

2m11.2517.2

Université de Montréal

**Nouveau mimétisme du site actif des protéases aspartiques:
Conception, synthèse et caractérisation du *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp]**

par

Eryk Thouin

Département de chimie
Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître es sciences (M. Sc.)
en chimie

Décembre 1996

©Eryk Thouin, 1996



QD
3
U54
1997
V.020

IDENTIFICATION DU JURY

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:
Nouveau mimétisme du site actif des protéases aspartiques: Conception,
synthèse et caractérisation du *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp]

Présenté par:
Eryk Thouin
a été évalué par le jury composé
des personnes suivantes:

Denis Gravel	président-rapporteur
William Lubell	directeur de recherche
Richard Giasson	membre du jury

Mémoire accepté le: 07.04.97

à ma famille, mes ami(e)s et spécialement pour Karine

Sommaire

De nouveaux catalyseurs peuvent être générés par la construction de peptides, incorporant des acides aminés naturels et conformationnellement restreints, dans l'objectif de mimer les aspects structuraux des sites actifs d'enzymes. Le travail présenté dans ce mémoire consiste en la synthèse et en la caractérisation d'un nouveau peptide cyclique, le *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1), dans lequel deux résidus d'acide aspartique sont situés entre deux résidus d'acide aminé indolizidinone (IAA). Ce peptide cyclique est conçu de façon à placer les groupes carboxyliques des résidus d'acide aspartique à proximité grâce aux restrictions de la chaîne peptidique causées par les IAAs. Avec ces caractéristiques, le *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1) est proposé comme mimétisme des protéases aspartiques.

Les protéases aspartiques constituent une classe d'enzymes qui ont pour fonction d'hydrolyser les liens amides des peptides et des protéines. Leur site actif contient deux résidus d'acide aspartique dont les chaînes latérales sont situées à proximité. Un seul groupe carboxylate est protoné dans la forme active de l'enzyme. Le mécanisme d'hydrolyse pour ces molécules procède soit par une attaque nucléophile par un des groupes carboxylates où par l'attaque d'une molécule d'eau assistée par les groupes carboxyles comme acide général/base générale. Dans le *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1), la relation spatiale entre les deux groupes carboxyliques des résidus d'acide aspartique pourrait promouvoir l'hydrolyse de liens esters ou amides selon le mécanisme base générale/acide général ou nucléophile.

Deux conformations de même énergie ont été trouvées pour le *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1) utilisant la recherche conformationnelle de MonteCarlo. La première conformation possède les caractéristiques d'un feuillet plissé β antiparallèle situé entre deux IAAs placés aux positions $i + 1$ et $i + 2$ de repliements β de type II'. Dans la seconde, les résidus IAA sont placés aux positions i et $i + 1$ d'un repliement tordu. Le peptide cyclique 1 a été préparé en solution avec un rendement de 11 % ainsi que sur support solide avec un rendement de 25 % utilisant la résine PAB-BHA.

La conformation du *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1) a été déterminée avec l'aide des constantes de couplage scalaires en RMN de ^1H , des couplages dipolaires du spectre NOESY et avec les gradients de déplacement chimiques des protons amides en fonction de la température ($\Delta\delta/\Delta T$). Les résultats de l'analyse conformationnelle soutiennent l'une des conformations trouvées par la modélisation moléculaire et non la seconde.

Les constantes de couplage vicinales entre les protons en α et les deux protons diastéréotopiques en β des résidus Asp indiquent que les groupes carboxyliques sont positionnés au dessus du cycle. De plus, le titrage potentiométrique dans l'eau du *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1) donne des valeurs anormales de pKa pour les deux acides carboxyliques. Par contre, les expériences préliminaires consistant à déterminer l'activité catalytique du *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1) montrent que le peptide cyclique est peu efficace pour accélérer l'hydrolyse de l'acétate de 2,4-dinitrophényle.

En détaillant la synthèse et la caractérisation du *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1), ce travail de recherche discute du mérite de l'utilisation d'acide aminés naturels et conformationnellement restreints pour la construction de peptides pouvant mimer les sites actifs d'enzymes.

Table des matières

	Page
Sommaire	i
Table des matières	iii
Liste des figures	v
Liste des schémas	vii
Liste des tableaux	viii
Liste des équations	ix
Liste des abréviations et des sigles	x
Remerciements	xii
CHAPITRE 1: Introduction	1
1.1 Enzymes et modèles d'enzymes.	1
1.2 Mimétismes de peptidases.	2
1.3 Les protéases aspartiques.	4
1.4 Nouveau modèle pour le site actif des protéases aspartiques.	7
CHAPITRE 2: Modélisation moléculaire	10
CHAPITRE 3: Synthèse en solution	16
3.1 Préparation de l'acide (3S, 6S, 9S)-2-oxo-3- N-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylique (BOC-IAA-OH, 2).	16
3.2 Synthèse en solution du <i>cycl</i> [α IAA-Asp-IAA-Asp], (1).	21
CHAPITRE 4: Synthèse sur support solide	27
4.1 Revue de la littérature et stratégie.	27

4.2	Préparation de l'acide (2 <i>S</i>)- <i>N</i> -(BOC)aspartique- α -allyl ester (BOC-Asp-OAllyl, (2 <i>S</i>)-24).	30
4.3	Synthèse sur support solide du <i>cyclo</i> [IAA-Asp-IAA-Asp] (1).	33
CHAPITRE 5: Caractérisation du <i>cyclo</i>[IAA-Asp-IAA-Asp] (1)		40
5.1	Analyse conformationnelle	40
5.2	Détermination des constantes de dissociation	51
CHAPITRE 6: Activité hydrolytique		55
CHAPITRE 7: Conclusion		59
CHAPITRE 8: Section expérimentale		62
8.1	Généralités.	62
8.2	Modélisation moléculaire.	63
8.3	Synthèse de l'acide (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-carboxylique (BOC-IAA-OH, 2).	63
8.4	Synthèse en solution de <i>cyclo</i> [IAA-Asp-IAA-Asp] (1).	70
8.5	Synthèse de l'acide (2 <i>S</i>)- <i>N</i> -(BOC)aspartique- α -allyl ester (BOC-Asp-OAllyl, (2 <i>S</i>)-24).	77
8.6	Synthèse sur support solide de <i>cyclo</i> [IAA-Asp-IAA-Asp] (1).	81
8.7	Détermination des constantes de dissociation du <i>cyclo</i> [IAA-Asp-IAA-Asp] (1).	88
8.8	Détermination de l'activité hydrolytique.	89
Références		91
Annexes		xiii

