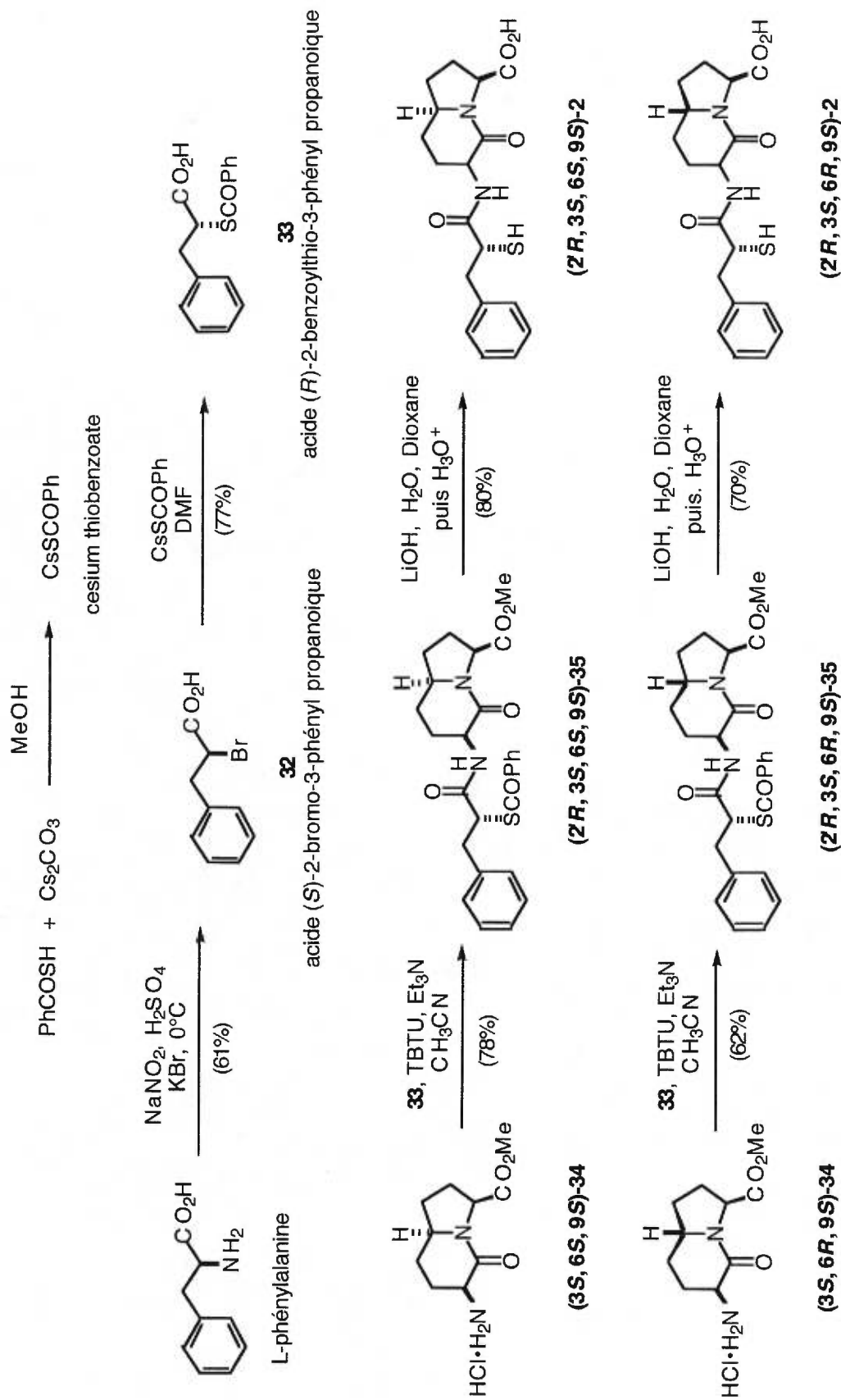
Le pharmacophore 2'R-mercapto-1'-oxo-3'-phénylpropyle a été choisi pour faire une évaluation qualitative des deux peptidomimétiques

à partir d'un modèle connu. A partir de l'acide aminé L-phénylalanine, les deux analogues (2'R, 3S, 6S, 9S)-2 et (2'R, 3S, 6R, 9S)-2 ont été synthétisés.

7.6.2 Synthèse.

Les synthèses des deux analogues 2 sont présentées sur le schéma 1. L'acide (R)-2-benzylthio-3-phénylpropanoïque a été synthétisé en deux étapes à partir de la L-phénylalanine avec une inversion de stéréochimie. L' α -amine de la phénylalanine est d'abord convertie avec une rétention de configuration en l'acide α -bromo 32.³⁵ L'utilisant du nitrite de sodium dans l'acide sulfurique convertit l'amine en azide, qui est ensuite déplacé par l' α -acide pour conduire à la formation d'une α -lactone. Cette lactone est ensuite ouverte *in situ* par le bromure de potassium pour donner 32 avec un rendement de 61%. L'utilisation du sel de césium de l'acide thioacétique³⁶ permet par une réaction S_N2 la conversion du bromure 32 en l'acide benzylthio 33 avec un rendement de 77%. Les esters (6S)-34 et (6R)-34, tous deux obtenus par une déprotection quantitative de la protection Boc des indolizidinones (3S, 6S, 9S)-Boc-AAI-OMe et (3S, 6R, 9S)-Boc-AAI-OMe respectivement par l'acide chlorhydrique dans le dichlorométhane, sont acylés avec l'acide benzylthio 33, en utilisant le tétrafluoroborate de benzotriazol-1-yl-1,1,3,3-tétraméthyluronium³⁷ (TBTU) et la triéthylamine dans l'acétonitrile. Les analogues protégés (2'R, 3S, 6S, 9S)-35 et (2'R, 3S, 6R, 9S)-35 ont été obtenus avec des rendements de 78% et 62% respectivement. Les déprotections des fonctions ester et thioester ont été effectuées avec l'hydroxyde de lithium dans un mélange

Schéma 1. Synthèse des deux analogues (2'R, 3S, 6S, 9S)-2 et (2'R, 3S, 6R, 9S)-2



dioxane-eau. Ces réactions ont été suivies par HPLC analytique et spectrométrie de masse. Ces analyses ont montré des réactions complètes après 2 h. La purification par HPLC préparative³⁸ puis lyophilisation conduit aux analogues désirés (2'R, 3S, 6S, 9S)-2 et (2'R, 3S, 6R, 9S)-2 avec des rendements de 80% et 70% respectivement.

7.7 Résultats et commentaires.

Les activités biologiques des composés (2'R, 3S, 6S, 9S)-2 et (2'R, 3S, 6R, 9S)-2 ont été mesurées contre l'ACE et la NEP. Les activités contre l'ACE et la NEP ont été déterminées dans les laboratoires des professeurs Roques et Crine respectivement et ont donné les résultats suivant, exprimés en nM (les courbes d'inhibition sont présentées dans l'annexe 3):

Tableau 4. Pouvoirs inhibiteurs sur l'ACE et la NEP des analogues (2'R, 3S, 6S, 9S)-2 et (2'R, 3S, 6R, 9S)-2.

	ACE	NEP
(2'R, 3S, 6S, 9S)-2	10.4	0.87
(2'R, 3S, 6R, 9S)-2	512	7363

Ainsi les analogues présentent d'excellentes valeurs d'inhibition contre l'ACE, en particulier pour l'analogue (2'R, 3S, 6R, 9S)-2. Par contre le pouvoir inhibiteur est modeste contre la NEP. Ces derniers résultats pourraient s'expliquer par le mauvais choix du pharmacophore thiol.

7.8 Partie expérimentale.

General: Experimental protocols were conducted as described in the general section of the article of chapter 6.

(S)-2-Bromo-3-phenylpropanoic acid (32).^{35a} A solution of potassium bromide (4.02 g, 34.0 mmol, 340 mol %) in sulfuric acid (20 mL, 2.5 N) was treated with L-phenylalanine (1.65 g, 10.0 mmol, 100 mol %) and the solution was cooled to 0 °C. Solid sodium nitrite (1.05 g, 15.0 mmol, 150 mol%) was added in portions over a period of 15 min. After stirring for 1 h at 0 °C and 2 h at room temperature, the product was extracted with Et₂O (3 × 10 mL). The combined organic layers were washed successively with H₂O (10 mL) and brine (10 mL), dried and evaporated to afford a light yellow oil. This oil was taken up in ether and diluted with hexane until cloudy and then let stand overnight at 4 °C. Colorless needles of 2-hydroxy-1-phenylpropanoic acid were collected. The filtrate was evaporated and the residue was distilled at low pressure (0.6 mm, 160 °C) to give the bromide as a colorless oil.

(S)-2-Bromo-3-phenyl propanoic acid (32, 1.4 g, 61%): $R_f = 0.46$ (1:1 EtOAc:hexane); ¹H NMR δ 3.2 (m, 1 H, CH₂), 3.43 (m, 1 H, CH₂), 4.40 (m, 1 H, CH_α), 7.30 (m, 5 H, Ar), 11.40 (s br, 1 H, OH); ¹³C NMR δ 41.2 (CH₂), 45.0 (CH_α), 127.3, 128.7, 129.1 (3 CH_{Ar}), 136.2 (C_q Ar), 184.5 (CO OH).

(R)-2-(Benzoylthio)-3-phenylpropanoic acid (33).³⁶ Cesium thiobenzoate was prepared by addition of cesium carbonate (Cs₂CO₃, 193 mg, 1.0 mmol) to a solution of freshly distilled thiobenzoic acid (129 μl, 1.1 mmol, 110

mol %) in methanol (2 mL). The solvent was removed under vacuum and the residue was triturated three times with dry acetone and evaporated to yield a white powder.

A solution of (*S*)-2-bromo-3-phenylpropanoic acid (**32**, 230 mg, 1 mmol) in DMF (1.5 mL) was treated with cesium thiobenzoate (297 mg, 1.05 mmol, 105 mol %). The solution was stirred at room temperature for 20 h and the DMF was removed *in vacuo*. The residue was dissolved in Et₂O (5 mL), washed successively with H₂O (2 mL) and brine (2 mL), dried and evaporated to afford a white solid which was recrystallized from petroleum ether.

(*R*)-2-(Benzoylthio)-3-phenylpropanoic acid (**33**, 222 mg, 77%): $R_f = 0.32$ (1:1 EtOAc:hexane); mp 104-105 °C (lit.³⁶: 103-104 °C); $[\alpha]_D^{20} +3.5^\circ$ (c 0.5, CHCl₃) (lit.³⁶: $+3.2^\circ$, c 0.5, CHCl₃); ¹H NMR δ 3.04 (dd, 1 H, CH₂, $J = 7.6, 14.1$ Hz), 3.29 (dd, 1 H, CH₂, $J = 7.6, 14.1$ Hz), 4.56 (t, 1 H, CH _{α} , $J = 7.6$ Hz), 7.18 (s, 5 H, Ar_{Bz}), 7.10-7.80 (m, 5 H, Ar_{Bn}), 9.99 (s br, 1 H, OH); ¹³C NMR δ 37.4 (CH₂), 47.2 (CH _{α}), 127.1, 127.4, 128.5, 128.7, 129.1, 133.8 (2 CH_{Ar}), 135.9, 136.9 (2 C_q Ar), 176.5 (CO_{SBz}), 189.9 (CO_{OH}).

(3*S*, 6*S*, 9*S*)- and (3*S*, 6*R*, 9*S*)-Methyl 2-Oxo-3-amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate hydrochloride ((3*S*, 6*S*, 9*S*)-34** and (3*S*, 6*R*, 9*S*)-**34**)**. To a stirred solution of either (3*S*, 6*S*, 9*S*)- or (3*S*, 6*R*, 9*S*)-Boc-IAA-OMe (0.21 mmol, 66 mg) in dichloromethane (2 mL) was bubbled a stream of HCl gas at room temperature for 15 min when TLC analysis (1:1 EtOAc:hexane) indicated complete disappearance of the starting carbamate. The white precipitate was filtered to give the hydrochloride salt **34**.

(3*S*, 6*S*, 9*S*)-Methyl 2-Oxo-3-amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate hydrochloride ((3*S*, 6*S*, 9*S*)-**34**, 52 mg, 100%): $R_f = 0.35$ (4:1:1 *n*-BuOH:AcOH:H₂O); mp 85-90 °C; $[\alpha]_D^{20} -54.9^\circ$ (*c* 1.0, CH₃OH); ¹H NMR (CD₃OD) δ 1.66-1.79 (m, 2 H, CH₂ IAA-4 α ,5), 1.93 (m, 1 H, CH₂ IAA-7), 2.09 (m, 1 H, CH₂ IAA-8), 2.17-2.34 (m, 3 H, CH₂ IAA-5,7,8), 2.46 (m, 1 H, CH₂ IAA-4 β), 3.73 (s, 3 H, CH₃), 3.71 (dddd, 1 H, *J* = 10.1, 10.1, 5, 5, CH IAA-6), 4.04 (t, 1 H, *J* = 8.6, CH IAA-3), 4.49 (d, 1 H, *J* = 8.7, CH IAA-9); ¹³C NMR (CD₃OD) δ 23.9 (CH₂ IAA-C5), 26.6 (CH₂ IAA-C4), 29.1 (CH₂ IAA-C8), 31.8 (CH₂ IAA-C7), 49.0 (CH IAA-3), 52.6 (CH IAA-OMe), 57.1 (CH IAA-6), 58.6 (CH IAA-9), 167.1 (CO IAA), 172.0 (CO IAA); HRMS calcd for C₁₀H₁₇N₂O₃ (MH⁺) 213.1239, found 213.1246.

(3*S*, 6*R*, 9*S*)-Methyl 2-Oxo-3-amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate hydrochloride ((3*S*, 6*R*, 9*S*)-**34**, 52 mg, 100%): $R_f = 0.35$ (4:1:1 *n*-BuOH:AcOH:H₂O); ¹H NMR (CD₃OD) δ 1.60-1.78 (m, 2 H, CH₂ IAA-4 α ,5), 1.87-2.12 (m, 3 H, CH₂ IAA-5,7,8), 2.20-2.30 (m, 2H, CH₂ IAA-7,8), 2.40 (m, 1 H, CH₂ IAA-4 β), 3.65 (m, 1 H, CH IAA-6), 3.70 (s, 3 H, CH₃), 3.90 (m, 1 H, CH IAA-3), 4.41 (d, 1 H, *J* = 8.7 Hz, CH IAA-9); ¹³C NMR (CD₃OD) δ 27.3 (CH₂ IAA-C5), 28.1 (CH₂ IAA-C4), 29.4 (CH₂ IAA-C8), 32.4 (CH₂ IAA-C7), 51.5 (CH IAA-3), 53.1 (CH IAA-OMe), 59.6 (CH IAA-6), 62.3 (CH IAA-9), 166.5 (CO IAA), 173.5 (CO IAA).

(2'*R*, 3*S*, 6*S*, 9*S*)-Methyl 2-Oxo-3-(2'-(benzoylthio)-1'-oxo-3'-phenylpropanoyl)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate ((2'*R*, 3*S*, 6*S*, 9*S*)-35**). Crude hydrochloride ((3*S*, 6*S*, 9*S*)-**34**, 73 mg, 0.225 mmol, 100 mol %) in acetonitrile (2 mL) was treated with (*R*)-2-(benzoylthio)-3-phenylpropanoic acid (**33**, 71 mg, 0.248 mmol, 110 mol %) followed by**

benzotriazol-1-yl-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate³⁷ (TBTU, 81 mg, 0.44 mmol, 120 mol %) and triethylamine (67 μ L, 0.478 mmol, 210 mol %) and the solution was stirred at room temperature for 3 h when TLC analysis (4:1:1 *n*-BuOH:AcOH:H₂O) indicated complete disappearance of the starting hydrochloride **34**. Brine (7 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3 \times 5 mL). The combined organic layers were washed successively with 2 N HCl (0.8 mL), H₂O (0.8 mL), 5% NaHCO₃ (0.8 mL) and H₂O (0.8 mL), dried, and evaporated to afford an oil that was chromatographed with 1:2 hexane in EtOAc as eluant to yield a colorless oil.

(2'*R*, 3*S*, 6*S*, 9*S*)-Methyl 2-Oxo-3-(2'-(benzoylthio)-1'-oxo-3'-phenylpropanoyl)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate ((2'*R*, 3*S*, 6*S*, 9*S*)-**35**, 84 mg, 78%): $R_f = 0.6$ (2:1 EtOAc:hexane); $[\alpha]_D^{20} +16.2^\circ$ (*c* 1.3, CHCl₃); ¹H NMR δ 1.30 (m, 1 H, CH₂ IAA-4 α), 1.50-1.66 (m, 2 H, CH₂ IAA-5,7), 1.95-2.15 (m, 4 H, CH₂ IAA-5,7,8,8), 2.39 (m, 1 H, CH₂ IAA-4 β), 3.02 (dd, 1 H, *J* = 9, 13.7 Hz, PhCH₂), 3.35 (dd, 1 H, *J* = 6.6, 13.7 Hz, PhCH₂), 3.62 (m, 1 H, CH IAA-6), 3.64 (s, 3 H, CH₃), 4.22 (m, 1 H, CH IAA-3), 4.36-4.42 (m, 2 H, CH IAA-9, CH α), 7.08 (d, 1 H, *J* = 5.5 Hz, NH), 7.21 (s, 5H, Ar B_Z), 7.10-7.80 (m, 5H, Ar B_N); ¹³C NMR δ 26.2 (CH₂ IAA-C5), 26.9 (CH₂ IAA-C4), 29.1 (CH₂ IAA-C8), 32.0 (CH₂ IAA-C7), 37.6 (PhCH₂), 48.1 (CH α), 49.4 (CH IAA-3), 52.4 (CH IAA-OMe), 56.3 (CH IAA-6), 58.1 (CH IAA-9), 126.8, 127.5, 128.4, 128.6, 129.2, 133.7 (CH Ar), 136.3, 137.7 (C_q Ar), 168.5, 170.0, 172.0 (CO), 190.6 (CO B_Z); HRMS calcd for C₂₆H₂₉N₂O₅S (MH⁺) 481.1797, found 481.1808.

(2'R, 3S, 6R, 9S)-Methyl 2-Oxo-3-(2'-(benzoylthio)-1'-oxo-3'-phenylpropanoyl)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate ((2'R, 3S, 6R, 9S)-35) was prepared by the same procedure as described for (2'R, 3S, 6S, 9S)-**35** using (3S, 6R, 9S)-methyl 2-oxo-3-amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate hydrochloride ((3S, 6R, 9S)-**34**, 68 mg, 0.21 mmol). Purification by chromatography using 1:3 hexane in EtOAc as eluant yield a colorless oil.

(2'R, 3S, 6R, 9S)-Methyl 2-Oxo-3-(2'-(benzoylthio)-1'-oxo-3'-phenylpropanoyl)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate ((2'R, 3S, 6R, 9S)-**35**, 63 mg, 62%): $R_f = 0.54$ (3:1 EtOAc:hexane); $^1\text{H NMR } \delta$ 1.60-1.76 (m, 2 H, CH_2 IAA-4 α ,5), 1.94-2.02 (m, 2 H, CH_2 IAA-7,8), 2.05-2.15 (m, 3 H, CH_2 IAA-5,7,8), 2.36 (m, 1 H, CH_2 IAA-4 β), 3.07 (dd, 1 H, $J = 8.3, 14.3$ Hz, PhCH_2), 3.42 (dd, 1 H, $J = 7.1, 14.2$ Hz, PhCH_2), 3.61 (m, 1 H, CH IAA-6), 3.68 (s, 3 H, CH_3), 4.06 (m, 1 H, CH IAA-3), 4.36-4.48 (m, 2 H, CH IAA-9, CH_α), 6.90 (d, 1 H, $J = 5.4$ Hz, NH), 7.25 (s, 5 H, Ar Bz), 7.10-7.80 (m, 5 H, Ar Bn); $^{13}\text{C NMR } \delta$ 27.5 (CH_2 IAA-C5), 27.6 (CH_2 IAA-C4), 28.3 (CH_2 IAA-C8), 31.4 (CH_2 IAA-C7), 36.5 (PhCH_2), 47.4 (CH_α), 51.5 (CH IAA-3), 52.2 (CH IAA-OMe), 58.0 (CH IAA-6), 60.3 (CH IAA-9), 126.7, 127.4, 128.3, 128.5, 129.2, 133.7 (CH Ar), 136.1, 137.6 (C_q Ar), 167.4, 170.5, 172.1 (CO), 191.3 (CO Bz).