Liste des figures

	Page
Figure 1: Mécanismes possibles pour l'hydrolyse des liens amides par les protéases aspartiques.	5
Figure 2: Modèles des protéases aspartiques.	6
Figure 3: Peptides conformationnellement restreints comme modèles de sites actifs d'enzymes.	7
Figure 4: <i>Cyclo</i>[IAA-Asp-IAA-Asp] (1) comme mimétisme du site actif des protéases aspartiques.	8
Figure 5: Minima globaux de la recherche MonteCarlo.	11
Figure 6: Angles dièdres des minima d'énergie de l'analyse MonteCarlo.	13
Figure 7: Structure du TBTU et du HOBt.	23
Figure 8: Schémas de protection de l'acide aspartique (a) connus et (b) proposé pour la synthèse sur support solide.	28
Figure 9: Supports solides employés.	34
Figure 10: Structure du HATU.	37
Figure 11: Chromatogrammes HPLC des peptides bruts issus de la synthèse sur (a) la résine de Merrifield, (b) la résine PAB-BHA avec TBTU comme réactif de cyclisation et (c) la résine PAB-BHA avec HATU comme réactif de cyclisation.	38

- Figure 12:** Spectre RMN de ^1H (non-référentiel, 400 MHz) du *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1), 30 mM dans 9:1 H_2O :acétone- d_6 à pH = 3,5. 42
- Figure 13:** Déplacements chimiques (référéntiels vs TMS), Intégration des signaux, couplages scalaires et spectre COSY (600 MHz) du peptide 1, 20 mM dans 9:1 H_2O :acétone- d_6 à pH = 3,5 et 303 K. 43
- Figure 14:** Conformations probables pour le *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1). 45
- Figure 15:** Signal RMN ^1H du $-\text{CH}_2\beta-$ des résidus Asp dans (a) 9:1 H_2O :acétone- d_6 , pH = 3,5 et (b) DMSO- d_6 , pH = 4 du *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1). 46
- Figure 16:** Positionnement des chaînes latérales des résidus Asp dans le *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1). 47
- Figure 17:** Couplages dipolaires observés et spectre NOESY (600 MHz) du peptide 1, 20 mM dans 9:1 H_2O :acétone- d_6 à pH = 3,5 et 303 K. 48
- Figure 18:** Exemples de polyacides. 51
- Figure 19:** Mécanismes possibles pour l'hydrolyse du 2,4-DNPA par le *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1). 55
- Figure 20:** Graphe de l'absorbance en fonction du temps pour l'expérience et le contrôle à pH = 5. 57
- Figure 21:** Substrats suggérés pour l'étude de l'activité hydrolytique du *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1). 58
- Figure 22:** Génération de bibliothèques de peptides cycliques incorporant le résidu IAA et Asp ou Glu. 60

Liste des schémas

	Page
Schéma 1: Synthèse du (2 <i>S</i>)- <i>N</i> -9-(9-PhF)glutamate de α - <i>tert</i> -butyle- γ -méthyle (6).	16
Schéma 2: (a) Préparation du BrPhF (4). (b) Préparation du trichloroacétimide de <i>tert</i> -butyle (7).	17
Schéma 3: Synthèse de l'acide (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-carboxylique (BOC-IAA-OH, 2).	18
Schéma 4: Étapes de cyclisation de la cétone symétrique 8.	19
Schéma 5: Préparation du TFA·H ₂ N-Asp(OBn)-OAllyl (18).	22
Schéma 6: Synthèse en solution du <i>cyclo</i> [IAA-Asp-IAA-Asp] (1).	24
Schéma 7: Stratégie générale pour la synthèse du <i>cyclo</i> [IAA-Asp-IAA-Asp] (1).	29
Schéma 8: Préparation de l'acide (2 <i>S</i>)- <i>N</i> -(BOC)aspartique α -allyl ester (BOC-Asp-OAllyl, (2 <i>S</i>)-24).	30
Schéma 9: Détermination de la pureté énantiomérique.	32
Schéma 10: (a) Ancrage au support solide et (b) titrage à l'acide picrique.	34
Schéma 11: Synthèse sur support solide du <i>cyclo</i> [IAA-Asp-IAA-Asp] (1).	36

Liste des tableaux

	Page
Tableau I: Gradients $\Delta\delta/\Delta T$ des protons amides entre 303 et 323 K, 2 mM.	49
Tableau II: Activité hydrolytique du peptide 1 (1×10^{-4} M) sur le 2,4-DNPA (1×10^{-5} M) à 35 °C et à pH = 3 (tampon formate de sodium/acide formique), pH = 4 et 5 (tampon acétate de sodium/acide acétique), pH = 7 (tampon MOPS).	56

Liste des équations

	Page
Équation 1: Équation de Karplus modifiée par Wütrich et solutions.	44
Équation 2: Équation utilisée pour le calcul des protons installés (nH) à chaque volume de NaOH ajouté.	53

Liste des abréviations et des sigles:

AcOH	acide acétique
APTS	acide <i>p</i> -toluènesulfonique
Asp	acide aspartique
Bn	benzyle
BOC	<i>tert</i> -butyloxycarbonyle
BOP	hexafluorophosphate de benzotriazolyl <i>N</i> -oxytrisdiméthylaminophosphonium
COSY	«correlation spectroscopy»
Cys	cystéine
δ	déplacement chimique
d	doublet
dd	doublet doublé
DNPA	acétate de 2,4-dinitrophényle
équ.	équivalent
DIEA	diisopropyléthylamine
DMF	diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
EtOH	éthanol
FAB	«fast atom bombardment»
Fm	méthylfluorényle
Glu	acide glutamique
Gly	glycine
HATU	hexafluorophosphate de <i>O</i> -(7-aza-benzotriazol-1-yl)- <i>N, N, N', N'</i> -tétraméthyluronium
His	histidine
HOBT	1-hydroxybenzotriazole
HPLC	«high performance liquid chromatography»
IAA	acide (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-carboxylique ou acide aminé indolizidinone
IPA	isopropanol
J	constante de couplage scalaire
litt.	littérature

m	multiplet
M	molaire
MeOH	méthanol
Mer.	résine de Merrifield
MOPS	acide morpholinopropanesulfonique
NaHMDS	hexaméthylidisilane de sodium
NOE	«nuclear overhauser enhancement»
NOESY	«nuclear overhauser enhancement spectroscopy»
Paraf.	paraformaldéhyde
P. f.	point de fusion
Ph	phényle
PhF	9-(9-phénylfluorényle)
Pro	proline
réf.	référence
RMN	résonance magnétique nucléaire
s	singulet
Ser	sérine
SM	spectrométrie de masse
SMHR	spectrométrie de masse à haute résolution
t	triplet
TBTU	tétrafluoroborate de <i>O</i> -benzotriazol-1-yl- <i>N, N, N', N'</i> - tétraméthyluronium
TFA	acide trifluoroacétique
THF	tétrahydrofurane
Thr	thréonine
TMSCI	chlorure de triméthylsilane
TOCSY	«total correlation spectroscopy»
Tr	temps de rétention

Remerciements

Mes premiers remerciements sont pour le professeur William D. Lubell qui m'a permis de réaliser ce projet audacieux. Ses conseils et son approche optimiste ont été des sources de motivation tout au long de mes études graduées.

Je remercie mes collègues de laboratoire pour leur amitié et leur soutien lors des étapes difficiles. Je remercie spécialement Henry-George Lombart pour ses travaux sur la synthèse de l'acide aminé indolizidinone ainsi qu'Éric Beausoleil pour son aide en modélisation moléculaire.

J'aimerais remercier Dr J. Keillor à l'Université de Montréal ainsi que le Dr R. S. Brown à Queen's University pour leur aide lors des mesures de pKa et lors de la détermination de l'activité hydrolytique. Je remercie le Dr M. A. Poupart chez Bio-Méga/Boehringer Ingelheim pour le clivage au HF. J'aimerais remercier le Dr Tan Phan-Viet, Sylvie Bilodeau ainsi que Robert Maillé pour leur aide lors de l'analyse conformationnelle.

Je remercie le conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada pour leur soutien financier. La bourse que j'ai reçu m'a permis de réaliser mes études graduées dans un climat de sécurité.

Finalement, j'aimerais remercier tous ceux et celles qui m'ont encouragé durant ces dernières années. Merci à mes parents, mes frères, mes ami(e)s. Un merci tout spécial pour toi, Karine. Sans toi, je n'aurais probablement jamais fait cette maîtrise, merci.

CHAPITRE 1:

Introduction

1.1 Enzymes et modèles d'enzymes.

Les systèmes biologiques possèdent un grand nombre de protéines.¹ Ces molécules sont constituées d'une ou de plusieurs chaînes d'acides aminés. Les chaînes d'acides aminés adoptent des conformations particulières qui définissent la structure secondaire des protéines . Elle comprend les formes aléatoires ou organisées comme les hélices, les feuilletts et les repliements. L'organisation tridimensionnelle de la protéine en une structure tertiaire de forme globulaire qui permet le déroulement des réactions métaboliques donne naissance aux enzymes. Ces molécules sont essentielles au fonctionnement de tous systèmes biologiques.²

Les enzymes catalysent les réactions chimiques dans leur site actif. Ces crevasses renferment les caractéristiques chimiques adéquates pour faire la réaction spécifique à l'enzyme. Le site actif comprend un site de liaison incluant les résidus d'acides aminés qui fixent le substrat puis, un site catalytique composé des résidus responsables du mécanisme catalytique. Les réactions catalysées par les enzymes sont diverses. Elles incluent les ruptures de liaisons, les formations de liaisons, les transferts de groupements fonctionnels, les réactions d'oxydo/réduction et les isomérisations.

Du nombre élevé de possibilités de séquences d'acides aminés, une faible portion seulement a été sélectionnée par la nature pour agir comme protéines utiles aux organismes vivants. Les enzymes sont donc des systèmes optimisés, sélectionnés au cours de l'évolution et capables de réaliser les transformations chimiques nécessaires à la vie. Une question survient alors: Serait-il possible

d'atteindre les propriétés catalytiques des enzymes en transposant les caractéristiques chimiques de leurs sites actifs à l'intérieur de molécules simples?³ Cette question a intéressé et intéresse toujours la communauté scientifique. La construction de modèles de sites actifs est utile non seulement pour l'élaboration de nouveaux systèmes catalytiques mais aussi pour la compréhension des mécanismes enzymatiques.

Plusieurs modèles de sites actifs d'enzymes ont été conçus au cours des années. Des complexes contenant un ou plusieurs centres métalliques ont été préparés comme modèles pour l'étude des sites de coordination des métalloenzymes.⁴ D'autres sites actifs d'enzymes ont également été mimés. Par leur importance biologique, les peptidases sont des cibles de choix pour la conception de modèles de sites actifs d'enzymes.

1.2 Mimétismes de peptidases.

Les enzymes protéolytiques⁵ (peptidases ou protéases) sont impliquées dans de nombreux processus biochimiques. Leur mode d'action réside dans le clivage des liens amides des peptides et protéines aux extrémités (exo-peptidases) ou à l'intérieur (endo-peptidases) de la chaîne peptidique. Les peptidases sont classés selon leur mode d'action. Quatre classes mécanistiques sont reconnues.⁶ Ce sont les protéases à sérines, les protéases à cystéines, les protéases aspartiques et les métalloprotéases.

Les protéases à sérines constituent une des familles d'enzymes intensivement étudiées. Les protéases à sérines possèdent toutes la même géométrie de site actif avec un groupement carboxyle, un noyau imidazole puis un groupement hydroxyle grâce à la présence des résidus d'acide aspartique, d'histidine et de sérine.⁷ Le mécanisme de clivage des liens peptidiques implique la formation

d'un intermédiaire acyl-enzyme entre le substrat et l'hydroxyle de la sérine. Ce dernier agit comme nucléophile, étant activé par l'imidazole et le groupe carboxylate via un transfert de protons, pour attaquer la fonction carbonyle du lien amide et libérer l'extrémité *N*-terminale du substrat. L'acyl-enzyme est ensuite hydrolysé par une molécule d'eau afin de régénérer l'hydroxyle de la sérine et libérer l'extrémité *C*-terminale du substrat. Comme chez les protéases à sérines, le site actif des protéases à cystéines possède un environnement chimique semblable avec un noyau imidazole et un groupement thiol par la présence du résidu histidine et cystéine⁸. Le clivage pour cet enzyme implique aussi la formation d'un intermédiaire covalent où le thiol de la cystéine est acylé par le substrat. Dans les protéases à cystéines, le thiol est activé par le noyau imidazole qui agit comme base générale dans le processus de clivage.

Un petit nombre de molécules organiques bifonctionnelles avec le noyau imidazole et le groupement thiol,⁹ ainsi que des peptides cycliques contenant les résidus His et Cys,¹⁰ ont été préparés comme modèles de sites actifs des protéases à cystéines. Certains candidats ont démontrés une activité vis-à-vis l'hydrolyse d'un anilide^{9a} ou d'un ester activé^{9b} appuyant l'effet coopératif des deux groupements (imidazole et thiol) dans le mécanisme d'hydrolyse. La triade catalytique des protéases à sérines (groupement carboxylique, noyau imidazole et fonction hydroxylique) a été incorporée dans de nombreux composés modèles. Ces derniers comprennent les modèles organiques simples,¹¹ les polymères d'acides aminés,¹² les peptides linéaires¹³ et cycliques.¹⁴ Malgré que certains de ces modèles démontrent la coopération entre le noyau imidazole et le groupement hydroxyle dans l'hydrolyse d'esters activés, les résultats impliquant des peptides cycliques ne sont pas concluants tant qu'à l'effet coopératif entre ces groupes fonctionnels.

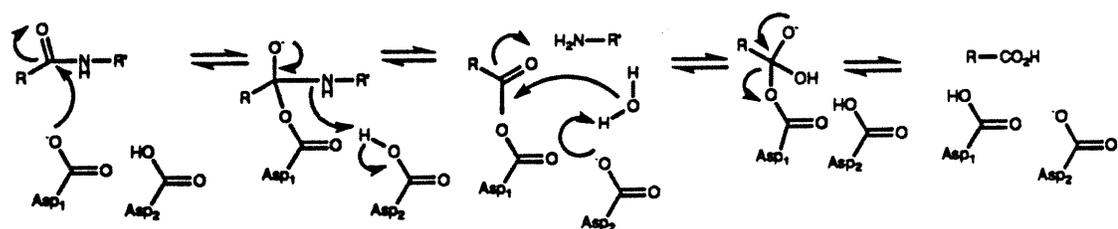
Le site actif des protéases aspartiques possède également un environnement chimique conservé. L'activité catalytique pour ces enzymes nécessite la coopération de deux groupements carboxyles grâce à deux résidus d'acide aspartique. Malgré l'importance biologique de ces enzymes, peu de modèles de leur site actif ont été conçus à travers les années.