(2'R, 3S, 6S, 9S)- 2-Oxo-3-(2'-mercapto-1'-oxo-3'-phenylpropanoyl)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate ((2'R, 3S, 6S, 9S)-2). A solution of (2'R, 3S, 6S, 9S)-Methyl 2-Oxo-3-(2'-(benzoylthio)-1'-oxo-3'-phenylpropanoyl)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate ((2'R, 3S, 6S, 9S)-**35**, 78 mg, 0.162 mmol) in dioxane (1.5 mL) was treated with 1 M LiOH solution (0.65 mL, 0.648 mmol, 400 mol %) and stirred at rt for 2 h

when TLC analysis (2:1 EtOAc:hexane) indicated complete disappearance of the starting ester **35**. Analysis by analytical HPLC showed loss of starting material (peak at Retention time = 22.17 min) and appearance of two new peaks (Retention time = 13.32 min for benzoic acid and Retention time = 15.45 min for **2**). The mixture was partitioned between EtOAc (5 mL) and 1 M NaH₂PO₄ (5 mL). The aqueous phase was extracted with EtOAc (3 × 4 mL) and the organic layers were combined, washed with brine, dried, and evaporated to a crude solid. Purification²⁶ of this compound was performed by HPLC on a preparative inverse phase Watman column C-18 (10 μm, 100 Å, 22 × 500 mm) eluting with a linear gradient of H₂O:CH₃CN:TFA = 60:40:0.01 to 0:100:0.01 (v/v) over 60 min with a flow rate of 20 mL min⁻¹ and detection at 220 nm. Lyophilization of the appropriate fractions afforded the desired compound **2** as a white solid.

(2'R, 3S, 6S, 9S)- 2-Oxo-3-(2'-mercapto-1'-oxo-3'-phenylpropanoyl)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate ((2'R, 3S, 6S, 9S)-**2**, 47 mg, 80%): *R*_f = 0.24 (1:1 MeOH:EtOAc); Retention time = 15.45 min; ¹H NMR (CD₃OD) δ 1.31-1.40 (m, 1 H, CH₂ IAA-4_α), 1.42-1.50 (m, 1 H, CH₂ IAA-5), 1.62 (m, 1 H, CH₂ IAA-7), 1.94-2.30 (m, 5 H, CH₂ IAA-5,7,8,8,4_β), 2.94 (dd, 1 H, *J* = 6.9, 13.7 Hz, PhCH₂), 3.18 (dd, 1 H, *J* = 8.0, 13.7 Hz, PhCH₂), 3.41 (ddd, 1 H, *J* = 7.6, 7.6, 7.6 Hz, CH IAA-3), 3.61 (dddd, 1 H, *J* = 5.1, 5.1, 10.2, 10.2 Hz, CH IAA-6), 4.32 (ddd, 1 H, *J* = 7.4, 7.4, 7.4 Hz, CH_α), 4.43 (d, 1 H, *J* = 8.6 Hz, CH IAA-9), 7.08 (d, 1 H, *J* = 5.5 Hz, NH), 7.09-7.21 (m, 5 H, Ar), 8.41 (s br, 1 H, OH); ¹³C NMR (CD₃OD) δ 26.4 (CH₂ IAA-C5), 26.5 (CH₂ IAA-C4), 28.5 (CH₂ IAA-C8), 32.0 (CH₂ IAA-C7), 42.2 (CH₂ MA), 44.2 (CH MA-α), 49.1 (CH IAA-3), 57.3 (CH IAA-6), 58.8 (CH IAA-3), 126.9, 128.4, 129.2 (CH Ar), 137.9 (C_q Ar), 170.0, 172.2, 173.6

(CO); MS calcd for C₁₈H₂₃N₂O₄S (MH⁺) 363.4, found (MH⁺) 363.1; HRMS calcd for C₁₈H₂₃N₂O₄S (MH⁺) 363.1378.

(2'R, 3S, 6R, 9S)- 2-Oxo-3-(2'-mercapto-1'-oxo-3'-phenylpropanoyl)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate ((2'R, 3S, 6R, 9S)-2) was prepared by the same procedure as described for (2'R, 3S, 6S, 9S)-2 using (2'R, 3S, 6R, 9S)-methyl 2-oxo-3-(2'-(benzoylthio)-1'-oxo-3'-phenylpropanoyl)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate ((2'R, 3S, 6R, 9S)-35, 62 mg, 0.129 mmol). Analysis by analytical HPLC showed loss of starting ester 35 (peak at Retention time = 21.14 min) and appearance of two new peaks (Retention time = 13.30 min for benzoic acid and Retention time = 14.95 min for 2). Purification³⁸ of this compound by preparative inverse phase HPLC and lyophilization of the appropriate fractions afforded the desired compound 2 as a white solid.

(2'R, 3S, 6R, 9S)- 2-Oxo-3-(2'-mercapto-1'-oxo-3'-phenylpropanoyl)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate ((2'R, 3S, 6R, 9S)-2, 33 mg, 70%): R_f = 0.27 (1:1, MeOH:EtOAc); Retention time = 14.95 min; mp 116-117 °C; ¹H NMR (CD₃OD) δ 1.48-1.756 (m, 3 H, CH₂ IAA), 1.93-2.11 (m, 5 H, CH₂ IAA), 2.93 (dd, 1 H, J = 7.5, 17.1 Hz, PhCH₂), 3.14 (dd, 1 H, J = 6.6, 13.9 Hz, PhCH₂), 3.45 (m, 1 H, CH IAA-3), 3.55 (m, 1 H, CH IAA-6), 3.89 (m, 1 H, CH IAA-9), 4.32 (dd, 1 H, J = 9.8, 9.8 Hz, CH_α), 7.10-7.26 (m, 5 H, Ar), 8.55 (s, br, 1 H, OH); ¹³C NMR (CD₃OD) δ 27.3 (CH₂ IAA-C5), 27.7 (CH₂ IAA-C4), 28.1 (CH₂ IAA-C8), 33.4 (CH₂ IAA-C7), 41.2 (PhCH₂), 44.1 (CH_α), 51.1 (CH IAA-3), 58.9 (CH IAA-6), 60.6 (CH IAA-9), 126.9, 128.4, 129.4 (CH Ar), 137.5 (C_q Ar), 169.5, 173.0, 174.3 (CO); HRMS calcd for C₁₈H₂₃N₂O₄S (MH⁺) 363.1378.

7.9 Références.

- 1 (a) "Peptidomimetics for Receptor Ligands - Discovery, Development, and Medicinal Perspectives", Giannis, A.; Kolter, T. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 1244; (b) "Peptidomimetics - Tailored Enzyme Inhibitors", Gant, J. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 1699; (c) "Case Histories of Peptidomimetics: Progression from Peptides to Drugs", Adang, A. E. P.; Hermkens, P. H. H.; Linders, J. T. M.; Ottenheijm, H. C. J.; Van Staveren, C. J. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1994**, 113, 63; (d) "Constrained Peptides: Models of Bioactive Peptides and Protein Substructures", Rizo, J.; Gierasch, L. M. *Ann. Rev. Biochem.* **1992**, 61, 387.
- 2 Pour des exemples récents voir: (a) Hirschmann, R. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 1278; (b) Smith, III, A. B.; Koenan, T. P.; Hoicomb, R. C.; Sprengeler, P. A.; Guzman, M. C.; Wood, J. L.; Carroll, P. J.; Hirschmann, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 10672; (c) Chackalamannil, S.; Wang, Y.; Haslanger, M. F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, 2, 1003; (d) Deal, M. J.; Hagan, R. M.; Ireland, S. J.; Jordan, C. C.; McElroy, A. B.; Poner, B.; Ross, B. C.; Stephens-Smith, M.; Ward, P. *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 4195; (e) de Laszlo, S. E.; Bush, B. L.; Doyle, J. J.; Greenlee, W. J.; Hangauer, D. G.; Halgren, T. A.; Lynch, R. J.; Schorn, T. W.; Siegl, P. K. S. *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 883; (f) Williams, B. J.; Curtis, N. R.; McKnight, A. T.; Maguire, J. J.; Young, S. C.; Veber, D. F.; Baker, R. *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 2; (g) Sreenivasan, U.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L. *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 256; (h) Genin, M. J.; Ojala, W. H.; Gleason, W. B.; Johnson, R. L. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 2334.

- 3 "Effect of Bradykinin on Renal Finction", Barracough, M. A.; Mills, I. S. *Clin. Sci.* **1965**, *28*, 69.
- 4 "A Rapid and Potent Natriuretic Response to Intravenous Injection of Atrial Myo Cardial Extract in Rats", De Bold, A. J.; Borenstein, H. B.; Veress, A. J.; Stonneberg, H. *Life Sci.* **1981**, *28*, 89.
- 5 "Dual Inhibition of Angiotensin-Converting Enzyme and Neutral Endopeptidase: A New Research in the Field of Hypertension", Fournie-Zasluski, M. C. C. R. *Séances Soc. Biol. Ses Fil.* **1992**, *186*, 612.
- 6 "Biochemical and Biophysical Aspect of the Renin-Angiotensin System", Laragh, J. M. N. *Engl. J. Med.* **1985**, *313*, 1330.
- 7 "Existence of two Forms of Hypertensin", Skeggs, L. T.; Marsh, W. H.; Kahn, J. R.; Shumway, N. P. *J. Exp. Med.* **1954**, *99*, 275.
- 8 "The Hydrolysis of α -Human Atrial Natriuretic Peptide by Pig Kidney Microvillar Membranes is Initiated by Endopeptidase 24.11", Stephenson, S. L.; Kenny, A. J. *Biochem. J.* **1985**, *243*, 183.
- 9 (a) "Neutral Endopeptidase 24.11 (Enkephalinase) and Related Regulators of Peptide Hormones", Erdos, E. G.; Skidgel, R. A. *FASEB J.* **1989**, *3*, 145; (b) "A Dipeptidyl Carboxypeptidase that Converts Angiotensin I and Inactivates Bradykinin", Yang, Y. T.; Erdos, E. G.; Levin, Y. *Biochim. Biophys. Acta* **1970**, *214*, 374.
- 10 Inhibiteurs de l'ACE: captopril: (a) "Design of a Potent Competitive Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme. Carboxyalkanoyl and Mercaptalkanoyl Amino Acid", Cushman, D. W.; Cheung, H. S.; Sabo, E. F.; Ondetti, M. A. *Biochemistry* **1977**, *16*, 5484; (b) "Design of Specific Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme: New Class of Orally Active Antihypertensive Agents", Ondetti, M. A.; Rubin, B.; Cushman,

D. W. *Science* **1977**, 196, 441; (c) "Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors: Medicinal Chemistry and Biological Actions", Petrillo, E. W.; Ondetti, M. A. *Med. Res. Rev.* **1982**, 2, 1; énalaprilat: (d) "A New Class of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors", Patchett, A. A.; Harris, E.; Tristram, E. W.; Wyvratt, M. J.; Wu, H. T.; Taub, D.; Peterson, E. R.; Ikeler, T. J.; Ten Brocke, J.; Payne, L. G.; Ondeyka, D. L.; Thorsett, E. D.; Greenlee, W. J.; Lohr, N. S.; Hoffsommer, R. D.; Joshua, H.; Ruyle, W. V.; Rothrock, J. W.; Aster, S. D.; Maycock, A. L.; Robinson, F. M.; Hirschmann, R.; Sweet, C. S.; Ulm, E. H.; Gross, D. M.; Vassil, T. C.; Stones, A. A. *Nature (London)* **1980**, 288, 280; cilazapril: (e) "The Design and Synthesis of the Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Cilazapril and Related Bicyclic Compounds", Attwood, M. R.; Hassall, C. H.; Krohn, A.; Lawton, G.; Redshaw, S., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1986**, 1011; autres: (f) "Nuclear Magnetic Resonance Studies and Conformations of Bicyclic Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme. Part 1. Octahydropyridazo[1,2-*a*]-pyridizanediones as Models for Alanylproline and Captopril", Gilbert, P. J.; Thomas, W. A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II* **1985**, 1077; (g) "Nuclear Magnetic Resonance Studies and Conformational Analysis of a Bicyclic Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme. Part 2. The Octahydro-6H-pyridazo[1,2-*a*][1,2]diazepines", Thomas, W. A.; Whitcombe, I. W. A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II* **1986**, 747; (h) "Conformationally Restricted Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme: Synthesis and Computations", Thorsett, E. D.; Harris, E. E.; Aster, S. D.; Peterson, E. R.; Snyder, J. P.; Springer, J. P.; Hirshfield, J.; Tristram, E. W.; Patchett, A. A.; Ulm, E. H.; Vassil, T.C. *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 251.

- 11 Inhibiteurs de la NEP: Thiorphan: Margulies, K. B.; Cavero, P. G.; Seymour, A. A.; Delaney, N. G.; Burnett, Jr. J. C. *Kidney International* **1990**, *38*, 67.
- 12 (a) "Angiotensin Inhibition Potentiates the Renal Response to Neutral Endopeptidase Inhibition in Dogs with Congestive Heart Failure", Margulies, K. B.; Perrella, M. A.; McKinley, L. J.; Burnett, J. J. *Clin. Invest.* **1991**, *88*, 1636; (b) "Antihypertensive Activity during Inhibition of Neutral Endopeptidase and Angiotensin Converting Enzyme", Seymour, A. A.; Swerdel, J. N.; Abboa-Offei, B. J. *Cardiovasc. Pharm.* **1991**, *17*, 456; (c) "Systemic Hemodynamics, Renal Function and Hormonal Levels during Inhibition of Neutral Endopeptidase 3.4.24.11 and Angiotensin-Converting Enzyme in Conscious Dogs with Pacing-Induced Heart Failure", Seymour, A. A.; Asaad, M. M.; Lanoce V. M.; Langenbacher, K. M.; Fennell, S. A.; Rogers, W. L. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1993**, *266*, 872; (d) "Combined Inhibition of Neutral Endopeptidase and Angiotensin Converting Enzyme in Cardiomyopathic Hamsters with Compensated Heart Failure", Trippodo, N. C.; Fox, M.; Natarajan, V.; Panchal, B. C.; Dorso, C. R.; Asaad, M. M. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1993**, *267*, 108; (e) "Effects of Converting Enzyme Inhibitor and Neutral Endopeptidase Inhibitor in Experimental Hypertension", Pham, I.; Gonzales, W.; El Amrani, A. I. K.; Fournie-Zaluski, M. C.; Phillippe, M.; Laboulandine, I.; Roques, B. P.; Michel, J. B. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1993**, *265*, 1339; (f) "Effects of Fosinoprilat or an Angiotensin II (A II) Antagonist on a Neutral Endopeptidase (NEP) Inhibition in Conscious Renal Hypertensive Dogs", Seymour, A. A.; Asaad, M. M.; Smith, P. L.; Abboa-Offei, B. E.;

- Rogers, W. L.; Dorso, C. R. *FASEB J.* **1994**, *8*, A551; (g) "Repression of Angiotensin II and Potentiation of Bradykinin Contribute to the Synergistic Effects of Dual Metalloprotease Inhibition in Heart Failure", Trippodo N. C.; Panchal, B. C.; Fox, M. J. *Pharmacol. Exper. Ther.* **1995**, *272*, 1.
- 13 "Carboxypeptidase A", Christianson; D. W.; Lipscomb W. N., *Acc. Chem. Res.* **1989**, *22*, 62.
- 14 "Structural Basis of the Action of Thermolysin and Related Zincpeptidases", Matthews, B. W. *Acc. Chem. Res.* **1988**, *21*, 333.
- 15 (a) "Amino Acid Sequence of Rat Kidney Neutral Endopeptidase 24.11 (Enkephalinase) Deduced from a Complementary DNA", Devault, A.; Lazure, C.; Nault, C.; Le Moual, H.; Seidah, N. G.; Chretien, M.; Kahn, P.; Powell, J.; Mallet, J.; Beaumont, A.; Roques, B. P.; Crine, P.; Bodeau, G. *EMBO J.* **1977**, *6*, 1317; (b) "Molecular Cloning and Amino Acid Sequence of Human Enkephalinase (Neutral Endopeptidase)", Malfroy, B.; Kuang, W. J.; Seeburg, P. H.; Mason, A. J.; Schofield, P. R. *FEBS Letters* **1988**, *229*, 206; (c) "Molecular Cloning and Amino Acid Sequence of Rat Enkephalinase", Malfroy, B.; Schofield, P. R.; Kuang, W. J.; Seeburg, P. H.; Mason, A. J.; Henzel W. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**, *144*, 59.
- 16 "Two Putative Active Centers in Human Angiotensin I-Converting Enzyme Revealed by Molecular Cloning", Soubier, F.; Alhenc-Gelas, F.; Hubert, C.; Allegrini, J.; John, M.; Tregaer, G.; Corvol, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 9386.
- 17 (a) "Identification of the Active Site Arginine in Rat Neutral Endopeptidase 24.11 (Enkephalinase) as Arginine 102 and Analysis of a

- Glutamine 102 Mutant", Bateman, R. C.; Jackson, D.; Slaughter, C. A.; Unnithan, S.; Chai, Y. G.; Moomaw, C.; Hersh, L. B. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 6151; (b) "Evidence that Both Arginine 102 and Arginine 747 are Involved in Substrate Binding to Neutral Endopeptidase (EC 3.4.24.11)", Beaumont, A.; Le Moual, H.; Boileau, G.; Crine, P.; Roques B. P. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 214; (c) "Exploration of the Catalytic Site of Endopeptidase 24.11 by Site Directed Mutagenesis", Devault, A.; Sales, V.; Nault, C.; Beaumont, A.; Roques, B. P.; Crine, P.; Boileau G. *FEBS Letters* **1988**, *231*, 54; (d) "Identification of Glutamic Acid 646 as a Zinc Coordinating Residue in Endopeptidase 24.11", Le Moual, H.; Devault, A.; Roques, B. P.; Crine, P.; Boileau, G. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 15670.
- 18 "Binding of Peptide Substrates and Inhibitors of Angiotensin Converting Enzyme. Importance of the COOH-Terminal Dipeptide Sequence", Cheung, M. S.; Wang, F. L.; Ondetti, M. A.; Sabo, E. F.; Cushman, D. W. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 401.
- 19 "Synthesis and Biological Properties of Highly Potent Enkephalinase Inhibitors", Fournié-Zaluski, M. C.; Llorens, C.; Gacel, G.; Malfroy, B.; Swerys, J. P.; Lecomte, J. M.; Schwartz, J. C.; Roques B. P. in *Peptides 1980* K. Brunfeldt ed., Scriptor, Copenhagen, p. 476.
- 20 "Inhibitors of Enkephalinase: The Next Generation of analgesics", Chipkin, R. E. *Drugs of the Future* **1986**, *11*, 593.
- 21 "Mercaptoacyl Dipeptides as Dual Inhibitors of Angiotensin Converting Enzyme and Neutral Endopeptidase. Preliminary Structure-Activity Studies", Delaney, N. G.; Barrish, J. C.; Neubeek, R.; Natarajan, S.; Cohen, M.; Rovnyak, G. C.; Huber, G.; Murugesan, N.; Girotra, R.; Sieber-McMaster, E.; Robl J. A.; Asaad M. M.; Cheung H. S.;

- Bird, J. E.; Waldron, T.; Petrillo, E. W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 1783.
- 22 (a) "Dual Metalloprotease Inhibitors I. Constrained Peptidomimetics of Mercaptoacyl Dipeptides", Robl, J. A.; Simpkins, L. M.; Stevenson, J.; Kelly, Y. F.; Sun, C. Q.; Murugesan, N.; Barrish, J. C.; Asaad, M. M.; Bird, J. E.; Schaeffer, T. R.; Trippodo, N. C.; Petrillo, E. W.; Karanewsky, D. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 1789; (b) "Dual Metalloprotease Inhibitors. II. Effect of Substitution and Stereochemistry Benzazepinone Based Mercaptoacetyls", Robl, J. A.; Simpkins, L. M.; Sulsky, R.; Sieber-McMaster, E.; Stevensont J.; Kelly, Y. F.; Sun C. Q.; Misra, R. N.; Ryono, D. E.; Asaad, M. M.; Bird, J. E.; Trippodo, N. C.; Karanewsky, D. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4* 1795; (c) "Dual Metalloprotease Inhibitors. III. Utilization of Bicyclic and Monocyclic Diazepinone Based Mercaptoacetyls", Robl, J. A.; Sun, C. Q.; Simpkins, L. M.; Ryono, D. E.; Barrish, J. C.; Karanewski, D. S.; Asaad, M. M.; Schaeffer, T. R.; Trippodo, N. C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 2055; (d) "Dual Metalloprotease Inhibitors. IV. Utilization of Thiazepines and Thiazines as Constrained Peptidomimetic Surrogates in Mercaptoacyl Dipeptides", Das, J.; Robl, J. A.; Reid, J. A.; Sun, C. Q.; Misra, R. N.; Brown, B. R.; Ryono, D. E.; Asaad, M. M.; Bird, J. E.; Trippodo, N. C.; Pritrillo, E. W.; Karanewsky, D. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 2193; (e) "Dual Metalloprotease Inhibitors. V. Utilization of Bicyclic Azepinonethiazolidines and Azepinonetetrahydrothiazines in Constrained Peptidomimetics of Mercaptoacyl Dipeptides", Slusarchyk, W. A.; Robl, J. A.; Taunk, P. C.; Asaad, M. M.; Bird, J. E.; DiMarco, J.; Pan, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 753; (f) "Dual