1.3 Les protéases aspartiques.

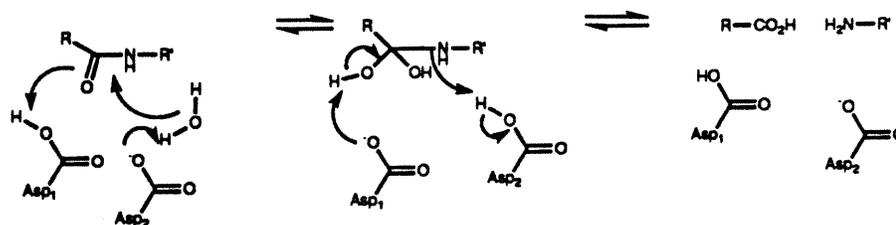
Les protéases aspartiques¹⁵ sont classées en deux catégories distinctes. La première inclue les enzymes de digestion des mammifères tels que la pepsine, la rénine et certaines protéases de champignons telle que la penicillopepsine et l'endothiapepsine. La seconde comprend les enzymes des rétrovirus tel que la protéase du HIV. Les protéases aspartiques comme la pepsine consistent en un monomère qui porte deux séquences Asp-Thr(Ser)-Gly qui sont localisées dans le site actif. La protéase du HIV est un homodimère dont chaque monomère possède une séquence Asp-Thr(Ser)-Gly distincte. Dans les deux cas, le site actif est situé dans une poche profonde qui possède deux groupements carboxyliques disposés de part et d'autre du site actif.

Les caractéristiques du site actif des protéases aspartiques sont connues. La structure cristallographique du site actif de l'endothiapepsine à pH = 4,5 a été déterminée par l'analyse rayon-X à haute résolution.¹⁶ Le site actif de cet enzyme possède une symétrie C₂ laissant des environnements semblables aux deux groupes carboxylates essentiels à l'activité catalytique. Une distance d'environ 2,9 Å est observée entre les oxygènes des carboxylates voisins. Cette proximité indique qu'un proton peut être lié entre les deux carboxylates. Les groupes carboxyles sont liés par des ponts hydrogènes et sont en contact de façon équivalente avec une molécule d'eau. Des valeurs de pKa anormalement basse de ≈2 et anormalement haute de ≈5 sont observées pour les deux acides carboxyliques. Ces valeurs de pKa sont à la source de la forme de cloche («bell-shaped») qui décrit l'activité catalytique en fonction du pH chez les protéases aspartiques.¹⁷

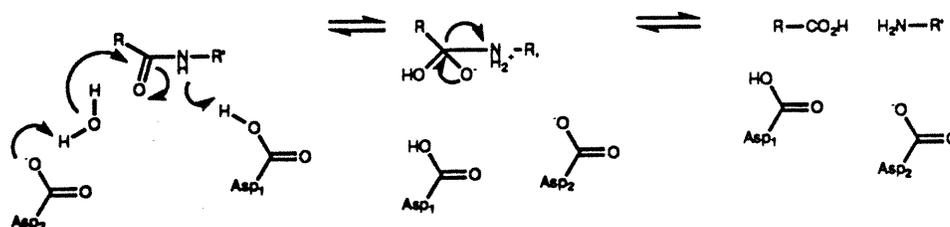
Plusieurs mécanismes ont été proposés pour l'hydrolyse des liens amides par les protéases aspartiques. Ils sont divisés en deux catégories: l'hydrolyse via une attaque nucléophile directe de l'un des groupes carboxylates ou via une catalyse par un mécanisme acide général/base générale impliquant une molécule d'eau (Figure 1, p. 5). Le mécanisme par l'attaque nucléophile a été longuement accepté pour la protéolyse.¹⁸ De plus en plus d'évidences supportent le mécanisme d'hydrolyse par une molécule d'eau assistée par les carboxylates comme acide général/base générale.¹⁹



Mécanisme nucléophile



Mécanisme acide général/base générale avec intermédiaire neutre

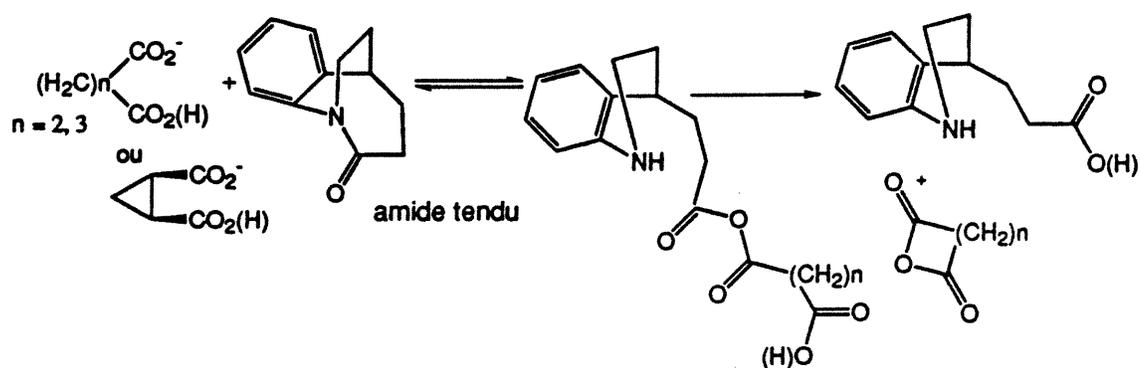


Mécanisme acide général/base générale avec intermédiaire zwitterion

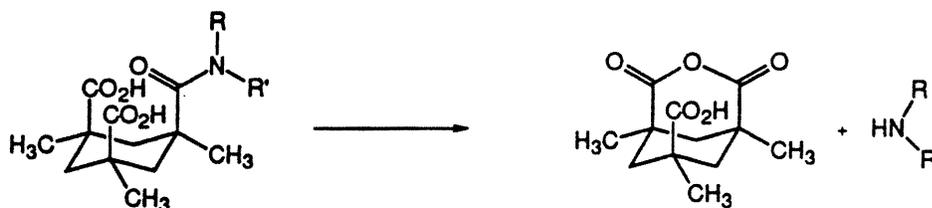
Figure 1: Mécanismes possibles pour l'hydrolyse des liens amides par les protéases aspartiques.

Peu de modèles du site actif des protéases aspartiques sont rapportés dans la littérature. Certains diacides pouvant former des anhydrides cycliques sont

efficaces pour activer l'hydrolyse d'un amide tendu (Figure 2a, p. 6).²⁰ Il est démontré que cette réaction procède via un mécanisme nucléophile. D'autres exemples dérivés du triacide de Kemp²¹ démontrent une augmentation du taux d'hydrolyse d'amides via acylation intramoléculaire (Figure 2b, p. 6).²²



(a)



(b)

Figure 2: Modèles des protéases aspartiques.

Malgré l'intérêt grandissant pour les protéases aspartiques, la littérature manque de composés modèles pour les sites actifs des protéases aspartiques. L'élaboration de nouveaux modèles de site actif incorporant deux acides carboxyliques à proximité est important non seulement pour la préparation de nouveaux catalyseurs mais aussi pour l'étude mécanistique de l'hydrolyse.

1.4 Nouveau modèle pour le site actif des protéases aspartiques.

De nouveaux catalyseurs peuvent être générés par la construction de peptides cycliques, incorporant des acides aminés naturels et conformationnellement restreints, dans l'objectif de mimer les aspects structuraux des sites actifs d'enzymes. Au meilleur de nos connaissances, seulement deux exemples de ce type sont présents dans la littérature. Dans le premier, les résidus Ser, His et Asp ont été combinés au résidu Aba (résidu de l'acide 3-aminobenzoïque) pour mimer le site actif des protéases à sérines (Figure 3a, p. 7).^{14a} L'accélération de l'hydrolyse de l'acétate de 4-nitrophényle est démontrée pour ce peptide. L'autre exemple incorpore les fonctions imidazole, hydroxyle et amide dans un peptide rigidifié par des unités piperazin-2-one dans le but de mimer le site actif des lipases (Figure 3b, p. 7).²³ Aucune activité n'est rapportée pour ce peptide jusqu'à maintenant.

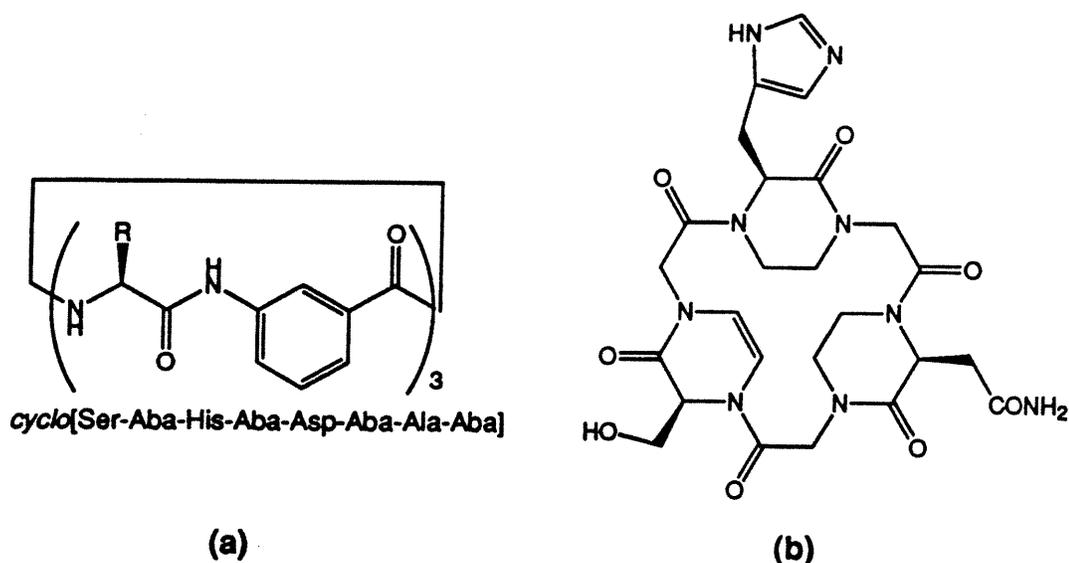


Figure 3: Peptides conformationnellement restreints comme modèles de sites actifs d'enzymes.

Dans ce projet de recherche, un nouveau peptide cyclique, le *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1, figure 4, p. 8), est conçu pour agir comme mimétisme des protéases aspartiques. Ce peptide incorpore deux résidus d'acide aspartique et deux résidus d'acide aminé indolizidinone (IAA) qui consiste en un mimétisme rigide d'un dipeptide hydrophobe.²⁴ Ce peptidomimétisme fait partie de la famille des acides aminés azabicyclo[X.Y.0]alcanes qui sont conçus pour induire des repliements dans les chaînes peptidiques.²⁵ Pour cette étude, les résidus IAAs sont utilisés pour restreindre la conformation du peptide cyclique dans l'objectif de placer à proximité les groupes carboxyles des résidus d'acide aspartiques. De cette façon, les aspects structuraux du site actif des protéases aspartiques peuvent être mimés.

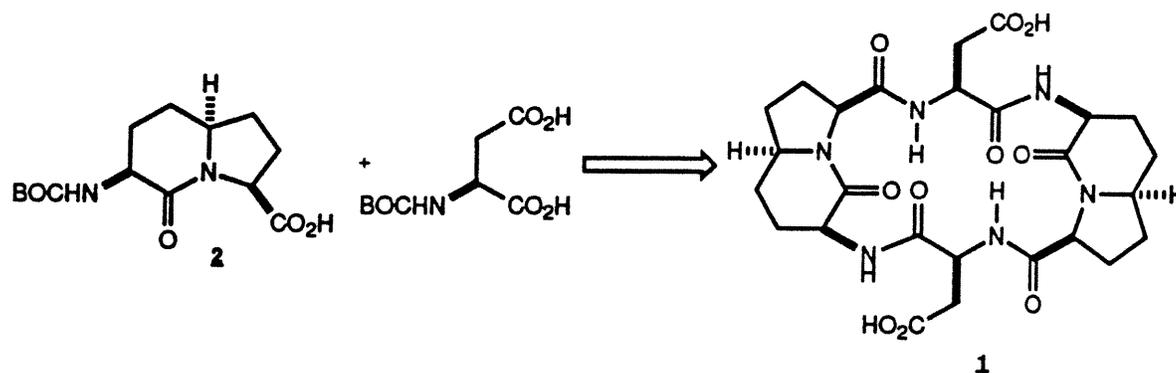


Figure 4: *Cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1) comme mimétisme du site actif des protéases aspartiques.

L'objectif de ce travail de recherche est la synthèse et la caractérisation du *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1). Une étude de modélisation moléculaire est présentée pour évaluer le potentiel du peptide 1 à agir comme modèle du site actif des protéases aspartiques. La synthèse énantio pure de l'acide aminé indolizidinone 2 et son incorporation dans le peptide cyclique 1 via une technique en solution est décrite. Une synthèse générale sur support solide est développée pour l'élaboration future d'une bibliothèque de peptides cycliques analogues. Finalement, une analyse conformationnelle et une investigation des caractéristiques physico-chimiques sont présentées pour déterminer le potentiel du *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1) à agir comme mimétisme des protéases aspartiques.