- Metalloprotease Inhibitors. VI. Incorporation of Bicyclic and Substituted Monocyclic Azepinones as Dipeptide Surrogates in Angiotensin-Converting Enzyme Neutral Endopeptidase Inhibitors", Robl, J. A.; Cimarusti, M. P.; Simpkins, L. M.; Brown, B.; Ryono, D. E.; Bird, J. E.; Asaad, M. M.; Schaeffer, T. R.; Trippodo N. C. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 494; (g) "Dual ACE/NEP Inhibitors: Synthesis and Activity of Mercaptoacyl Dipeptides Containing Conformationally Restricted Dipeptide Surrogates", Simpkins, L. M.; Robl, J. A.; Cimarusti, M. P.; Ryono, D. E.; Stevenson, J.; Sun C. Q.; Petrillo, E. W.; Karanewsky, D. S.; Asaad, M. M.; Bird, J. E.; Schaeffer, T. R.; Trippodo, N. C. Abstracts of Papers 210th, Am. Chem. Soc. Meeting, Chicago, IL., MEDI 064 (1995).
- 23 "Optimal Recognition of Neutral Endopeptidase and Angiotensin-Converting Enzyme Active Sites by Mercaptoacyldipeptides as a Means to Design Potent Dual Inhibitors", Coric, P.; Turcaud, S.; Meudal, H.; Roques, B. P.; Fournié-Zaluski, M. C. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 1210.
- 24 "Design of Orally Active Dual Inhibitors of Neutral Endopeptidase and Angiotensin-Converting Enzyme with Long Duration of Action", Fournie-Zaluski, M. C.; Coric, P.; They, V.; Gonzalez, W.; Meudal, H.; Turcaud, S.; Michel, J.-B.; Roques, B. P. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 2594.
- 25 " α -Mercaptoacyl Dipeptides that Inhibit Angiotensin Converting Enzyme and Neutral Endopeptidase 24.11", Bhagwat, S. S.; Fink, C. A.; Gude, C.; Chan, K.; Qiao, Y.; Sakane, Y.; Berry, C.; Ghai, R. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, 5, 735.
- 26 Pour d'autres exemples, voir: (a) références 21, 22a-d, 23, 24, 25; (b) "4-Substituted Proline Derivatives that Inhibit Angiotensin Converting Enzyme and Neutral Endopeptidase 24.11", Bhagwat, S. S.; Fink, C. A.;

- Gude, C.; Chan, K.; Qiao, Y.; Sakane Y.; Berry, C.; Ghai, R. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 2673; (c) "Mercaptoacyl Dipetides as Orally Active Dual Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme and Neutral Endopeptidase", Fink, C. A.; Carlson, J. E.; McTaggart, P. A.; Qiao, Y.; Webb, R.; Chatelain, R.; Jeng, A. Y.; Trapani, A. J. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3158.
- 27 "Recent Developments in the Design of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors", Wyvratt, M. J.; Patchett, A. A. *Med. Res. Rev.* **1985**, *5*, 483.
- 28 "Conformationally Restricted Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme", Thorsett, E.D. *Actual. Chim. Ther.* **1986**, *13*, 257.
- 29 Pour d'autres exemples, voir: (a) "Mixed Inhibitors of Angiotensin Converting Enzyme (EC 3.4.15.1) and Enkephalinase (EC 3.4.24.11): Rational Design, Properties and Potential Cardiovascular Applications of Glycopril and Alatriopril", Gros, C.; Noel, N.; Souque, A.; Schwartz, J. C.; Danvy, D.; Plaquevent, J. C.; Duhamel, L.; Duhamel, P.; Lecomte, J. M.; Bralet, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, *88*, 4210; (b) "Zinc Metalloproteases: Active Site Structure and Design of Selective and Mixed Inhibitors: New Approaches in the Search for Analgesics and Anti-hypertensives", Roques, B. P. *Biochem. Soc. Trans.* **1993**, *21*, 678; (c) "Heterocyclic Lactam Derivatives as Dual Angiotensin Converting Enzyme and Neutral Endopeptidase 24.11 Inhibitors", Stanton, J. L.; Sperbeek, D. M.; Trapani, A. J.; Cote, D.; Sakane, Y.; Berry, C. J.; Ghai, R. D. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3829.
- 30 (a) "Application of a Conformationally Restricted Phe-Leu Dipeptide Mimetic to the Design of a Combined Inhibitor of Angiotensin I-

- Converting Enzyme and Neutral Endopeptidase 24.11", Flynn, G. A.; Beight, D. W.; Mehdi, S.; Koehl J. R.; Giroux, E. L.; French, J. F.; Hake, P. W.; Dage R. C. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2420; (b) "An Acyl-Iminium Ion Cyclization Route to a Novel Conformationally Restricted Dipeptide Mimic: Applications to Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition", Flynn, G. A.; Giroux, E. L.; Dage, R. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 7914; (c) "Acid-Catalyzed O-Allylation of β -hydroxy- α -amino Acids: An Entry into Conformationally Constrained Dipeptide Surrogates", Burkholder, T. P.; Le, T.-B.; Giroux, E. L.; Flynn, G. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 579; (d) "Bicyclic Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme", Wyvratt, M. J.; Tischler, M. H.; Ikeler, T. J.; Springer, J. P.; Tristram, E. W.; Patchett, A. A. *Peptide, Structure and Function, Proceedings of the 8th Am. Peptide. Symp.*, Hruby, V. J. and Rich, D. H. Eds., 1983, Pierce Chem. Company, Rockford, Il. p. 551.
- 31 "The Synthesis of Aminobenzazepinones as *anti*-Phenylalanine Dipeptide Mimics and their Use in NEP Inhibitions", Warshawsky, A. M.; Flynn, G. A.; Koehl, J. R.; Mehdi, S.; Vaz, R. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 957.
- 32 (a) "Practical Syntheses of a Novel Tricyclic Dipeptide Mimetic Based on a [6H]-Azepino Indoline Nucleus: Application to Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition", De Lombaert, S.; Blanchard, L.; Stamford, L. B.; Sperbeck, D. M.; Grim, M. D.; Jenson, T. M.; Rodriguez, H. R. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 7513; (b) "Dual Inhibition of Angiotensin-Converting Enzyme and Neutral Endopeptidase by Tricyclic Benzazepinone Thiols", De Lombaert S.; Blanchard, L.; Stamford, L. B.; Sakane, Y.; Berry, C.; Ghai, R. D.; Trapani, A. J. *Bioorg.*

- Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 2875; (c) "Three-Dimensional Model of ACE and NEP Inhibitors and Their Use of Potent Dual ACE/NEP Inhibitors", Bohacek, R.; De Lombaert, S.; McMartin, C.; Priestle, J.; Grütter, M. J. *Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8231.
- 33 "Synthesis of Benzo-Fused, 7,5- and 7,6-Fused Azepinones as Conformationally Restricted Dipeptide Mimetics", Robl, J. A.; Karanewsky, D. S.; Asaad, M. M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1593.
- 34 "Dual Metalloprotease Inhibitors: Mercaptoacetyl-Based Fused Heterocyclic Dipeptide Mimetics as Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme and Neutral Endopeptidase", Robl, J. A.; Sun, C. Q.; Stevenson, J.; Ryono, D. E.; Simpkins, L. M.; Cimarusti, M. P.; Dejneka, T.; Slusarchyk, W. A.; Chao, S.; Stratton, L.; Misra, R. N.; Bednarz, M. S.; Asaad, M. M.; Cheung, H. S.; Abboa-Offei, B. E.; Smith, P. L.; Mathers, P. D.; Fox, M.; Schaeffer, T. R.; Seymour, A. S.; Trippodo, N. C. J. *Med. Chem.* **1997**, *40*, 1570.
- 35 (a) "Synthesis of Pseudopeptides", Acton, N.; Komoriya, A. *Organic Preparations and Procedures Int.* **1982**, *14*, 381; (b) "Die Konfiguration der α -Brom-propionsäure (8. Mitteilung über Sterische Reihen)", Freudenberg, K.; Market, L. *Chem. Ber.* **1927**, *60*, 2447.
- 36 L'acide carboxylique α -mercaptoacyle a été préparé suivant: "Synthesis of Racemization Prone Optically Active Thiols by S_N2 Substitution Using Cesium Thiocarboxylates", Strijtveen, B.; Kellog, R. M. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3664.
- 37 "O-Benzotriazolyl-N-N-N'-N'-tetramethyluronium Hexafluorophosphate as Coupling Reagent for the Synthesis of Peptides of Biological Interest", Dourtoglou, V.; Gross, B. *Synthesis*, **1994**, 572.

³⁸ HGL remercie Bioméga-Boehringer Ingelheim Inc., le Dr Marc-André Poupart et M. Gulian Fazal pour l'utilisation d'une HPLC préparative pour la purification de **(2R', 3S, 6S, 9S)-30** et de **(2R', 3S, 6R, 9S)-30**.

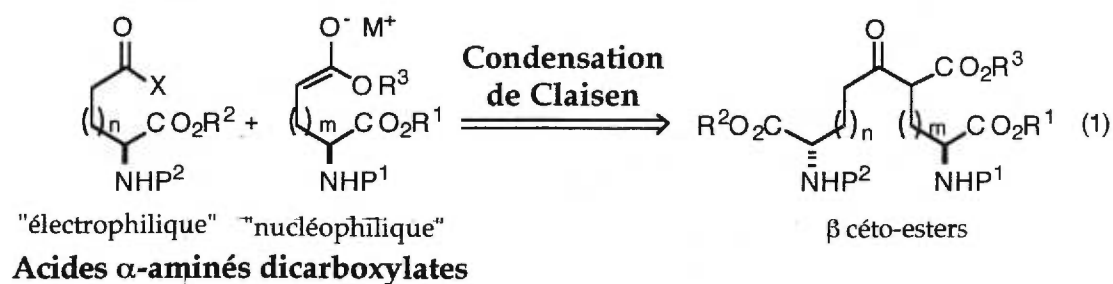
CHAPITRE 8

Travaux futurs.

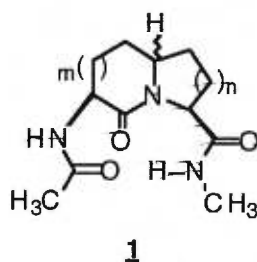
Les travaux futurs pourraient s'orienter dans trois directions qui sont la synthèse, les analyses conformationnelles et les applications de l'acide aminé indolizidinone.

8.1 Stratégie et synthèse.

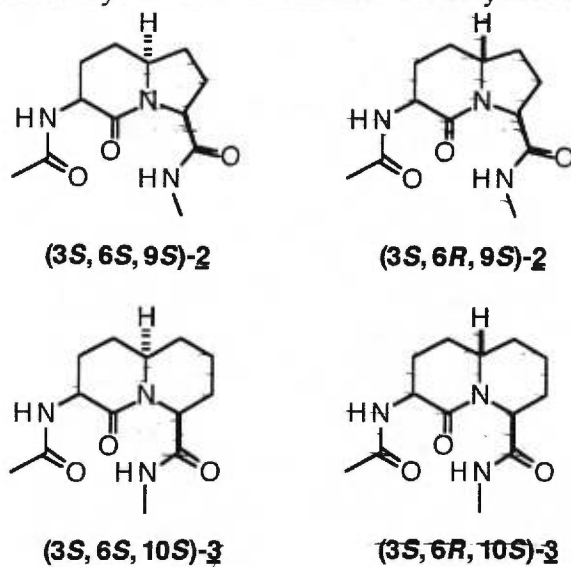
La stratégie développée est d'une grande richesse, car elle permet d'avoir accès à une multitude de dérivés. Dans un premier temps, des investigations pourraient être menées en synthétisant des dérivés de l'acide aminé indolizidinone, avec l'incorporation de substituants ou l'obtention d'une gamme variée d'azabicycles. Ces acides aminés azabicycliques devront être obtenus par couplages sélectifs d'acides aminés. En conséquence, la méthodologie devrait être développée pour réussir le couplage entre des acides aminés dicarboxyliques nucléophiles et électrophiles (équation 1). Une investigation sur les combinaisons possibles de couplage devrait conduire au succès de cette réaction.



La modélisation moléculaire des composés azabicyclo[X.Y.0]alcanes de type amide *N*-acétyl *N*-méthyle (1), *n* variant de 1 à 2, *m* variant de 0 à 3 et de configuration *S* ou *R*, a permis de prédire un profil du composé idéal pouvant agir dans un peptide comme un mimétique de repliement β de type II'.



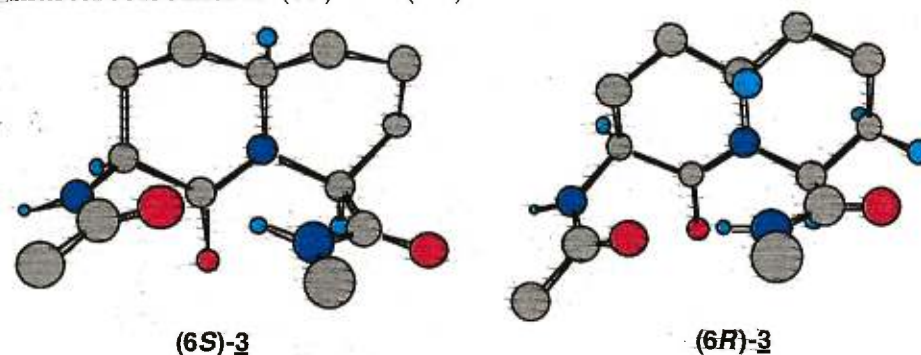
Ces résultats ont permis de montrer que le bicyclic du type [4.4.0] présente des valeurs des angles de torsion des résidus deux et trois (ψ_2 et ϕ_3) similaires à celles idéales d'un repliement β de type II' (figure 1 et 2, tableau 1).

Figure 1. Dérivés azabicycloalcanes amides *N*-acétyl *N*-méthyle.**Tableau 1.** Comparaison des valeurs des angles de torsion (deg.) des systèmes azabicyclo[4.4.0]décanes avec le repliement β de type II' et avec les AAI.

	ψ_2	ϕ_3
Type II' idéal	-120°	-80°
Conformère représentant un repliement de type γ (6S)-2	-168°	-74°
Conformère représentant un repliement de type γ (6R)-2	-137°	-76°
Conformère représentant un repliement de type γ (6S)-3	-115°	-80°
Conformère représentant un repliement de type γ (6R)-3	-153°	-86°
Conformère représentant un repliement de type β (6S)-2	-127°	-67°
Conformère représentant un repliement de type β (6R)-2	-125°	-72°
Conformère représentant un repliement de type β (6S)-3	-121°	-85°
Conformère représentant un repliement de type β (6R)-3	-137°	-100°

(La modélisation moléculaire a été effectuée avec le programme Macromodel, en utilisant le champs de force Amber dans le chloroforme. Les conformères représentant les repliements de type γ correspondent aux minima observés en modélisation moléculaire. Les conformères représentant les repliements de type β correspondent au 5^{ème} conformère pour **(6S)-2**, au 2^{ème} conformère pour **(6R)-2**, au 8^{ème} conformère pour **(6S)-3**, au 4^{ème} conformère pour **(6R)-3**.)

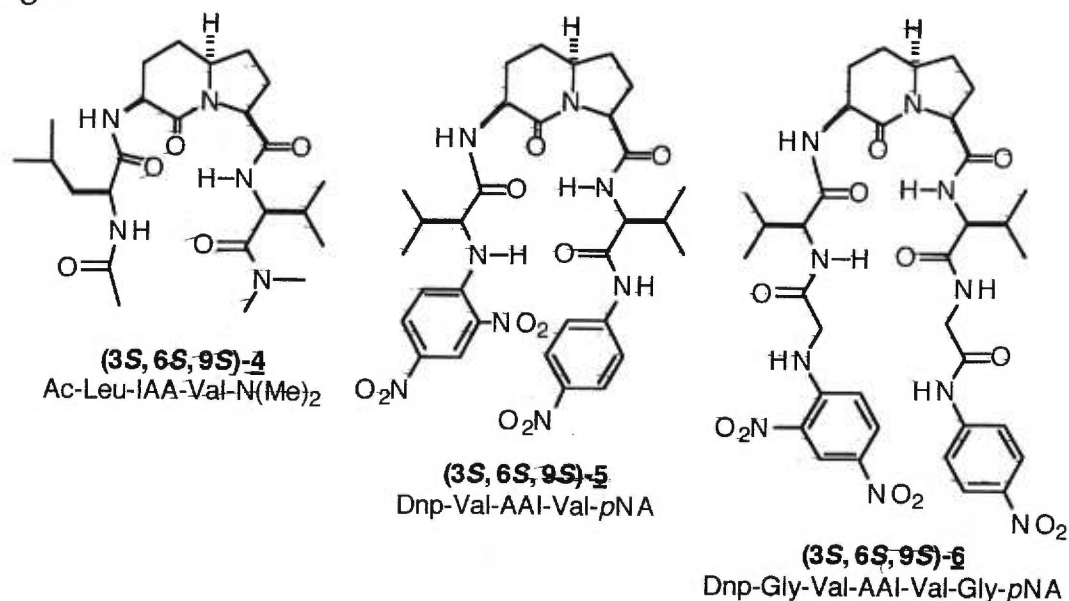
Figure 2. Représentation des conformations de repliement β pour les deux diastéréoisomères (6*S*)-3 et (6*R*)-3.



8.2 Analyse conformationnelle.

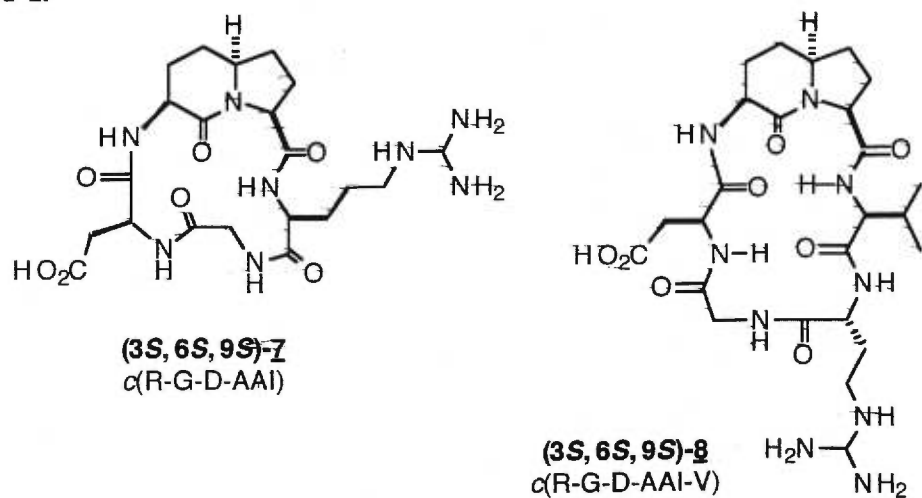
Dans le domaine de l'analyse conformationnelle des amides modèles, les recherches effectuées pourraient être complétées par des études de spectroscopie RMN 2D avec le (3*S*, 6*S*, 9*S*)-Ac-AAI-NHMe afin de déterminer la conformation en solution. Dans le cas du tripeptide modèle (3*S*, 6*S*, 9*S*)-Ac-Val-AAI-Val-NMe₂, deux voies peuvent être explorées avec d'une part la modification de la structure peptidique en introduisant un acide aminé leucine à la place d'un acide aminé valine et la synthèse du peptide modèle (3*S*, 6*S*, 9*S*)-Ac-Leu-AAI-Val-NMe₂ (**4**, figure 3). D'autre part, la voie des dérivés nitrophényles, avec les synthèses des deux dérivés (3*S*, 6*S*, 9*S*)-Dnp-Val-AAI-Val-*p*NA (**5**, figure 3) et (3*S*, 6*S*, 9*S*)-Dnp-Gly-Val-AAI-Val-Gly-*p*NA (**6**, figure 3), peut être étudiée.

Figure 3.



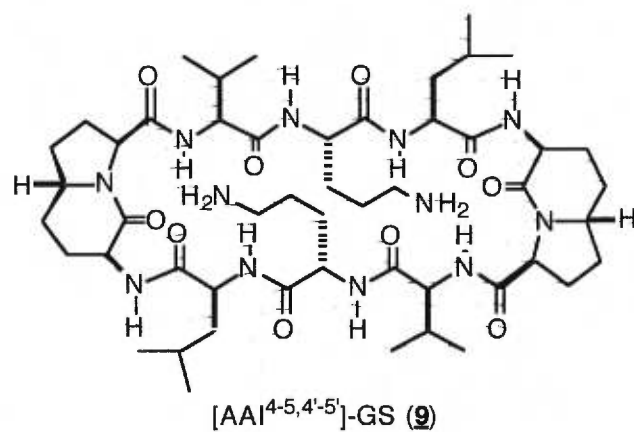
Une autre possibilité consisterait à étudier des peptides cycliques tels que les dérivés *c*(R-G-D-AAI) (7, figure 4) et *c*(R-G-D-AAI-V) (8, figure 4). Par comparaison avec les études effectuées par Kessler sur ces peptides cycliques incorporant le BTB (voir annexe 1), des études de spectroscopie RMN (coefficients de température et 2D) permettront de déterminer les profils des conformations induites par l'AAI dans ces deux peptides cycliques en solution. Ces données devraient aider à connaître la capacité de l'AAI à stabiliser un repliement β de type II'.

Figure 4.