CHAPITRE 2:

Modélisation moléculaire

Une expérience de modélisation moléculaire est faite pour déterminer la conformation d'énergie minimale du *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1). Une structure de départ plane est dessinée avec une fonction carboxylate protonée et l'autre associée à un ion sodium. Cette forme est choisie pour étudier la conformation du peptide 1 lorsqu'un seul proton est installé au niveau des carboxylates. Cet état de protonation reproduit les caractéristiques du site actif des aspartates protéases (voir section 1.3). La structure de départ est minimisée en énergie avant d'être soumise à une recherche conformationnelle par la méthode MonteCarlo.^{26,27} Le logiciel Macromodel version 4.5²⁸ est utilisé conjointement avec le champ de force AMBER²⁹ possédant un modèle continu pour l'eau comme solvant.³⁰ Les détails de l'expérience sont mentionnés à la section expérimentale (voir section 8.2).

La recherche MonteCarlo du peptide cyclique 1 permet de conserver un total de 143 structures dans 50 kJ/mol du minimum global (voir rapport final de modélisation à l'annexe XIV et XV). Les structures générées sont classées en 72 conformères différents. Ces derniers sont analysés directement sans minimisation supplémentaire. Deux conformations distinctes possédant la même énergie potentielle sont associées aux minima globaux de la recherche conformationnelle. Ces conformères sont retrouvées 11 et 13 fois lors de la recherche stochastique. Par leur basse énergie et par leur grande fréquence d'apparition, ces deux conformations sont considérées comme les structures les plus probables pour le *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1).

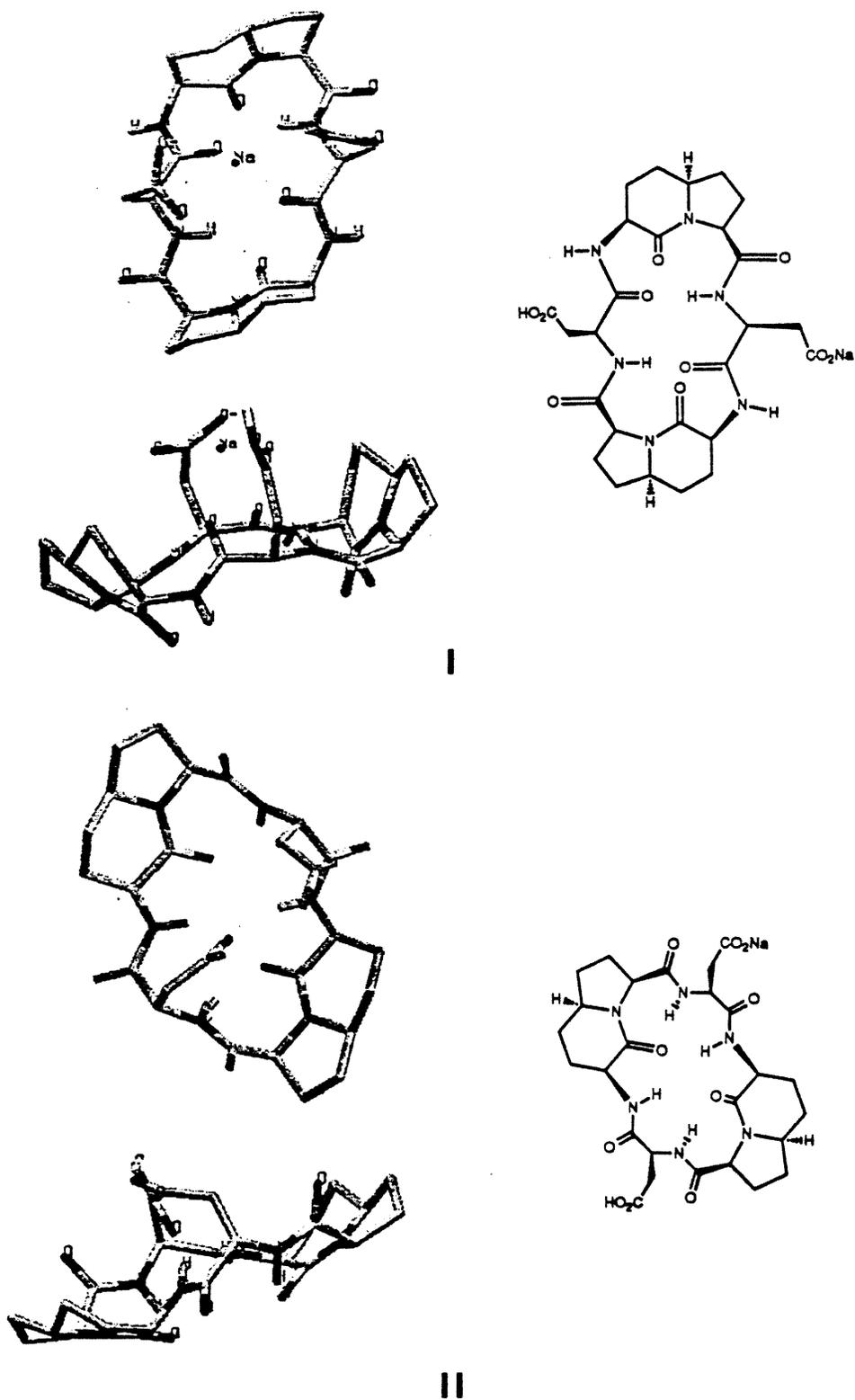


Figure 5: Minima globaux de la recherche MonteCarlo.

Les structures des minima globaux (I et II) sont représentées à la figure 5 (p. 11). Dans ces représentations, seuls les protons amides et les protons des acides carboxyliques sont présents pour plus de clarté. Dans les deux cas, le peptide cyclique est caractérisé par une structure concave. Cette forme particulière est rendue possible par l'orientation des cycles des résidus IAAs qui courbent vers l'intérieur du peptide. Dans le minimum I, les protons amides des résidus IAAs sont orientés vers l'extérieur du cycle peptidique tandis que les protons amides des résidus d'acide aspartique sont orientés vers l'intérieur. De plus, dans ce conformère, l'ion sodium est bien installé entre les groupes carboxyles. Dans le minimum II, tous les protons amides sont orientés vers l'intérieur du macrocycle. Pour ce minimum, l'ion sodium est rejeté pour créer une charge négative nette au niveau des groupes carboxyliques. Les deux conformations orientent les chaînes latérales des résidus d'acide aspartique de façon à placer les groupes carboxyles au-dessus du cycle et face à face.

L'analyse des ponts hydrogènes intramoléculaires est importante pour caractériser la conformation du peptide 1. Les distances entre les oxygènes et les protons des liens amides pointant à l'intérieur du cycle ainsi que leur orientation dans l'espace peut donner des indications sur la présence de ponts hydrogènes entre les résidus. Dans le minimum I, les protons et les oxygènes des fonctions amides des résidus d'acide aspartique sont séparés de 2,28 et 2,74 Å. La proximité de ces fonctions et leur alignement dans l'intérieur du cycle permet de croire en l'existence de deux ponts hydrogènes intramoléculaires entre ces deux résidus. Dans le minimum II, tous les protons amides peuvent être impliqués dans des ponts hydrogènes avec, comme accepteurs, les oxygènes des fonctions amides des résidus IAAs. D'autre part, dans les deux conformères, à cause de l'orientation et la mobilité potentielle des chaînes latérales des résidus d'acide aspartique, les groupes carboxyliques peuvent agir comme accepteurs pour créer un patron plus complexe de ponts hydrogènes intramoléculaires.

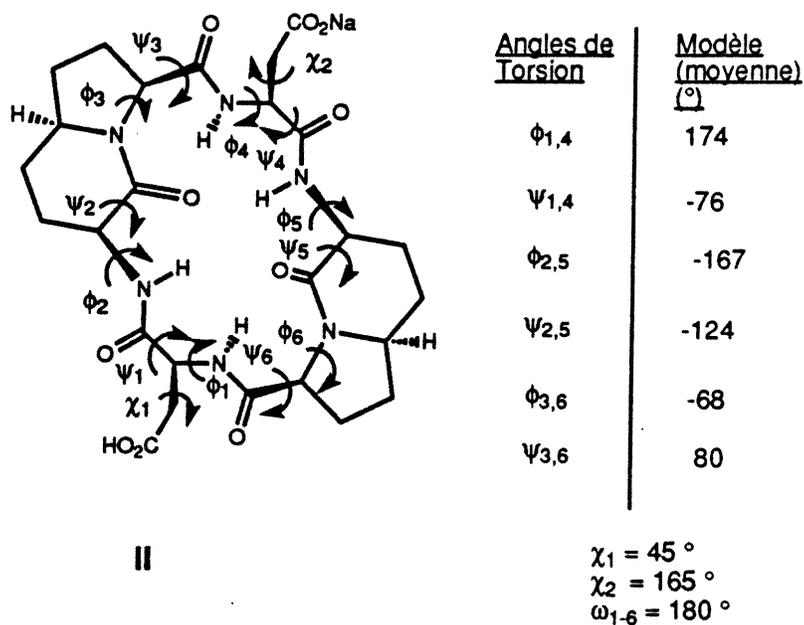
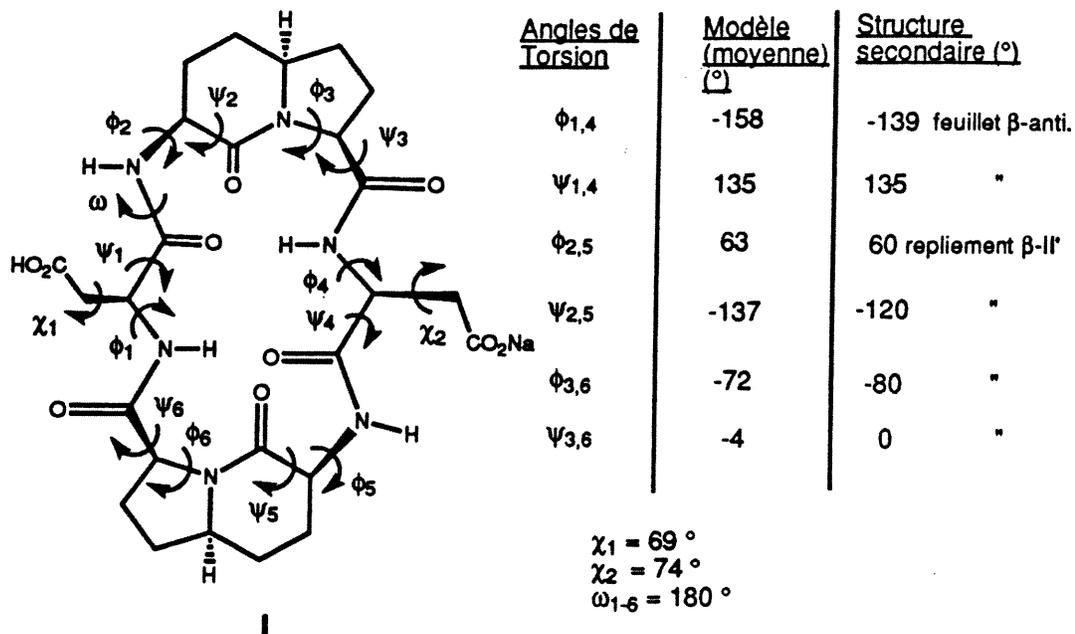


Figure 6: Angles dièdres des minima d'énergie de l'analyse MonteCarlo.

Les valeurs des angles dièdres moyens (ϕ , ψ) des minima d'énergie sont représentées à la figure 6 (p. 13). Des différences de moins de 10° sont observées pour les angles de chaque couple de résidus ($\phi_n \approx \phi_{n+3}$, $\psi_n \approx \psi_{n+3}$, $\chi_1 \approx \chi_2$). Une symétrie C_2 est donc observée pour les modèles du peptide cyclique 1. Une telle symétrie a été observée expérimentalement dans plusieurs hexapeptides cycliques du type *cyclo*[Xxx-Pro-Gly-Yyy-Pro-Gly] où Xxx=Yyy.³¹

Les valeurs des angles dièdres (ϕ , ψ) pour le minimum I peuvent être comparées aux angles dièdres des structures secondaires connues (Figure 6, p. 13).^{32,33} Les valeurs des angles ϕ , ψ pour les résidus $i + 1$ et $i + 2$ du repliement bêta de type II' sont respectivement 60° , -120° et -80° , 0° . Par comparaison, les valeurs moyennes des angles ϕ , ψ des IAAs sont de 62° , -137° et -72° , -4° . Les résultats de la modélisation supportent théoriquement que le IAA peut induire des repliements bêta de type II' lorsqu'il est incorporé dans des peptides cycliques. D'autre part, les valeurs moyennes des angles dièdres ϕ et ψ pour les résidus d'acides aspartiques sont respectivement -158° et 135° . Ces valeurs sont très semblables à celles rencontrées dans un feuillet plissé antiparallèle qui sont -139° et 135° pour ϕ et ψ . Les angles dièdres dans le minimum II ne sont pas comparables aux angles des structures secondaires connues. Dans ce dernier, les résidus IAAs sont placés aux positions i et $i + 1$ d'un repliement tordu qui ne s'apparente pas aux structures secondaires connues.

Le positionnement des chaînes latérales des résidus d'acide aspartique est un facteur essentiel pour mimer les caractéristiques des protéases aspartiques. Des angles dièdres χ de 69° et 74° sont observés pour le minimum I du peptide 1. Ces angles correspondent à une conformation du peptide qui oriente les chaînes latérales symétriquement vers l'intérieur du cycle. Dans le minimum II, les chaînes sont positionnées asymétriquement de part et d'autre avec des angles χ de 45° et 165° . Ces résultats doivent être interprétés avec précaution puisque les chaînes latérales des résidus d'acide aminés sont considérées comme flexibles. Toutefois, dans les deux conformations, les chaînes sont orientées préférentiellement au-dessus du cycle procurant une proximité aux deux groupes carboxyles.