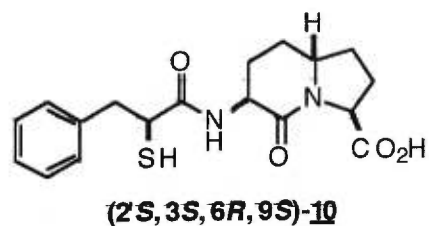
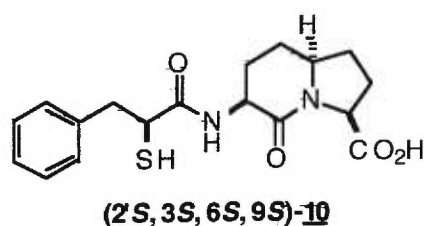


8.3 Applications.

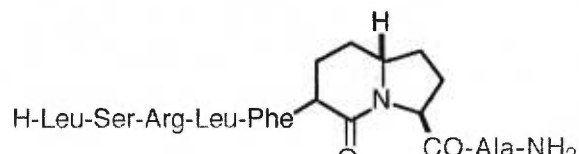
Dans le domaine de l'analogue de la gramicidine S, les recherches effectuées pourraient être complétées par des études de spectroscopie RMN 2D pour déterminer la conformation en solution. La synthèse du diastéréoisomère [AAI^{4-5,4'-5'}]-GS (9) permettrait des comparaisons entre les deux diastéréoisomères 6S et 6R de l'acide aminé indolizidinone afin d'évaluer un profil d'activité.



Dans le domaine de l'inhibition double de métalloprotéases ACE et NEP, les recherches effectuées devront être complétées par les synthèses des diastéréoisomères (2'S, 3S, 6S, 9S)-10 et (2'S, 3S, 6R, 9S)-10 afin de permettre les comparaisons avec les meilleurs inhibiteurs.



Enfin, un nouveau domaine peut être exploré. La séquence octapeptidique de l'hormone de croissance humaine (hGH[6-13]: Leu-Ser-Arg-Leu-Phe-Asp-Asn-Ala) a été rapportée comme ayant des propriétés de régulation de l'insuline. Des études RMN ont indiqué qu'un repliement β de type II' centré sur les résidus 11 et 12 est important pour l'activité observée ("Hypoglycaemic Activity of an Analogue of Human Growth Hormone [6-13] Incorporating a D-Ala-Pro Dipeptide Unit", Thompson, P. E.; Lim, N.; Wijaya, E.; Ng, F. M.; Hearn, M. T. W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, 3, 1625). Ainsi, la synthèse des analogues incorporant les AAI (11a et 11b) pourrait fournir des informations précieuses sur la relation conformation-activité dans un sujet aussi sensible.



CHAPITRE 9

Conclusion.

Depuis la synthèse par Nagai et Sato du composé thiaindolizidinone BTB, les peptidomimétiques de type azabicycliques ont fait l'objet de beaucoup d'attention. Ma recherche est concentrée à la fois sur la synthèse et sur l'utilisation d'un nouveau type de peptidomimétique, l'acide aminé indolizidinone. Cette recherche introduit les éléments d'utilisation future de ce genre d'outil pour le contrôle du repliement peptidique et les études des relations conformation-activité de peptides ayant des intérêts en chimie médicinale. En 10 étapes et avec un rendement global de 10% à partir de l'acide glutamique, la première synthèse énantiosélective de l'acide (3*S*, 6*S*, 9*S*)-2-oxo-3-*N*-(Boc)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylique a été effectuée. Une nouvelle méthodologie, basée sur une condensation de Claisen, une amination réductrice et une cyclisation au lactame, a donc été mise au point avec succès. L'optimisation de chacune des étapes a permis l'amélioration de la synthèse et l'AAI a été obtenu avec un rendement global de 27%. L'utilisation d'un ester méthylique comme groupe protecteur de l'acide α a permis une synthèse plus efficace et plus rapide. L'AAI a été obtenu en 8 étapes avec un rendement global de 39% à partir

de l'acide glutamique. Cette stratégie a permis d'obtenir une variété d'acides aminés indolizidinones de configurations diverses.

L'acide aminé indolizidinone a été facilement incorporé dans différents peptides. Dans un premier temps, les choix se sont portés sur des études conformationnelles afin de déterminer la ou les conformations induites par l'AAI avec les synthèses de peptides modèles, des amides *N*-acétyl *N'*-méthyl, un peptide possédant des chromophores nitrophényles et un tripeptide possédant deux acides aminés valine. Les analyses conformationnelles par modélisation moléculaire ont prédit que chacun des deux isomères de l'AAI pouvaient fonctionner comme des substitués peptidomimétiques des résidus $i+1$ et $i+2$ dans une conformation de repliement β de type II', car les angles de torsions ϕ et ψ sont similaires à ceux du type II' idéal. Les études sur l'amide modèle (3*S*, 6*S*, 9*S*)-Ac-AAI-NHMe ont montré que ce peptide induisait bien une conformation présentant une liaison hydrogène dans un solvant non polaire et cette conformation était désorganisée sous l'effet d'un solvant polaire. Au regard des différents résultats, cette conformation générée ne peut être de type β , mais serait plutôt du type γ . Cependant, avec l'introduction de chromophores spécifiques dans le peptide modèle (3*S*, 6*S*, 9*S*)-DNP-Gly-AAI-Gly-*p*NA, les études de dichroïsme circulaire ont démontré que ce peptide présentait une conformation de repliement β bien définie.

Ensuite, la synthèse d'un analogue d'un peptide biologiquement actif, la gramicidine S, incorporant deux acides aminés indolizidinones a été effectuée afin d'étudier l'efficacité de l'AAI dans un mimétique de repliement β de type II'. Les similarités des spectres de dichroïsme

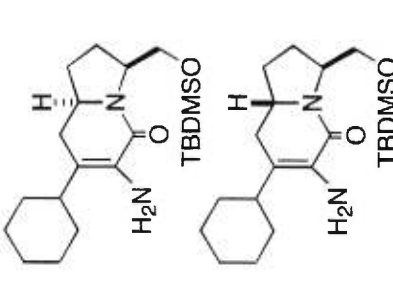
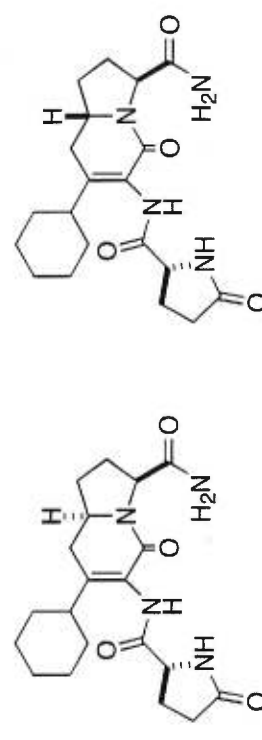
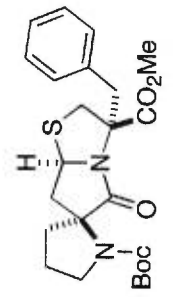
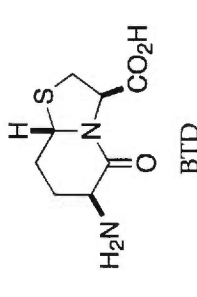
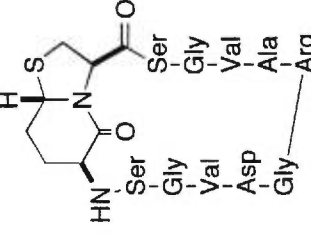
circulaire entre l'analogue [AAI^{4-5,4'-5'}]-GS et la gramicidine S suggèrent une conformation similaire. Les analyses biologiques ont montré que l'analogue [AAI^{4-5,4'-5'}]-GS présentait un profil antibactérien similaire à la gramicidine S, avec cependant un pouvoir hémolytique inférieur. Les résultats obtenus suggèrent que l'acide aminé indolizidinone pourrait se substituer à un dipeptide et servir comme un analogue conformationnellement rigide d'un repliement β de type II', qui assiste le plissement peptidique en stabilisant les liaisons hydrogènes dans les structures secondaires. L'ensemble de ces résultats montre que l'AAI, sous l'action d'une contrainte externe telle que la basse température, l'induction de chromophores spécifiques ou la formation d'un cycle, est capable de stabiliser une conformation définie qui peut être une conformation de repliement β .

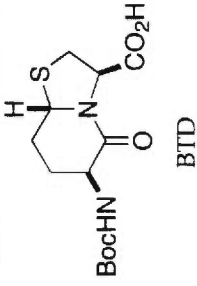
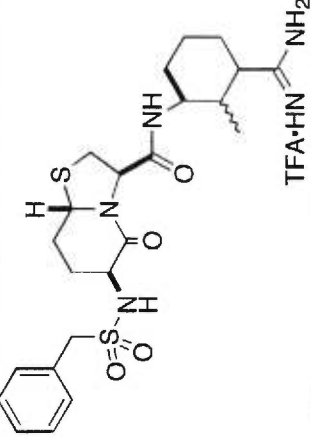
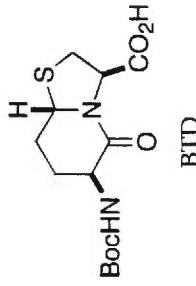
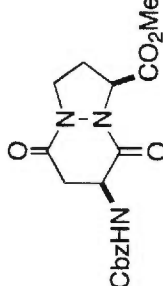
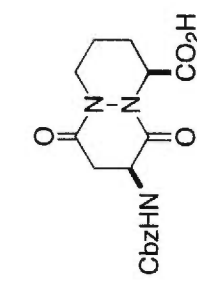
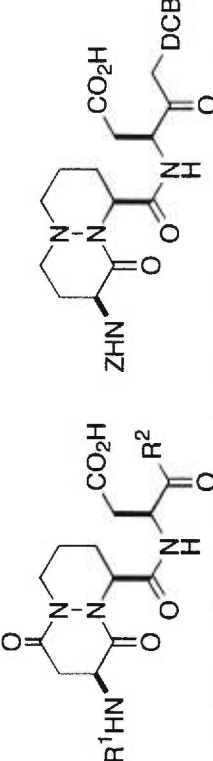
Enfin, pour étudier la capacité de l'AAI à fonctionner comme un substitut conformationnellement restreint du dipeptide Ala-Pro lors de l'inhibition de métalloprotéases, l'ACE et la NEP, les synthèses d'analogues incorporant un chromophore mercapto-acétyle ont été effectuées. Ces analogues ont présenté de prometteuses valeurs d'inhibition de l'ACE. Avec les informations obtenues avec ces trois applications, la détermination des caractéristiques structurales induites par l'AAI devrait permettre la conception plus rationnelle de nouveaux analogues biologiquement actifs dans d'autres domaines.

Une synthèse efficace a donc été développée pour l'obtention d'un nouveau peptidomimétique, l'acide aminé indolizidinone, qui donne accès à un composé ayant de multiples domaines de recherches et d'avenir. Ces systèmes indolizidinones font partie d'une famille importante d'analogues dipeptidiques et ce peptidomimétique pourrait devenir un standard aussi utilisé que le BTB pour la conception des nouveaux analogues bio-actifs.

ANNEXE 1

Compléments au chapitre 2.

Entrée	Type	Peptidomimétiques	Applications / analogues	Références
1	5-6 liés		 <p data-bbox="617 409 714 1207">Synthèse des peptidomimétiques (caractérisation par RMN 2D nOe) et incorporation dans des analogues conformationnellement restreints du peptide hypotalamique TRH.</p>	1
2	5-5 liés		<p data-bbox="779 409 860 1207">Synthèse d'un lactame thiazolidine spiro bicyclique substitué à la position 2 (caractérisation par rayons X), mimétique d'un repliement β de type II.</p>	2
3	5-6 liés	 <p data-bbox="1169 1365 1201 1428">BTD</p>	 <p data-bbox="1282 430 1404 1207">Synthèse et analyses conformationnelles (^1H RMN et modélisation moléculaire) d'un nouvel analogue RGD qui présente un potentiel de liaison au récepteur intégrin $\alpha_v\beta_3$.</p>	3

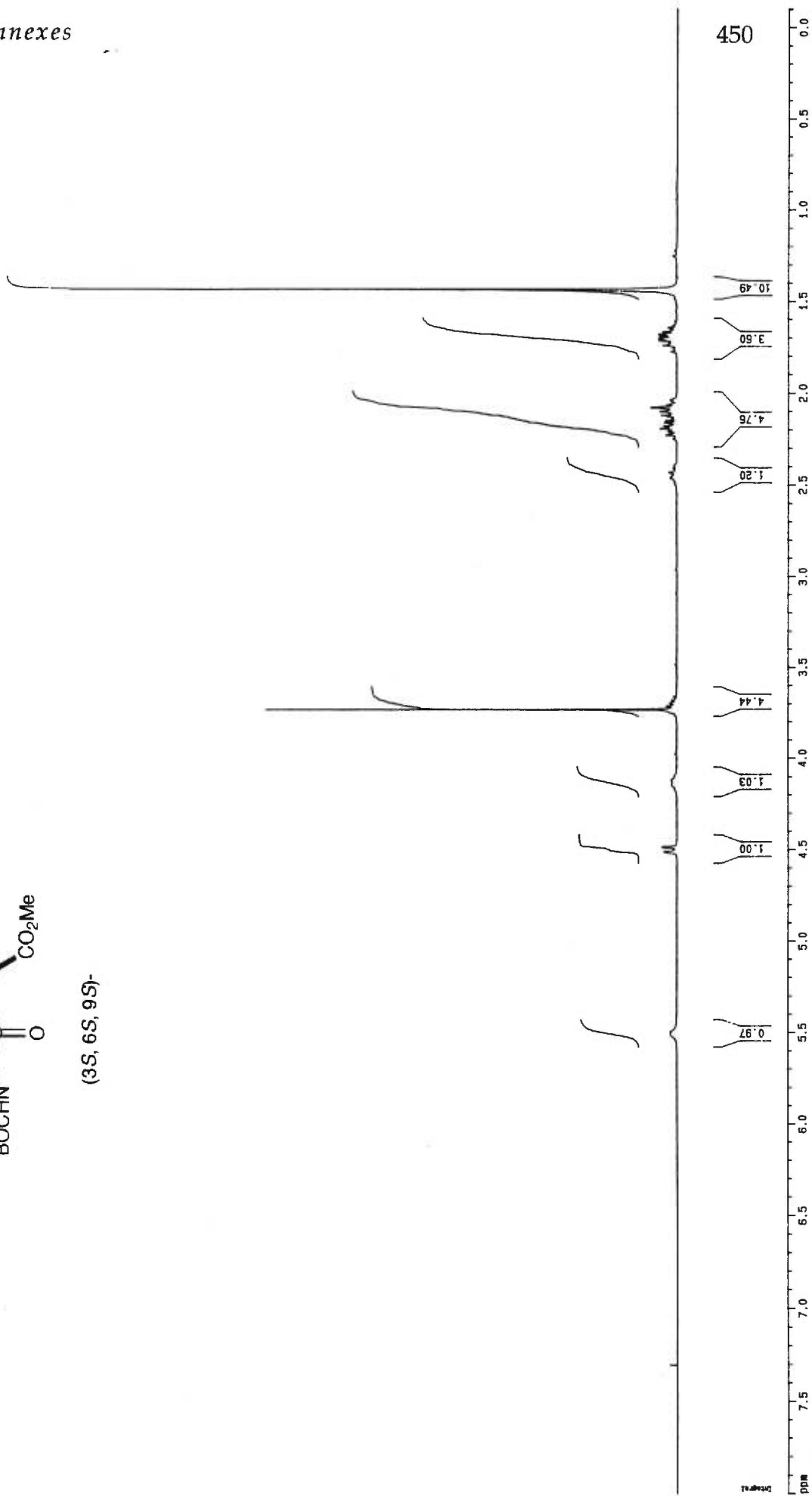
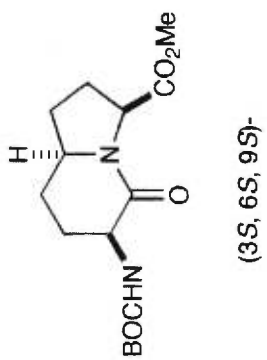
Entrée	Type	Peptidomimétiques	Applications / analogues	Références
4	5-6 liés	 <p>BTD</p>	 <p>TFA·HN</p> <p>Synthèse du BTD par une nouvelle méthode et incorporation dans un analogue présentant un potentiel d'inhibition contre la protéase sérine.</p>	4
5	5-6 liés	 <p>BTD</p>	<p><i>c</i>(Arg-Gly-Asp-BTD) <i>c</i>(Arg-Gly-Asp-BTD-Val)</p> <p>Synthèse et analyses conformationnelles (RMN 2D et modélisation moléculaire) de nouveaux analogues RGD qui présentent des activités biologiques sans sélectivité.</p>	5
6	5-6 liés	 <p>CO₂Me</p>	<p>Synthèse d'un dérivé aza-proline.</p>	6
7	6-6 liés	 <p>CO₂H</p>	 <p>ZHN</p> <p>DCB</p> <p>Synthèse d'une pyridazinodiazépine et incorporation dans des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'interleukin-1β (ICE).</p>	7

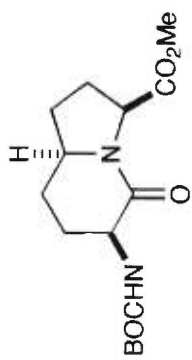
Références.

- 1 "Conformationally Restricted TRH Analogs: The Compatibility of a 6.5-Bicyclic Lactam-Based Mimetic with Binding to TRH-R", Li, W.; Moeller, K. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10106.
- 2 "Stereospecific Synthesis of 2-Substituted Bicyclic Thiazolidine Lactams", Subasinghe, N. L.; Khalil, E. M.; Johnson, R. L. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1317.
- 3 "A Novel RGD Containing Dodecapeptidomimetic which Exhibits Selective Binding to the $\alpha_V\beta_3$ Receptor", Tran, T.-A.; Mattern, R.-H.; Zhu, Q.; Goodman, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 997.
- 4 "Rational Design, Synthesis, and Serine Protease Inhibitory Activity of a Novel P₁-Arginal Derivative Featuring a Conformationally Constrained P₂-P₃ Bicyclic Lactam Moiety", Tamura, S. Y.; Goldman, E. A.; Brunck, T. K.; Ripka, W. C.; Semple, J. E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 331.
- 5 "Cyclic RGD Containing β -Turn Mimetics", Haubner, R.; Schmitt, W.; Hölzemann, G.; Goodman, S. L.; Jonczyk, A.; Kessler, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7881.
- 6 "Malic Acid: A Convenient Precursor for the Synthesis of Peptide Secondary Structure Mimetics", Kim, H.-O.; Lum, C.; Lee, M. S. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4935.
- 7 "Pyridazinodiazepines as High-Affinity, P₂-P₃ Peptidomimetic Class of Interleukin-1 β -Converting Enzyme Inhibitor", Dolle, R.E.; Prasad, C. V. C.; Prouty, C. P.; Salvino, J. M.; Awad, M. M. A.; Schmidt, S. J.; Hoyer, D.; Ross, T. M.; Graybill, T. L.; Speier, G. J.; Uhl, J.; Miller, B. E.; Helaszek, C. T.; Ator, M. A. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 1941.

ANNEXE 2

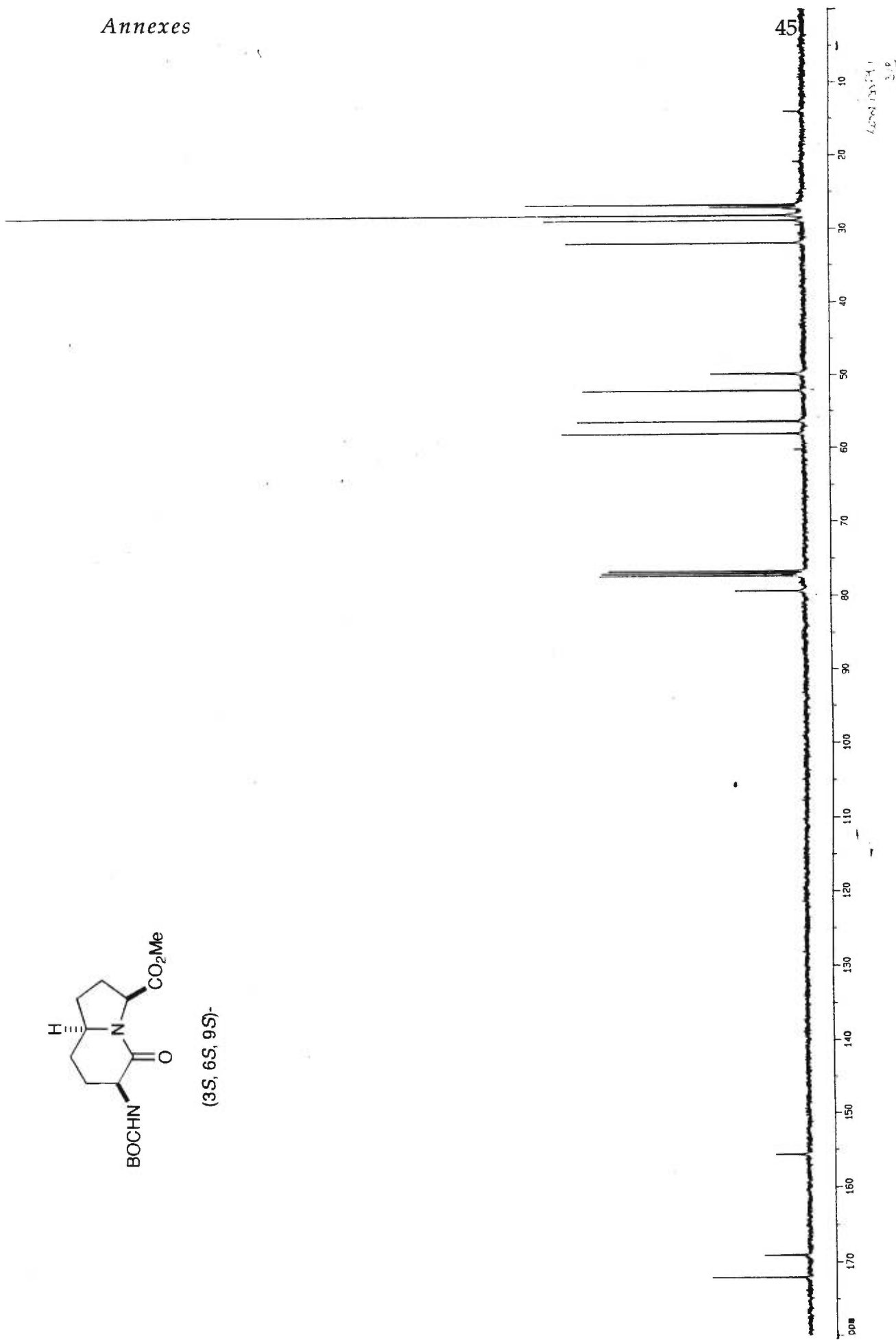
Spectres RMN choisis.

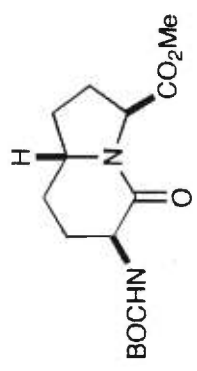




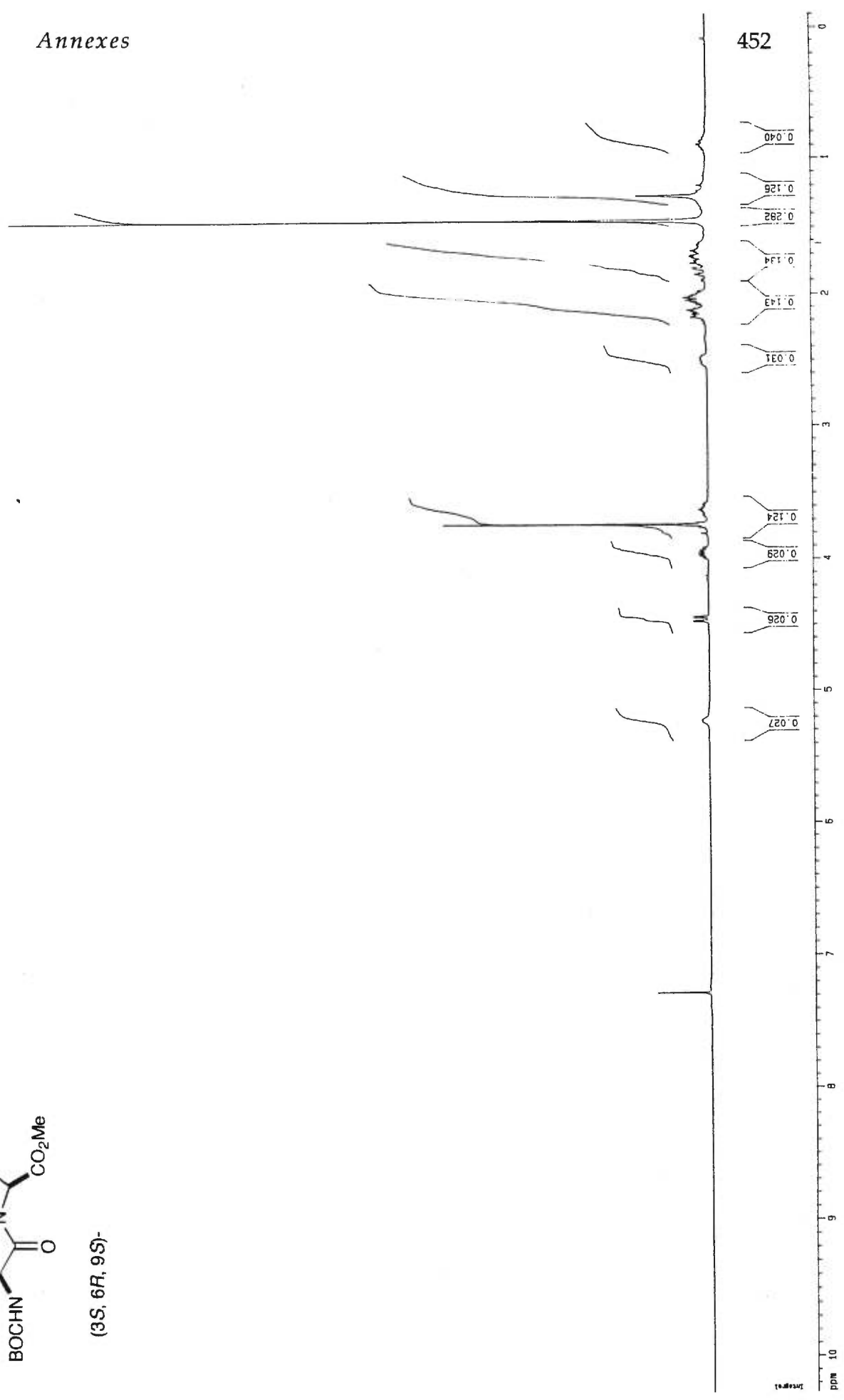
(3S, 6S, 9S)-

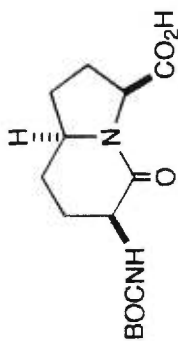
45



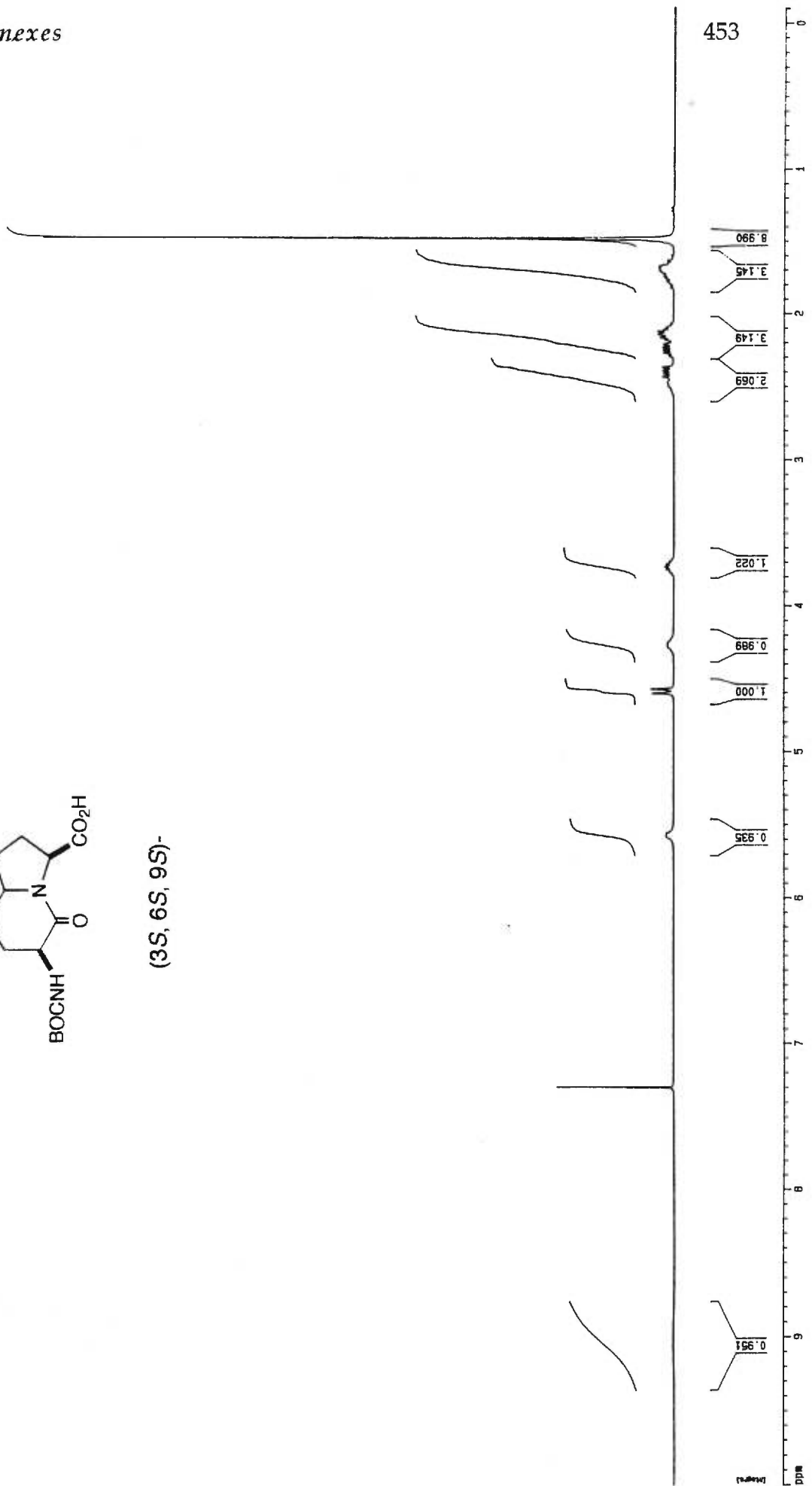


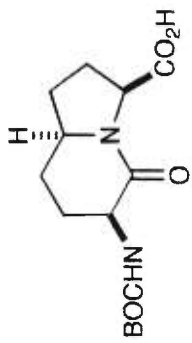
(3S, 6R, 9S)-



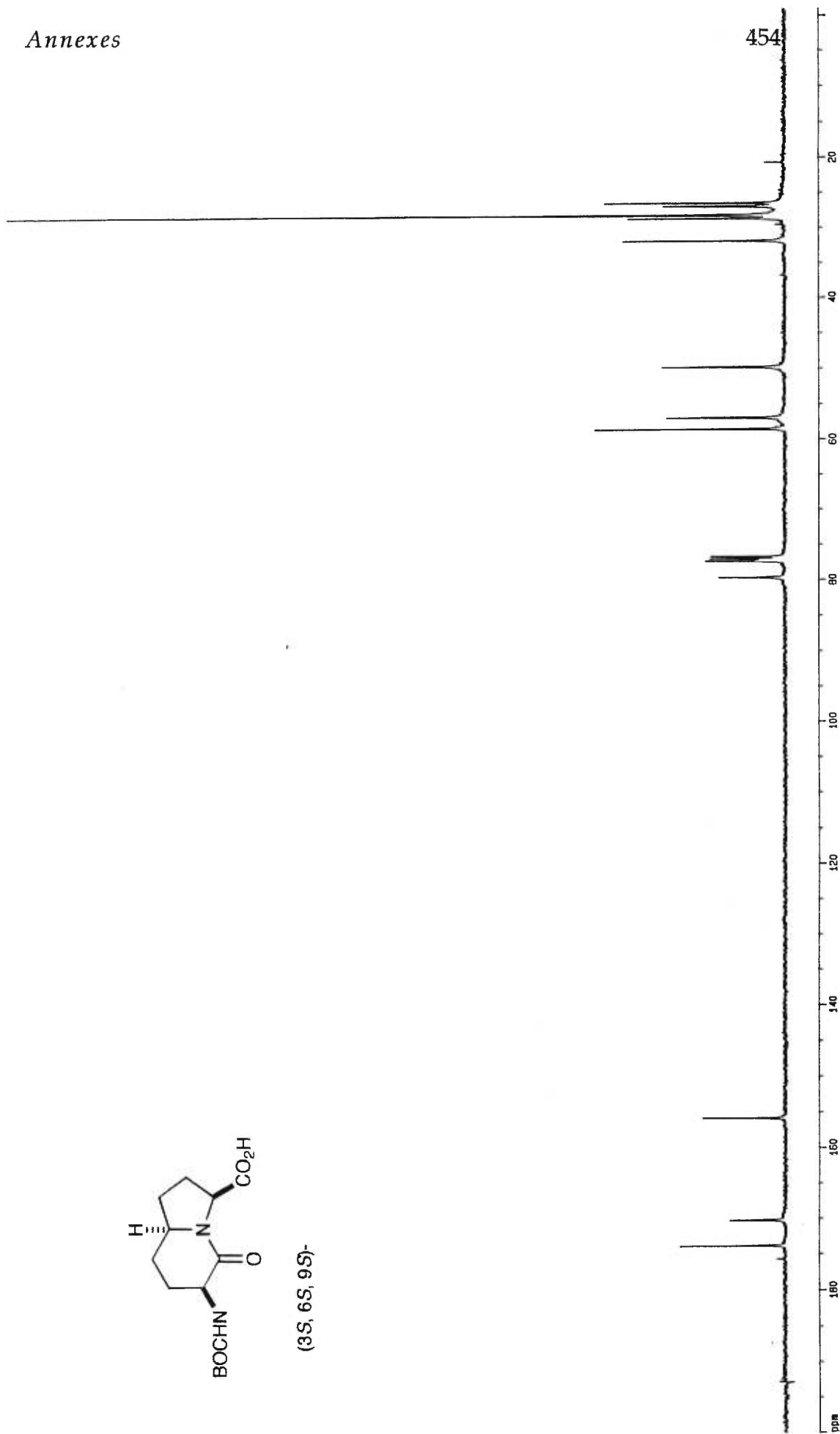


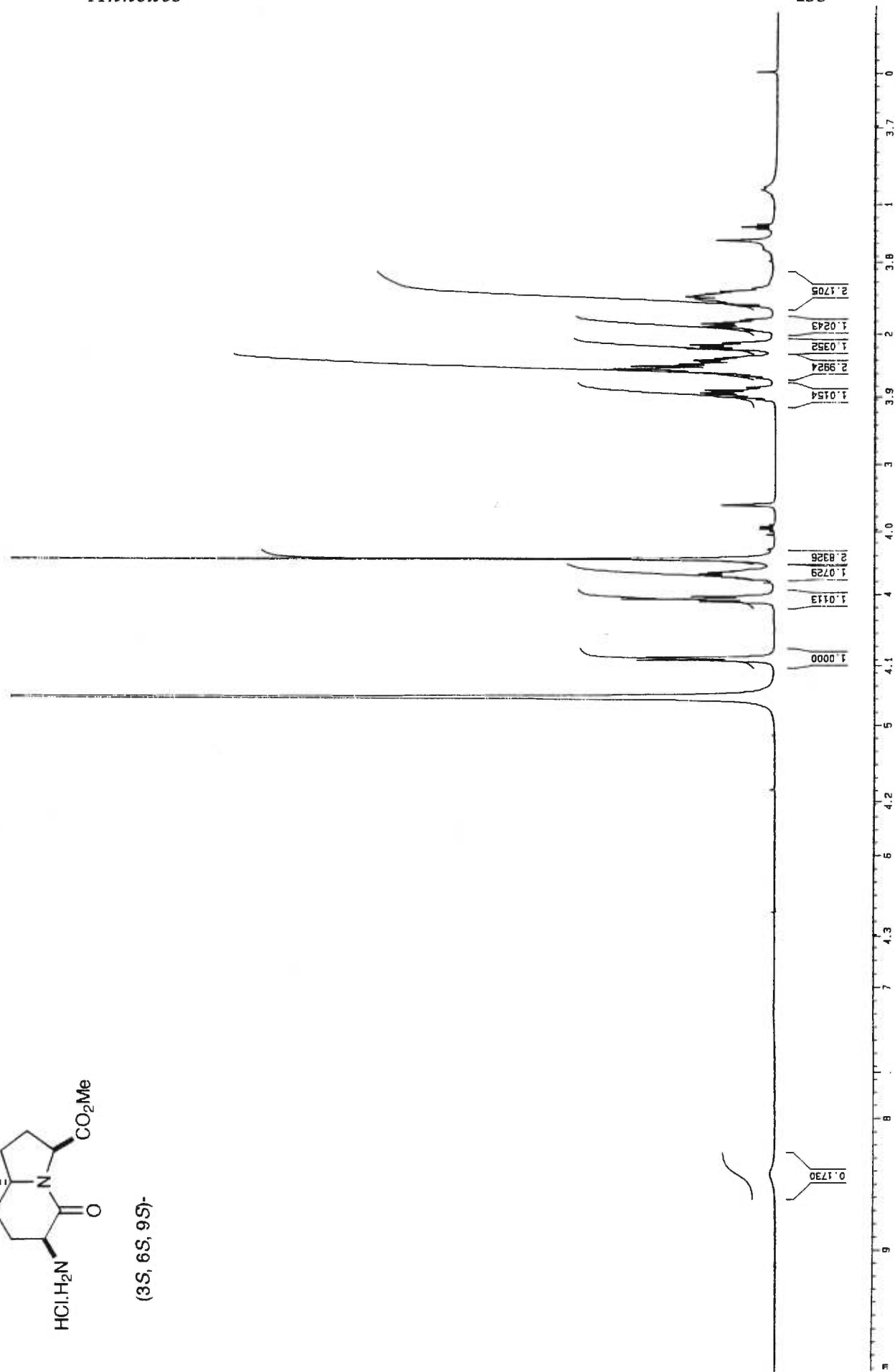
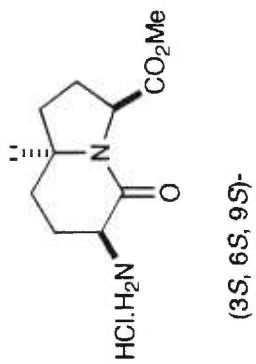
(3S, 6S, 9S)-

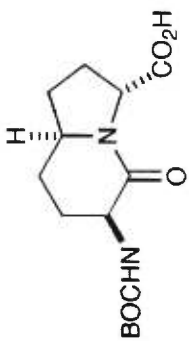




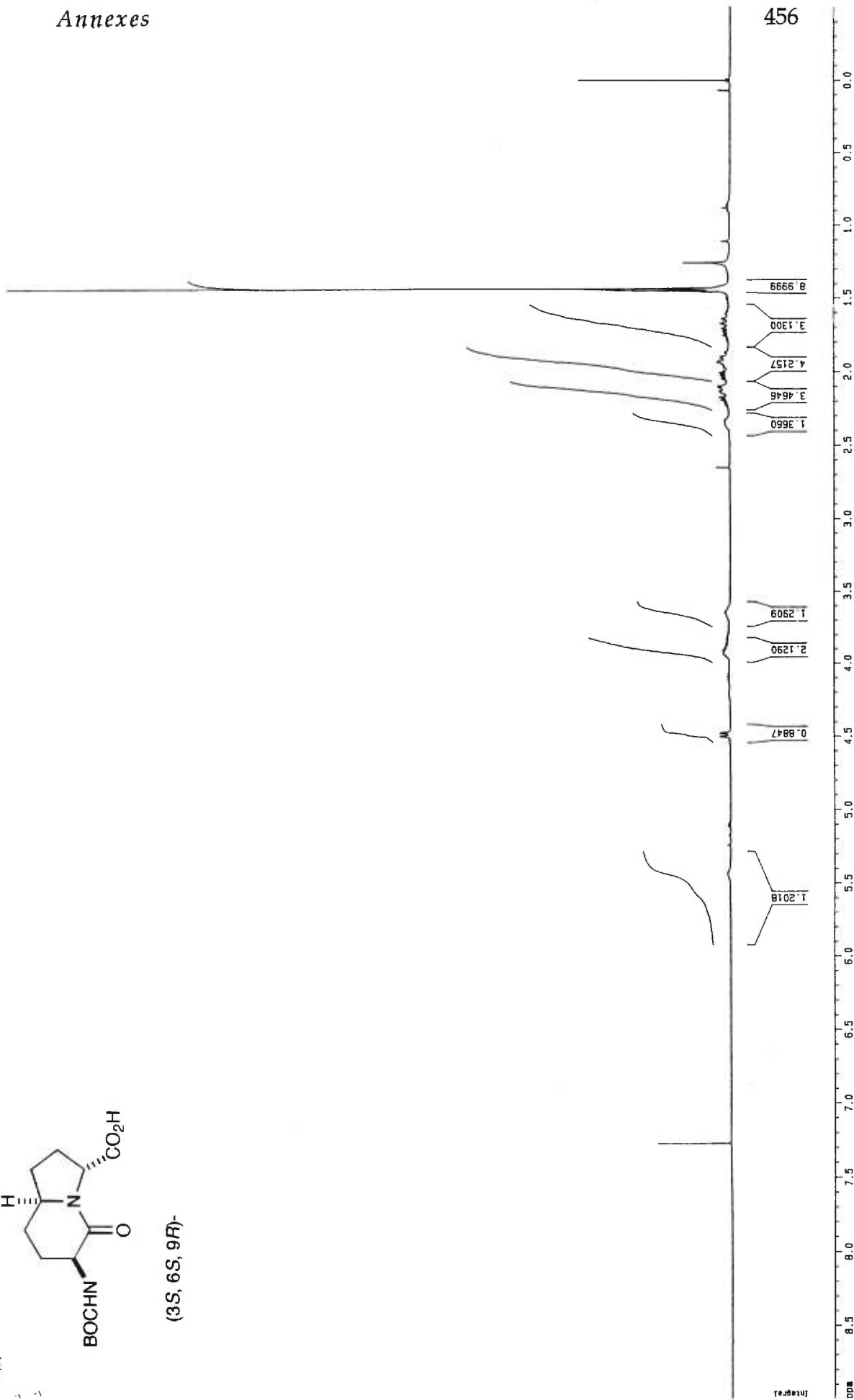
(3S, 6S, 9S)-

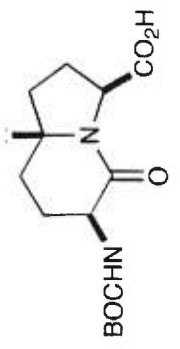
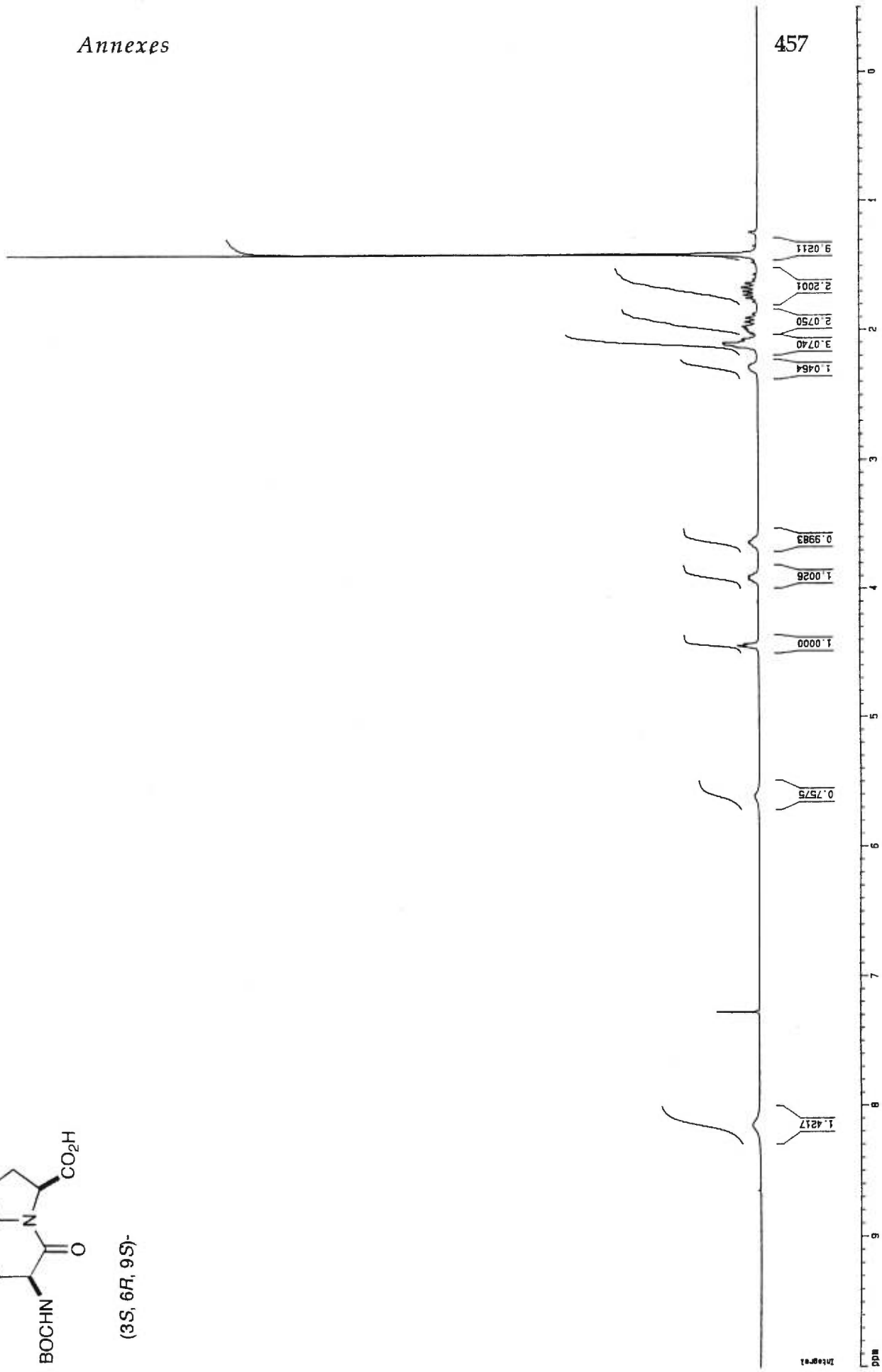




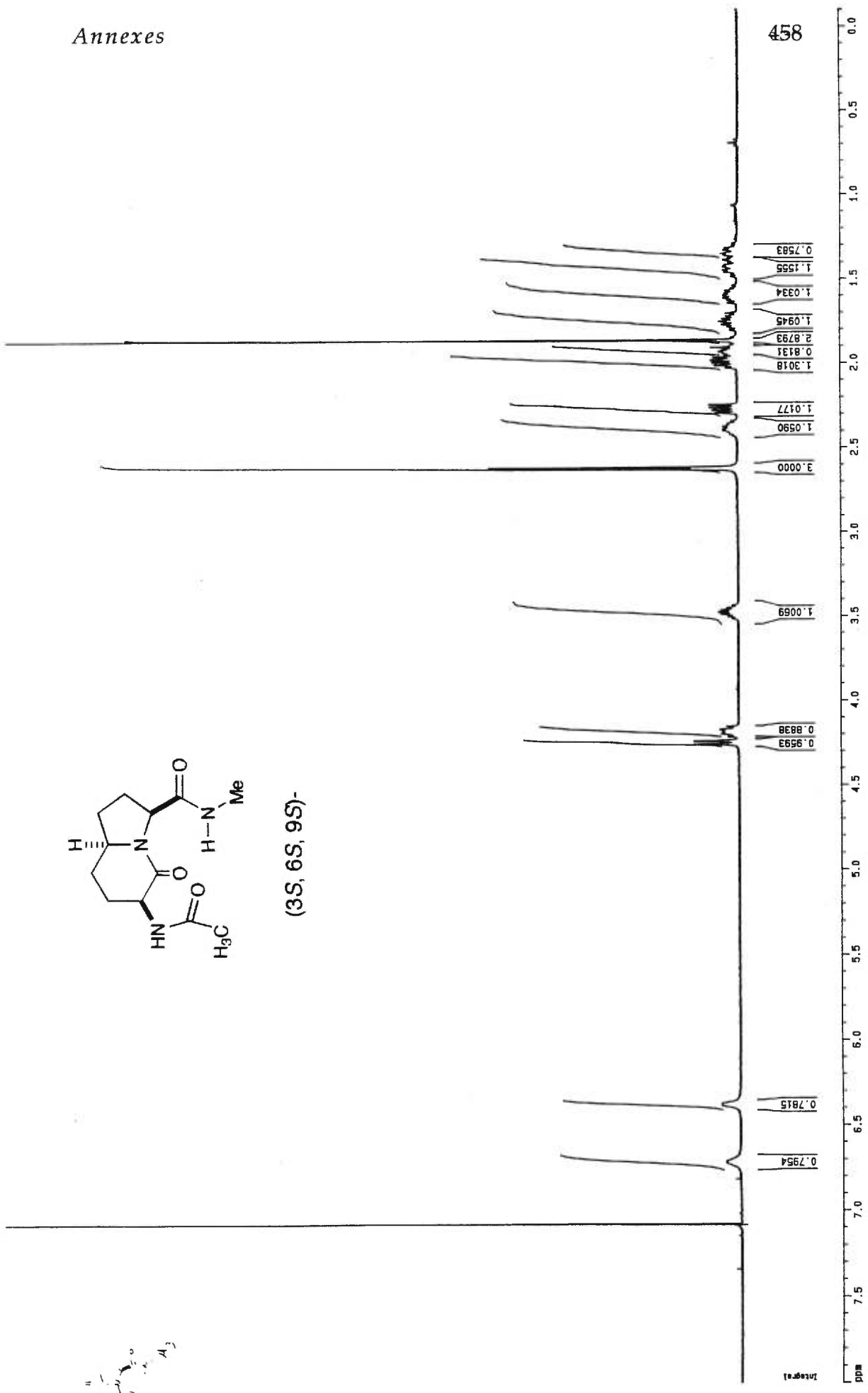


(3S, 6S, 9R)-

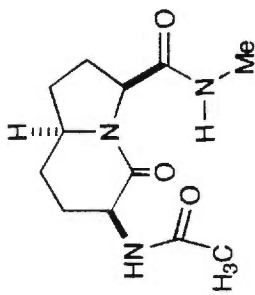
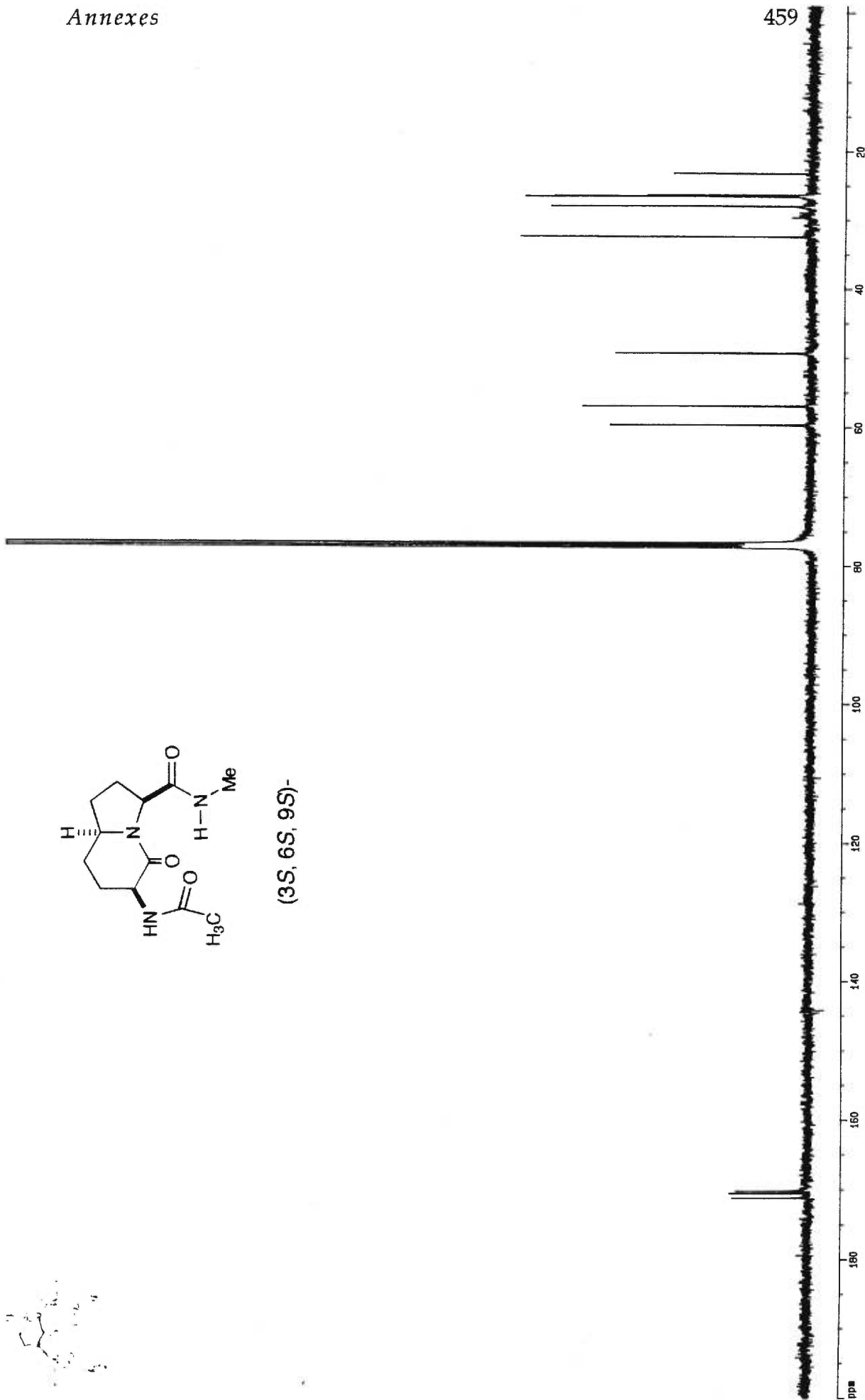




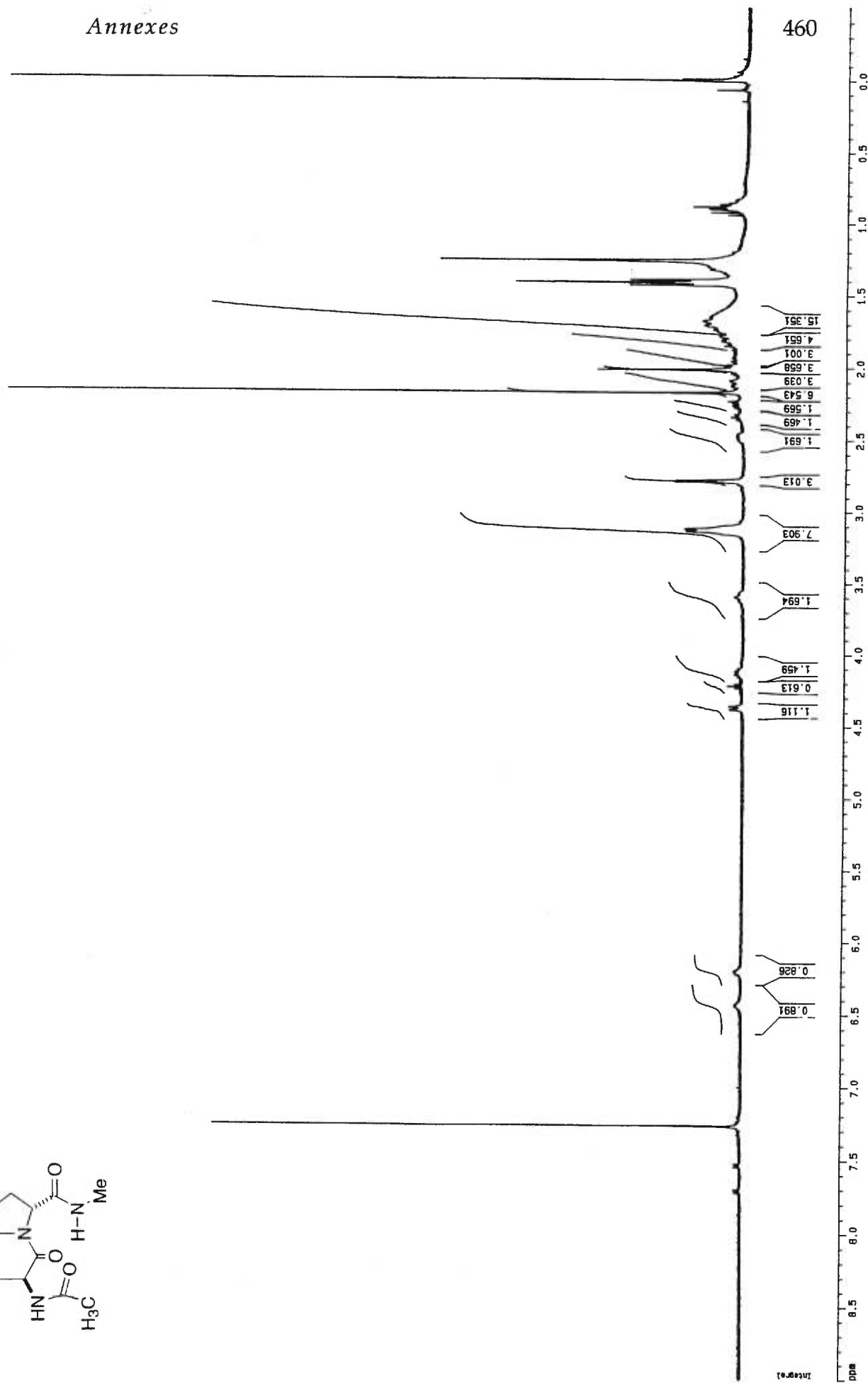
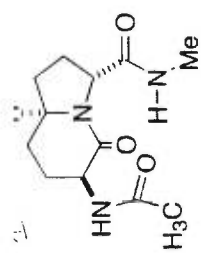
(3S, 6R, 9S)-

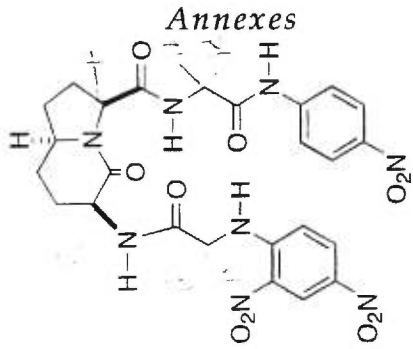


11
A₂

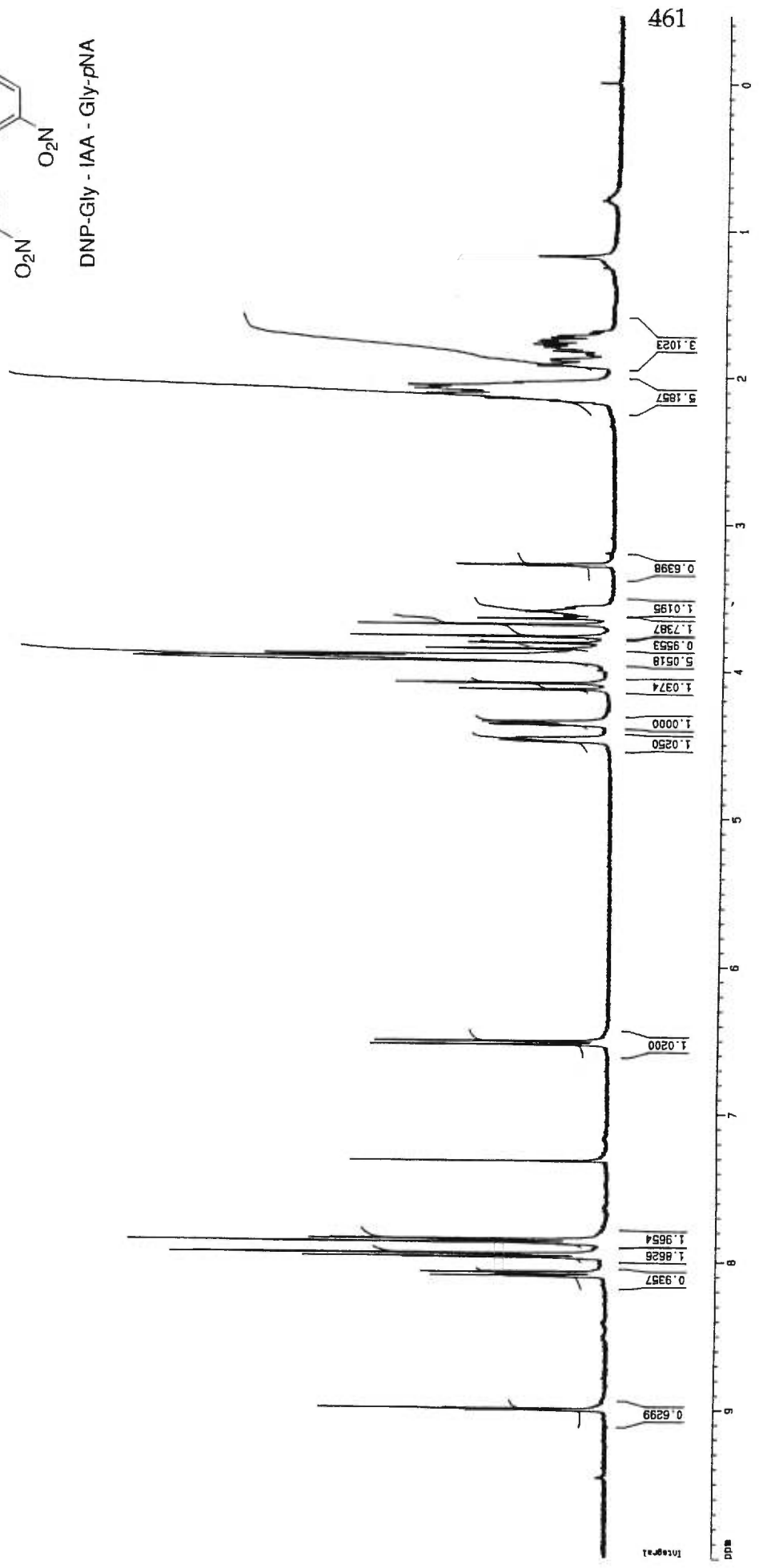


(3S, 6S, 9S)-





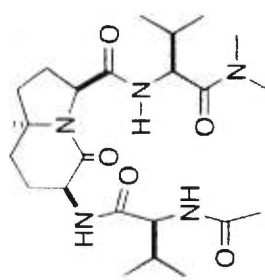
DNP-Gly - IAA - Gly-pNA



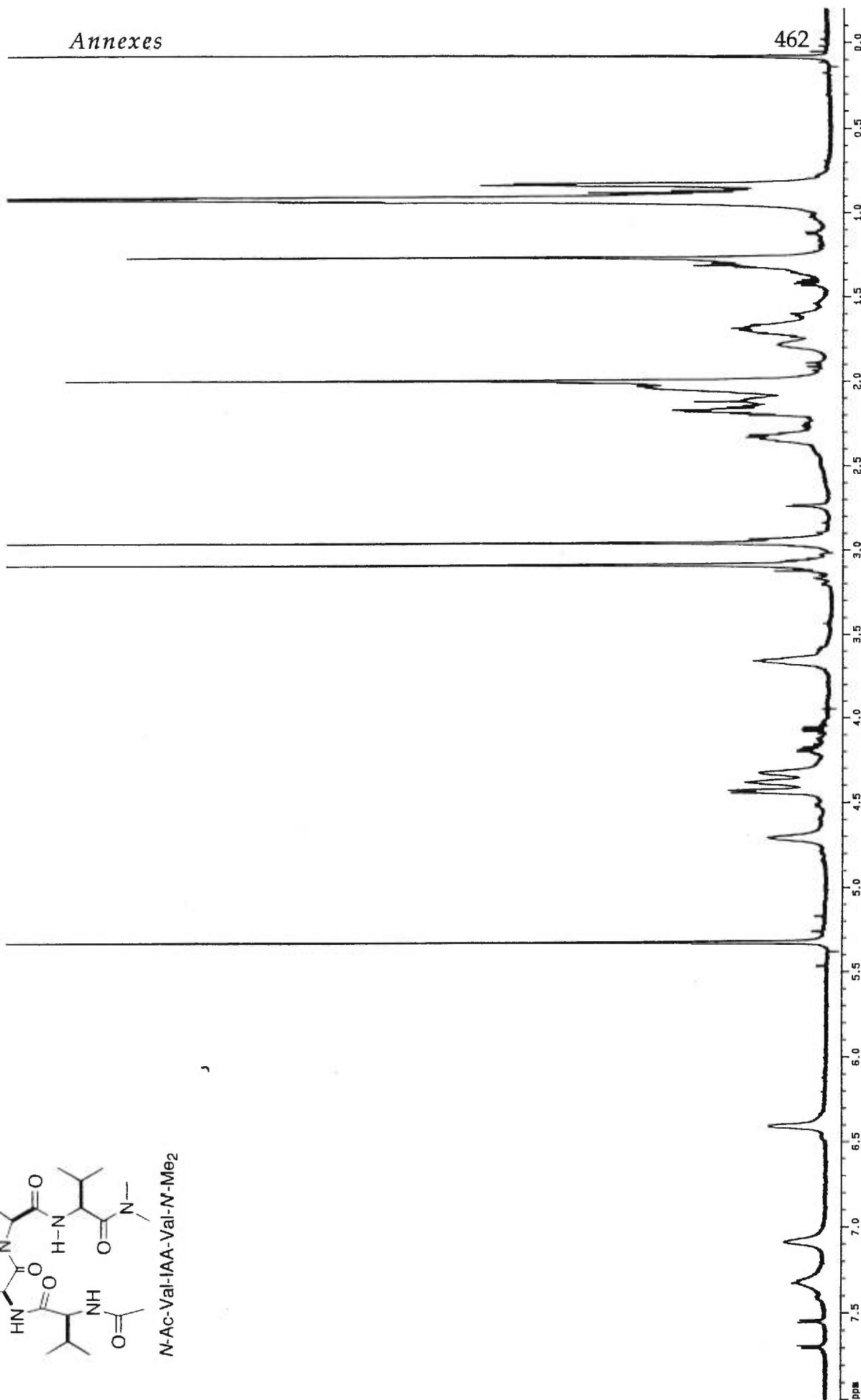
Annexes

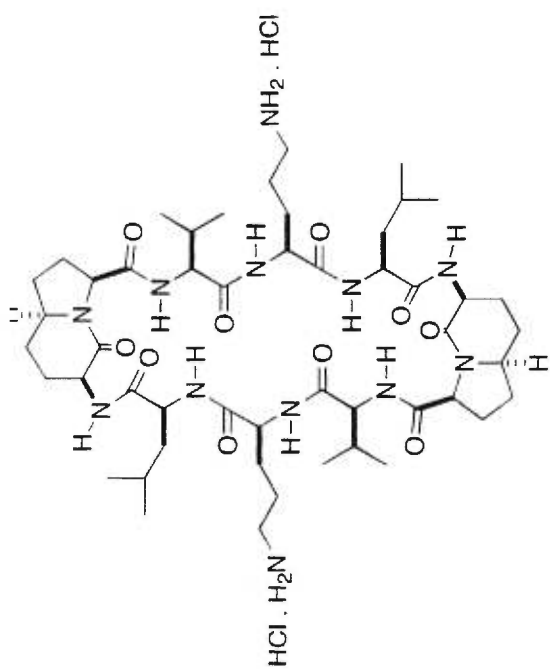
462

ppm/decouplent 1

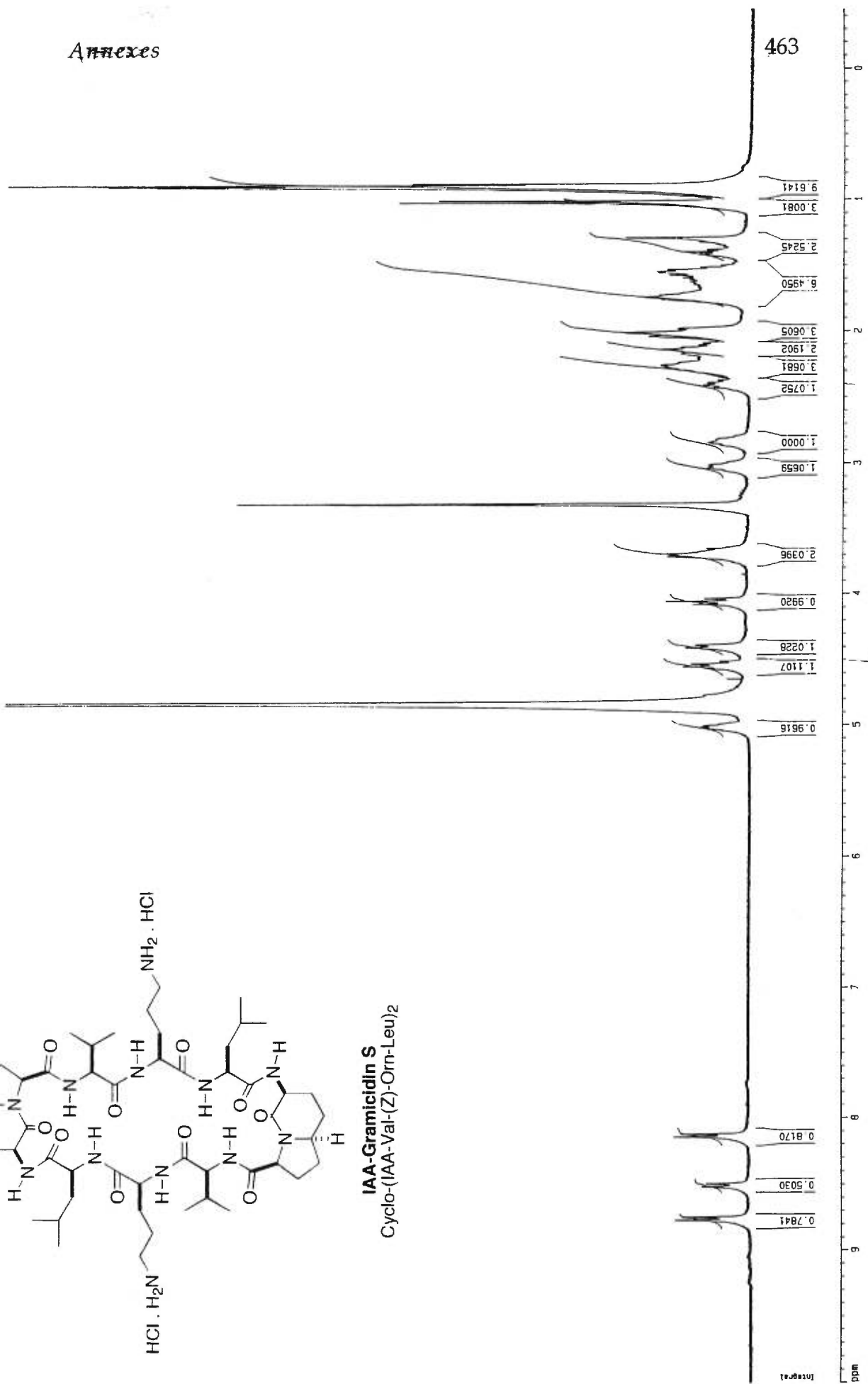


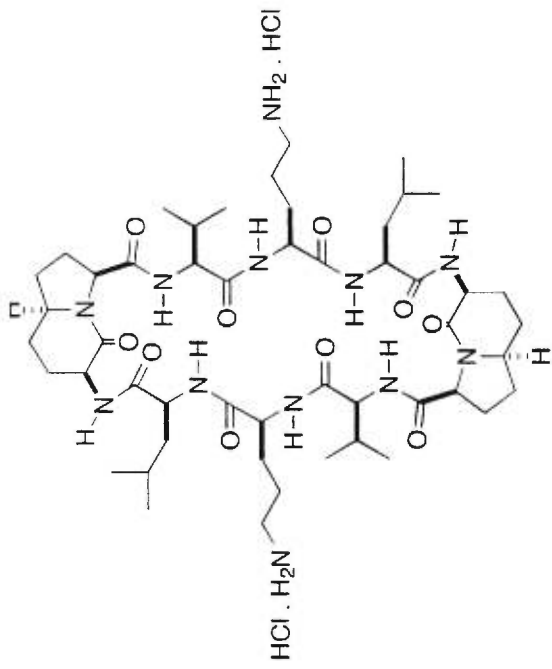
N-Ac-Val-IAA-Val-N-Me2



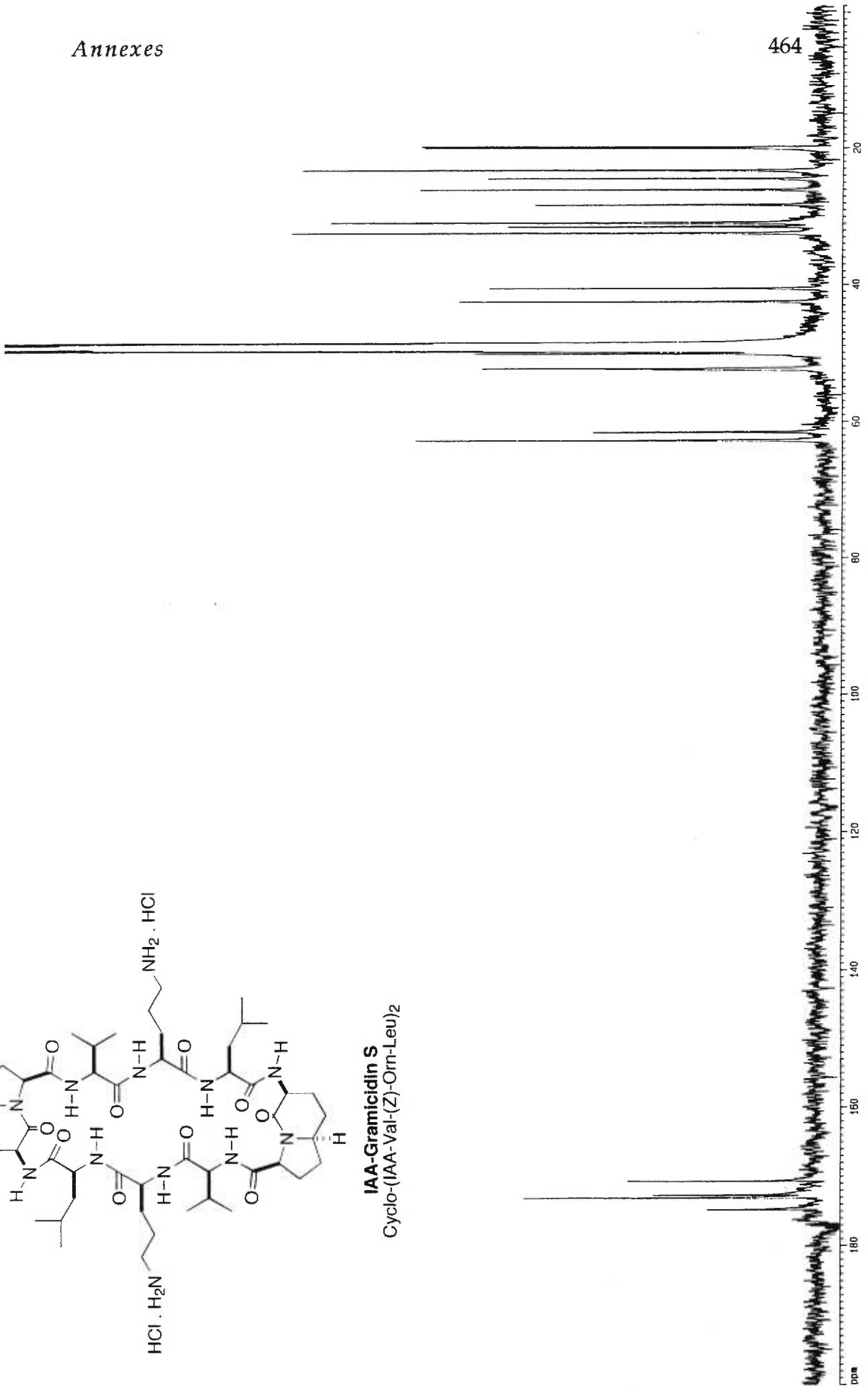


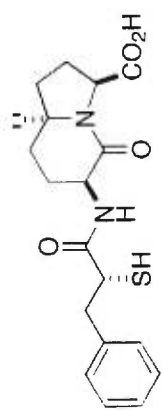
IAA-Grammicidin S
Cyclo-(IAA-Val-(Z)-Orn-Leu)₂



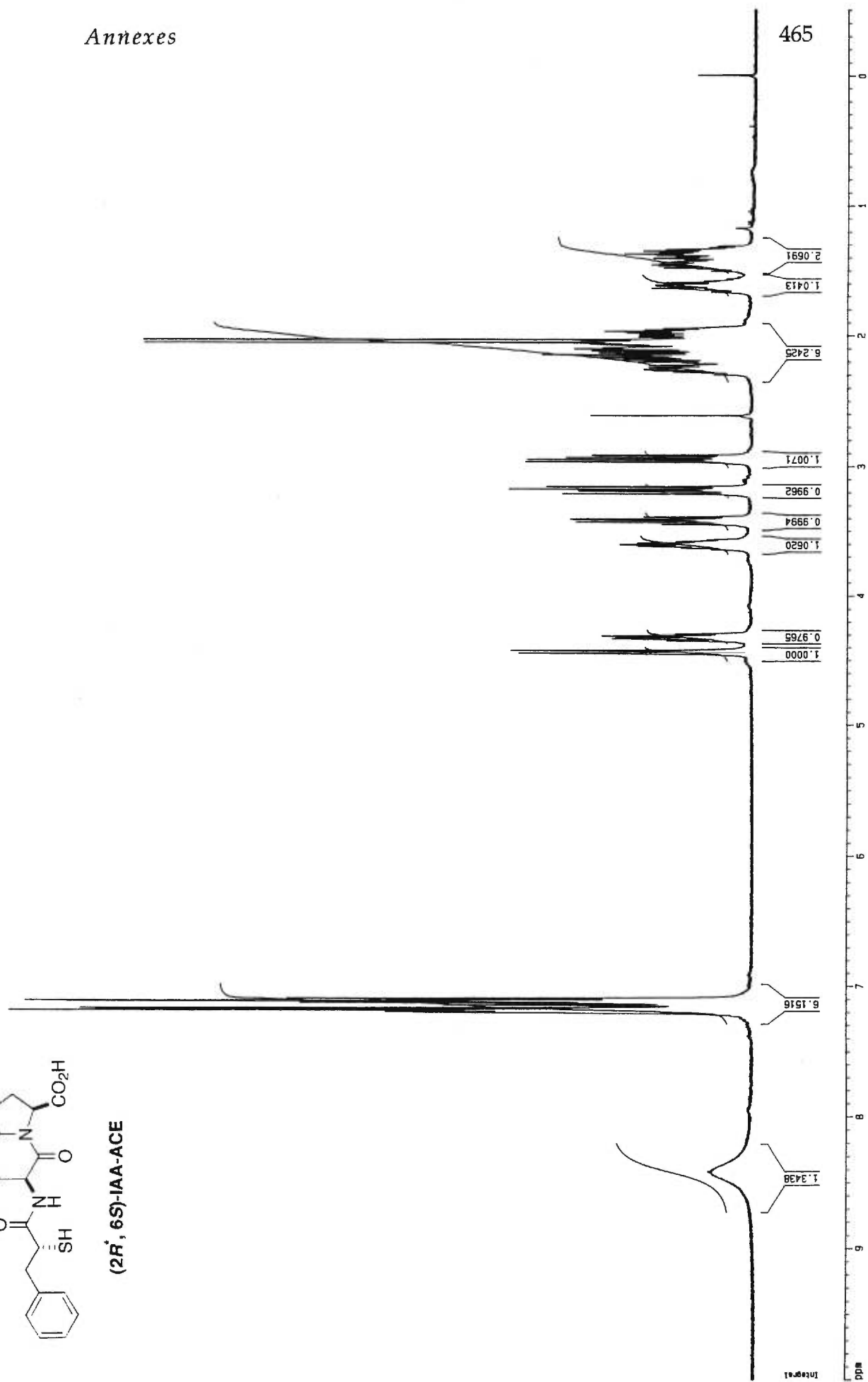


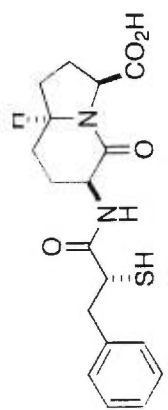
IAA-Grammicidin S
Cyclo-(IAA-Val-(Z)-Orn-Leu)₂



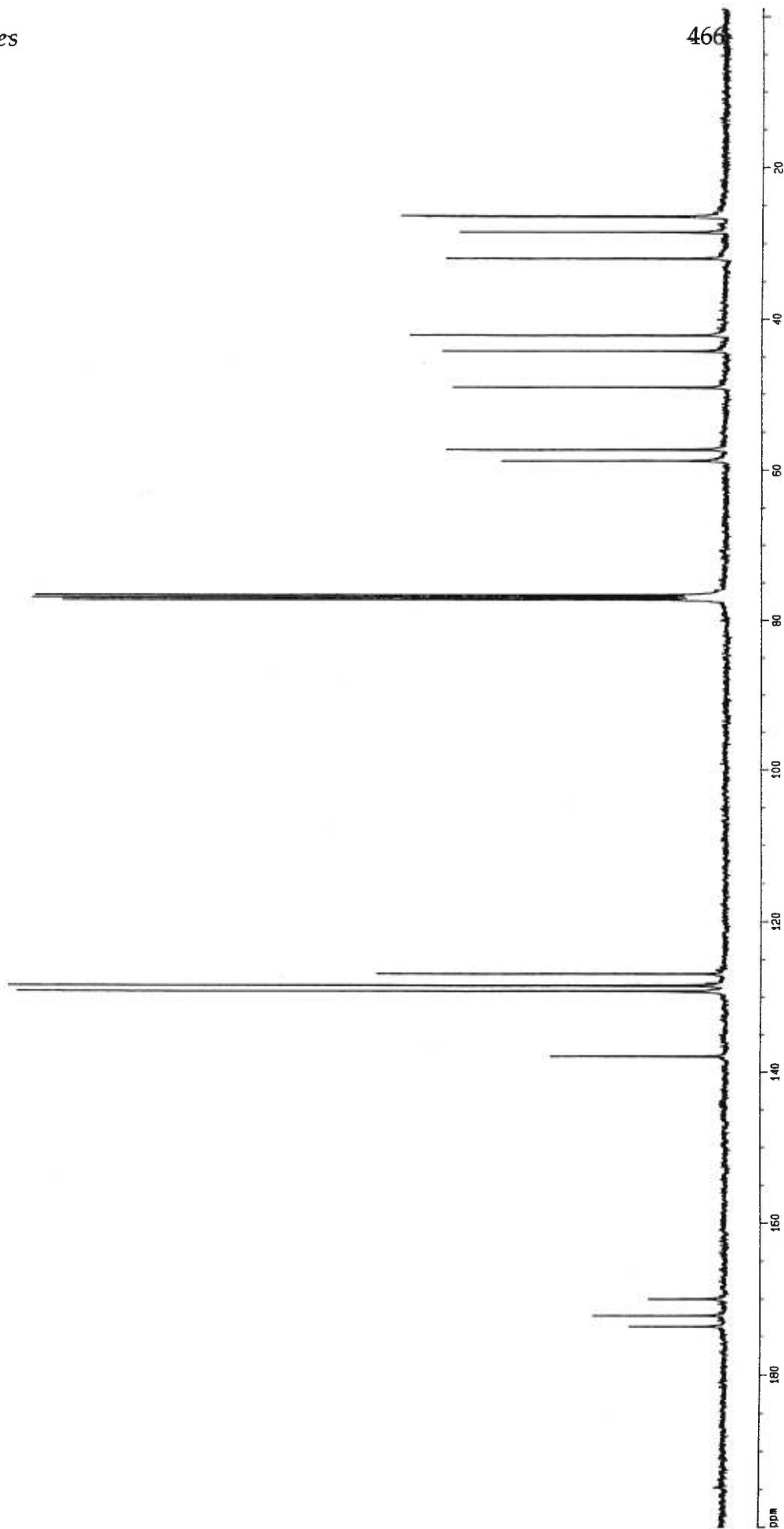


(2R, 6S)-IAA-ACE

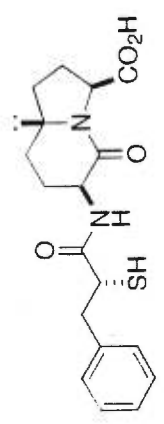




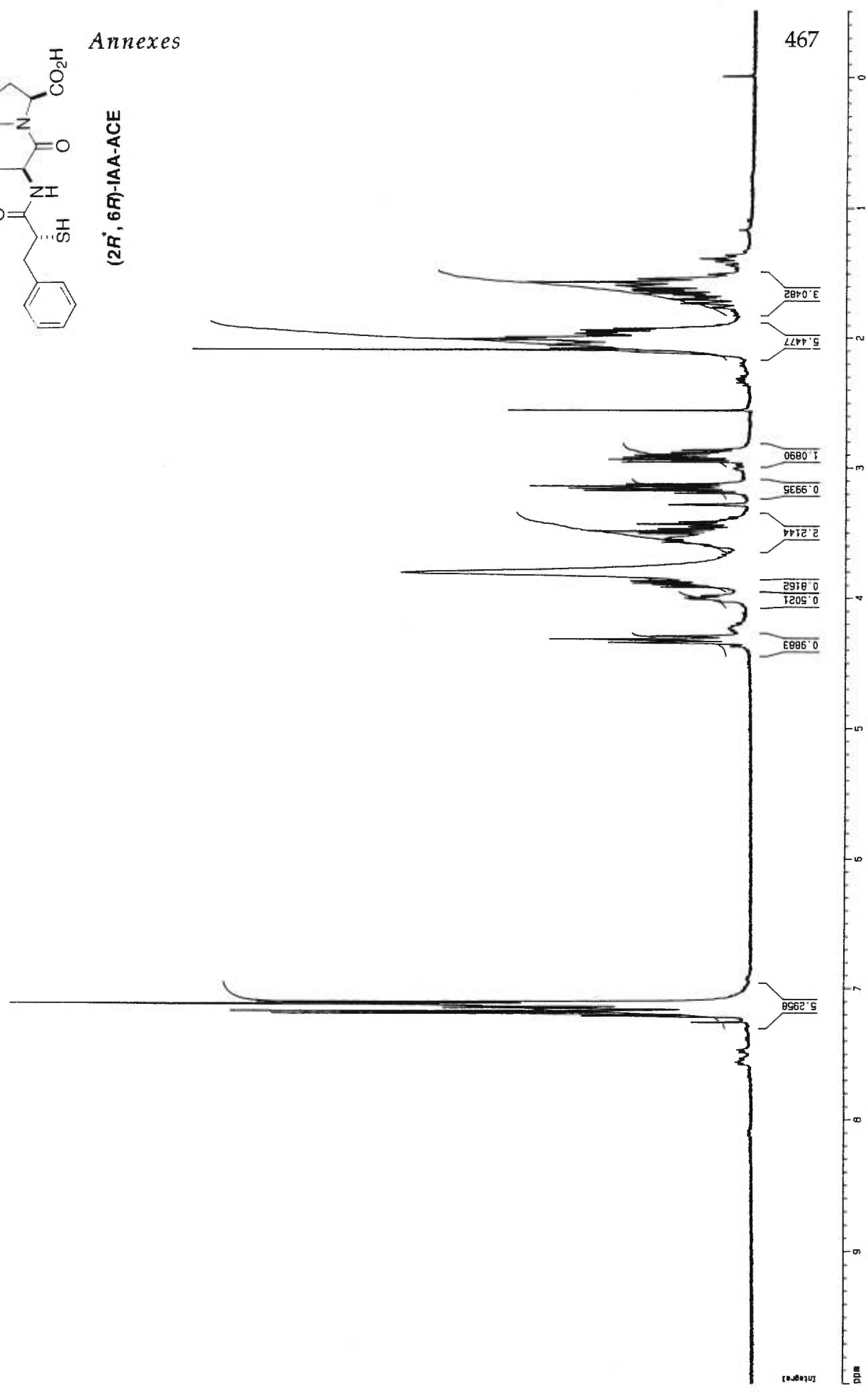
(2*R*, 6*S*)-IAA-ACE

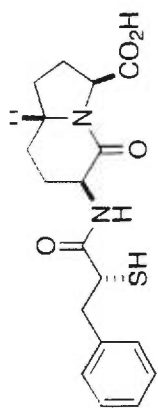


Annexes

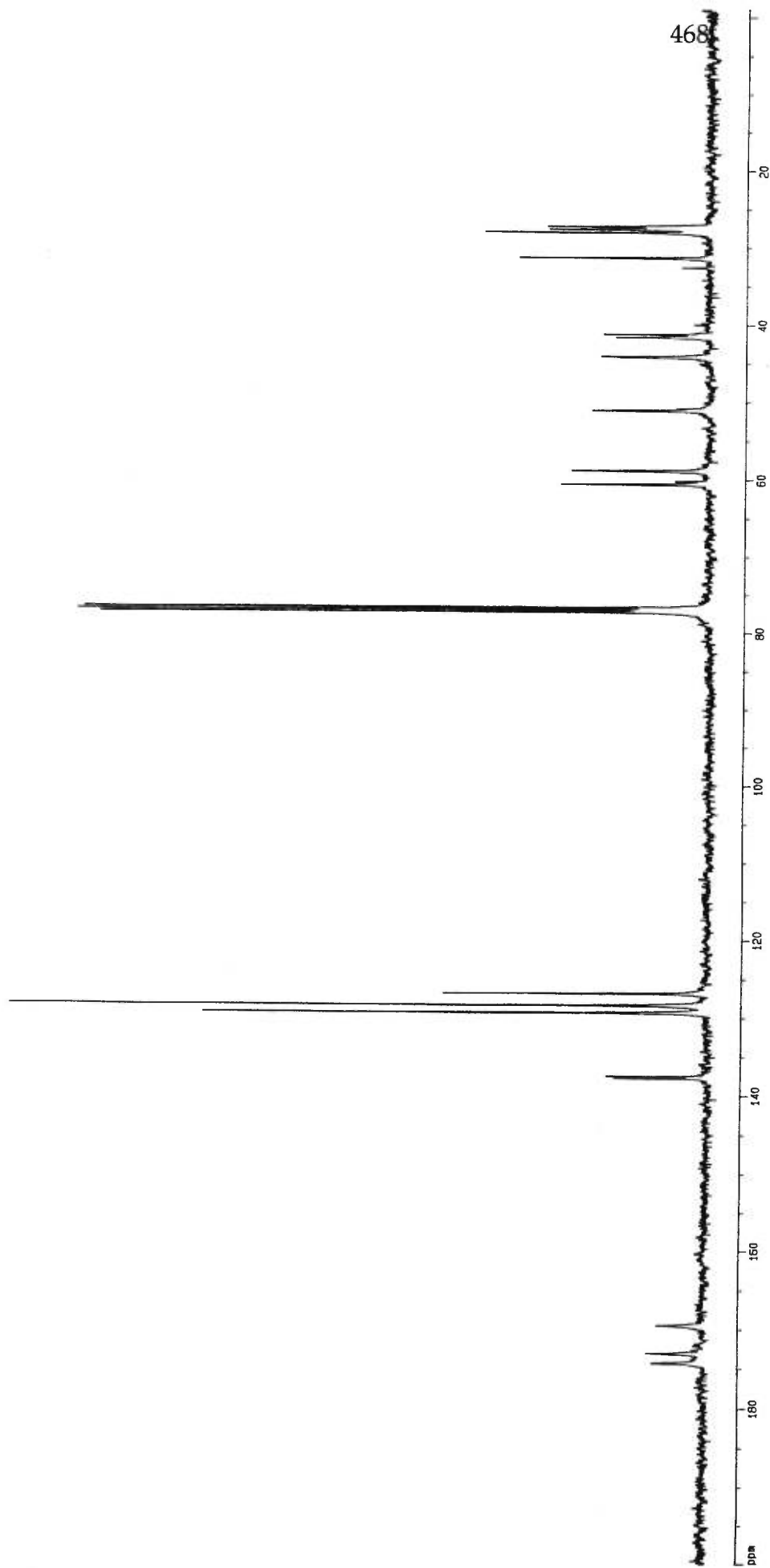


(2R, 6R)-IAA-ACE





(2*R*, 6*R*)-IAA-ACE

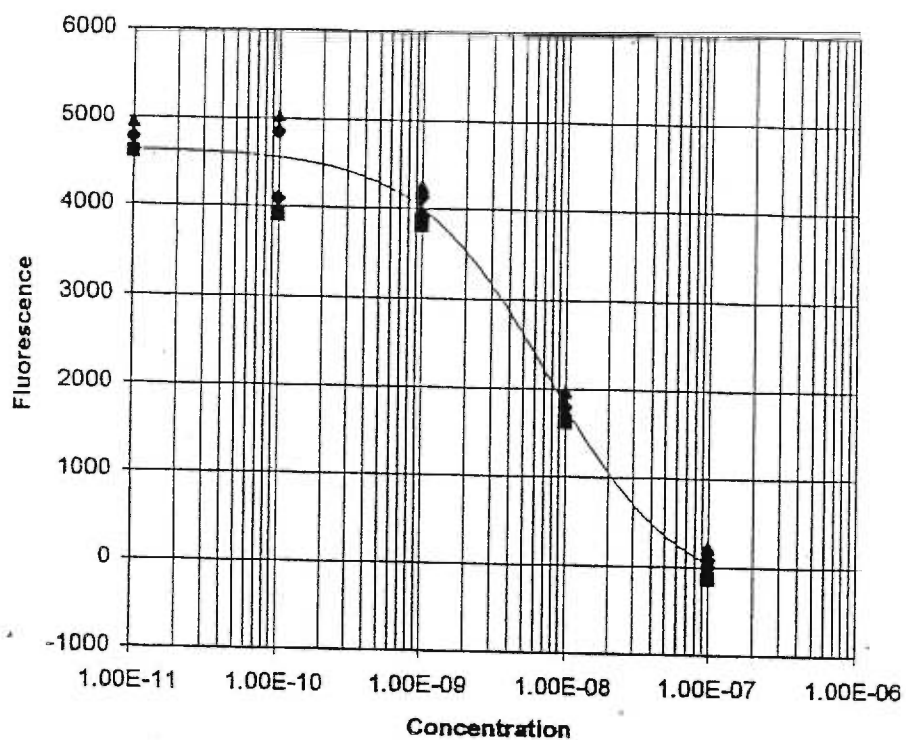


ANNEXE 3

Courbes d'inhibition de l'ACE et de la NEP pour les analogues

(2'R, 3S, 6R, 9S)-2 et (2'R, 3S, 6R, 9S)-2

LOMH 378 SUR ACE



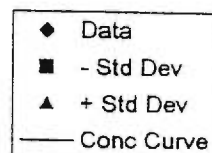
A=4638.13

B=0.95021

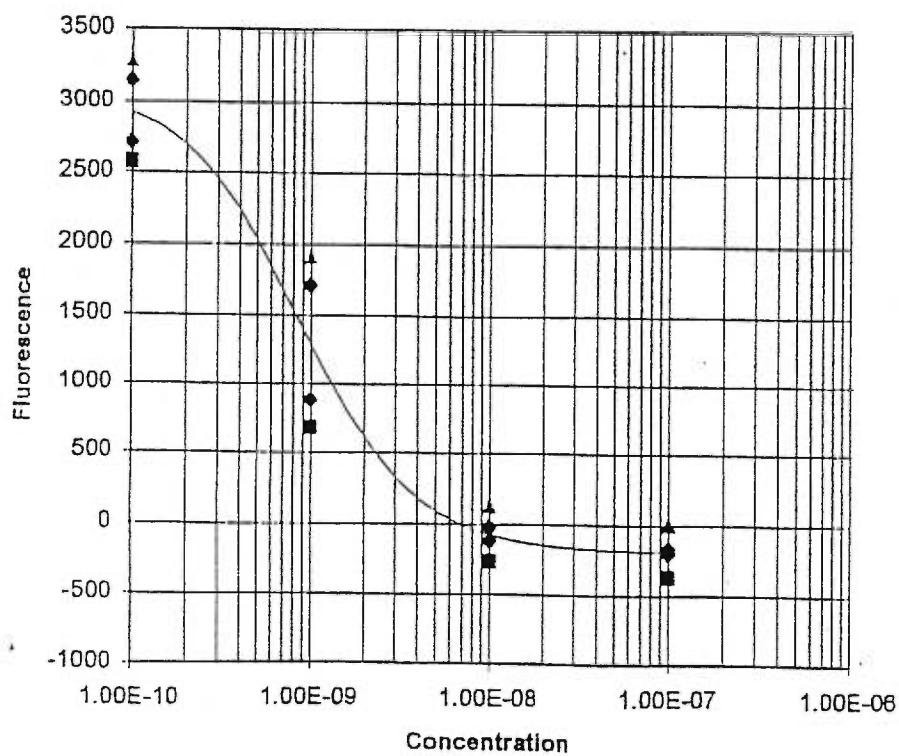
C=7.54538e-009

D=-357.66

r=0.989922



LOMH389 SUR ACE



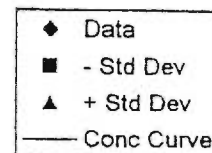
A=3103.96

B=1.33534

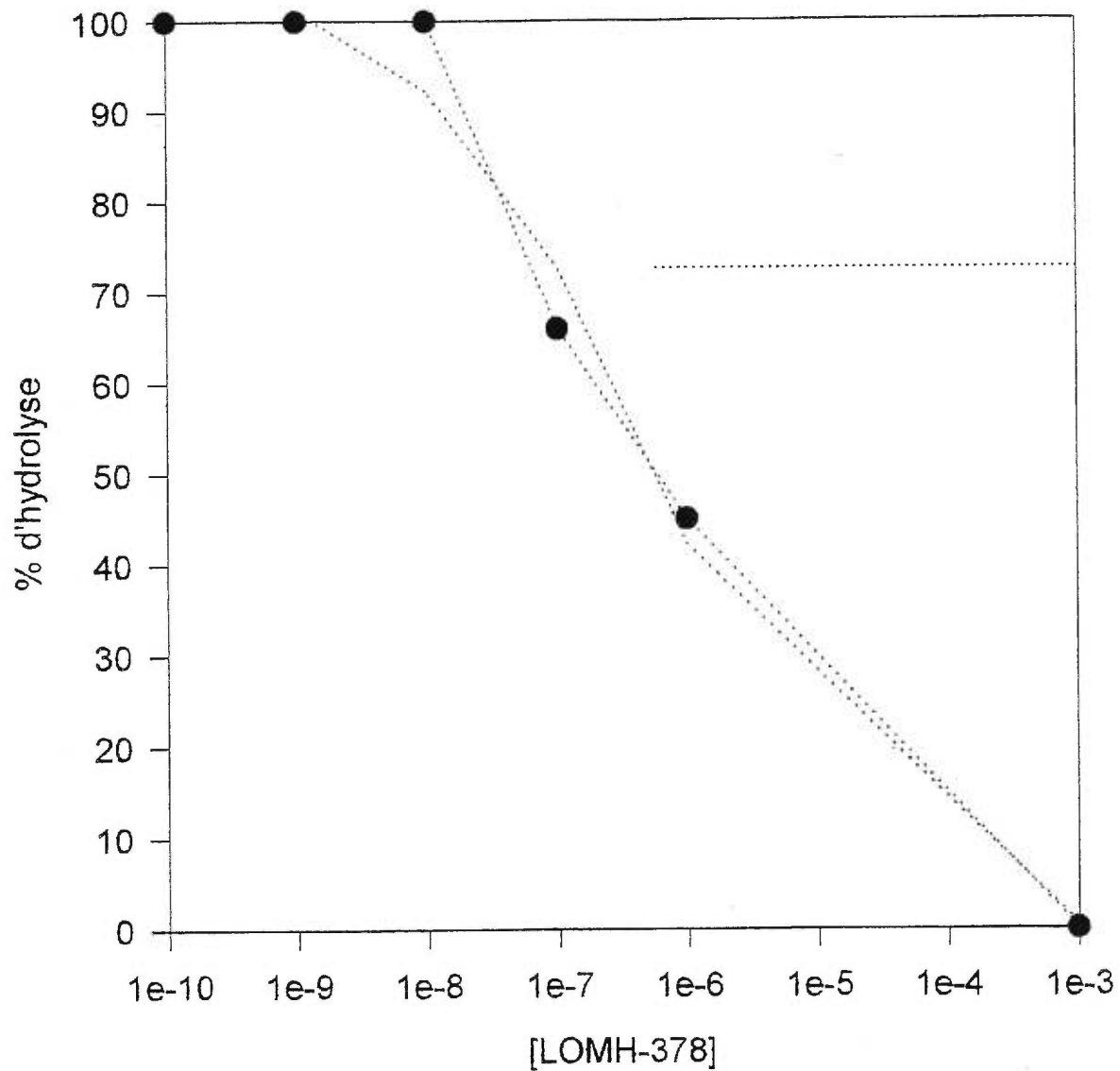
C=8.61445e-010

D=-192.756

r=0.954359

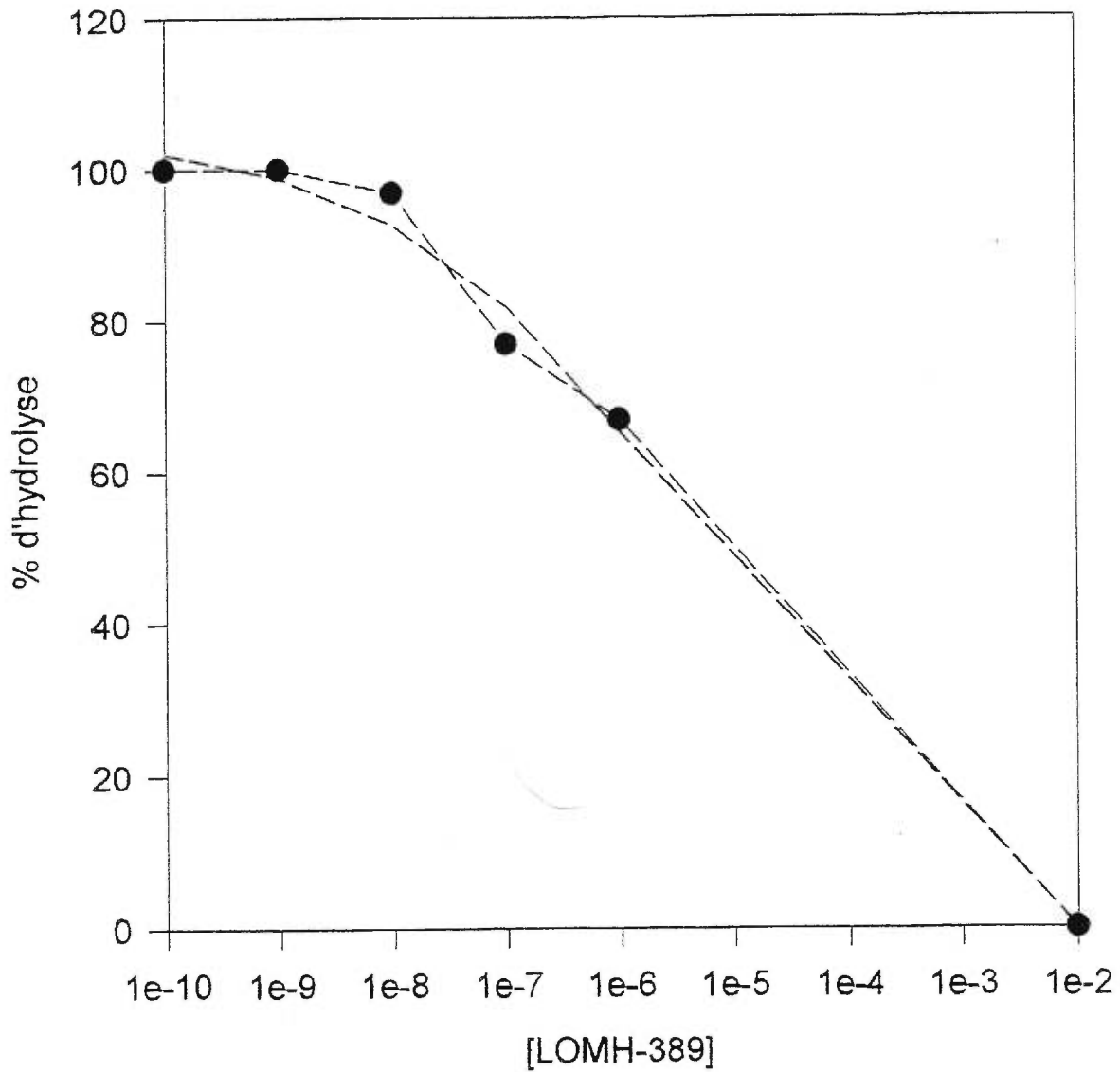


Courbe d'inhibition de la NEP par LOMH-378



$$IC_{50} = 5.119 \times 10^{-7} \pm 3.303 \times 10^{-7} \text{ M}$$

Courbe d'inhibition de la NEP par LOMH-389



$$IC_{50} = 7.363 \times 10^{-6} \pm 1.325 \times 10^{-5} \text{ M}$$