Selon la recherche MonteCarlo, deux conformations différentes sont possibles pour le peptide cyclique 1 en solution . Un des conformères est caractérisé par deux repliements bêta de type II' qui sont séparés par un feuillet plissé antiparallèle minimum. D'autre part, la conformation du second minimum ne s'apparente pas aux structures secondaires connues. Les deux conformations sont caractérisées par une structure compacte qui positionne les chaînes latérales des résidus d'acide aspartique au-dessus du cycle procurant une proximité entre les deux groupes carboxyles. Ce positionnement est essentiel pour imiter les caractéristiques du site actif des protéases aspartiques.

CHAPITRE 3

Synthèse en solution

3.1 Préparation de l'acide (3*S*, 6*S*, 9*S*)-2-oxo-3-*N*-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylique (BOC-IAA-OH, 2).

La synthèse de l'acide aminé azabicyclique 2 énantiopure implique une séquence de condensation de Claisen/amination réductive/lactamisation à partir du (2*S*)-*N*-9-(9-PhF)glutamate de α -*tert*-butyle- γ -méthyle (6).²⁴ Cette stratégie est intéressante puisque l'acide glutamique de départ est peu coûteux et les étapes synthétiques sont simples.

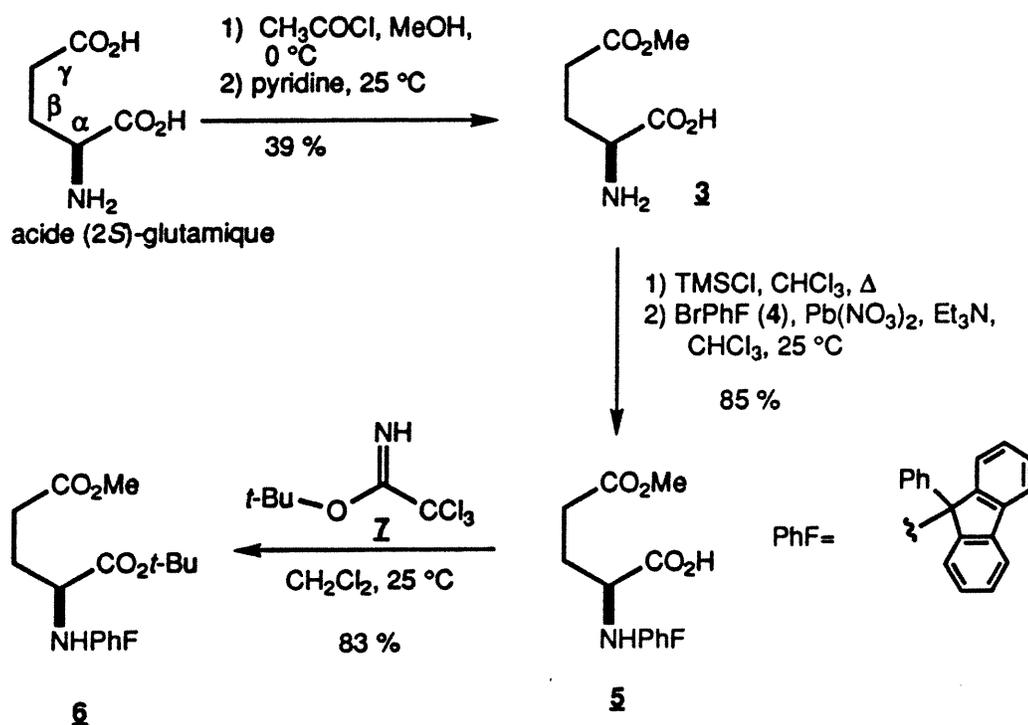


Schéma 1: Synthèse du (2*S*)-*N*-9-(9-PhF)glutamate de α -*tert*-butyle- γ -méthyle (6).

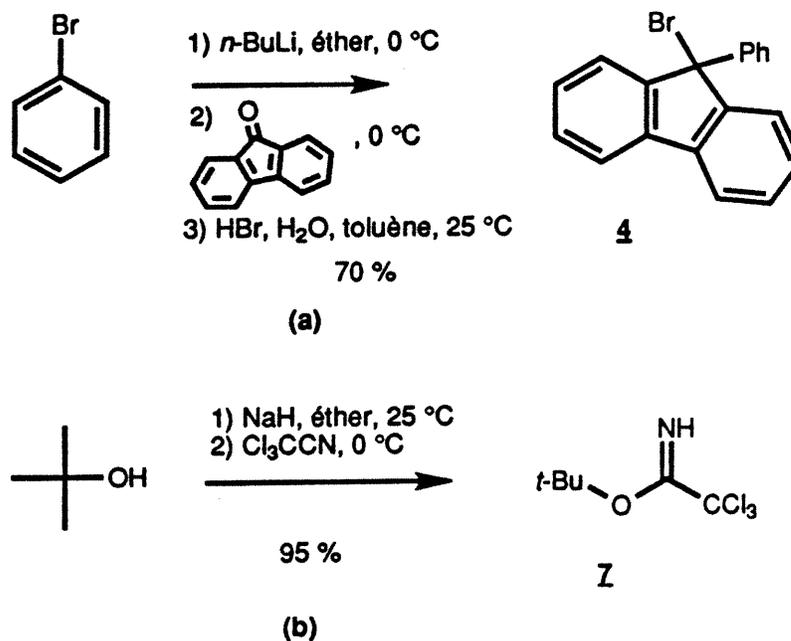


Schéma 2: (a) Préparation du BrPhF (4). (b) Préparation du trichloroacétimidate de *tert*-butyle (7).

Trois groupes protecteurs différents sont premièrement installés sur l'acide (2*S*)-glutamique. (Schéma 1, p. 16). Dans le méthanol en milieu acide, l'acide (2*S*)-glutamique γ -méthyl ester (3) est obtenu sélectivement avec un rendement de 39 % après recristallisation.³⁴ L'amine est ensuite protégé avec le bromure de PhF 4 pour donner l'acide (2*S*)-*N*-9-(9-PhF)glutamique- γ -méthyl ester (5) avec un rendement de 85 % après recristallisation.³⁵ L'installation du groupe phénylfluorényle procède en deux étapes via la protection temporaire de la fonction acide en α par l'ester de triméthylsilyle et par l'attaque nucléophile de

l'amine sur le carbone porteur du brome. Le BrPhF (4) est préparé à partir du bromobenzène et de la fluorénone avec un rendement de 70 % après recristallisation (Schéma 2a, p. 17).³⁶ Ce groupe protecteur très volumineux est choisi pour prévenir la racémisation qui peut se produire au niveau du carbone en α .³⁷ Finalement, le (2*S*)-*N*-9-(9-PhF)glutamate de α -*tert*-butyle- γ -méthyle (6) est formé par l'attaque nucléophile de l'acide en position α sur le trichloroacétimide de *tert*-butyle (7) avec un rendement de 83 % après chromatographie.³⁸ L'imidate 7 est préparé avec un rendement de 95 % à partir de l'alcool *tert*-butylique et du trichloroacétonitrile (Schéma 2b, p. 17).³⁹

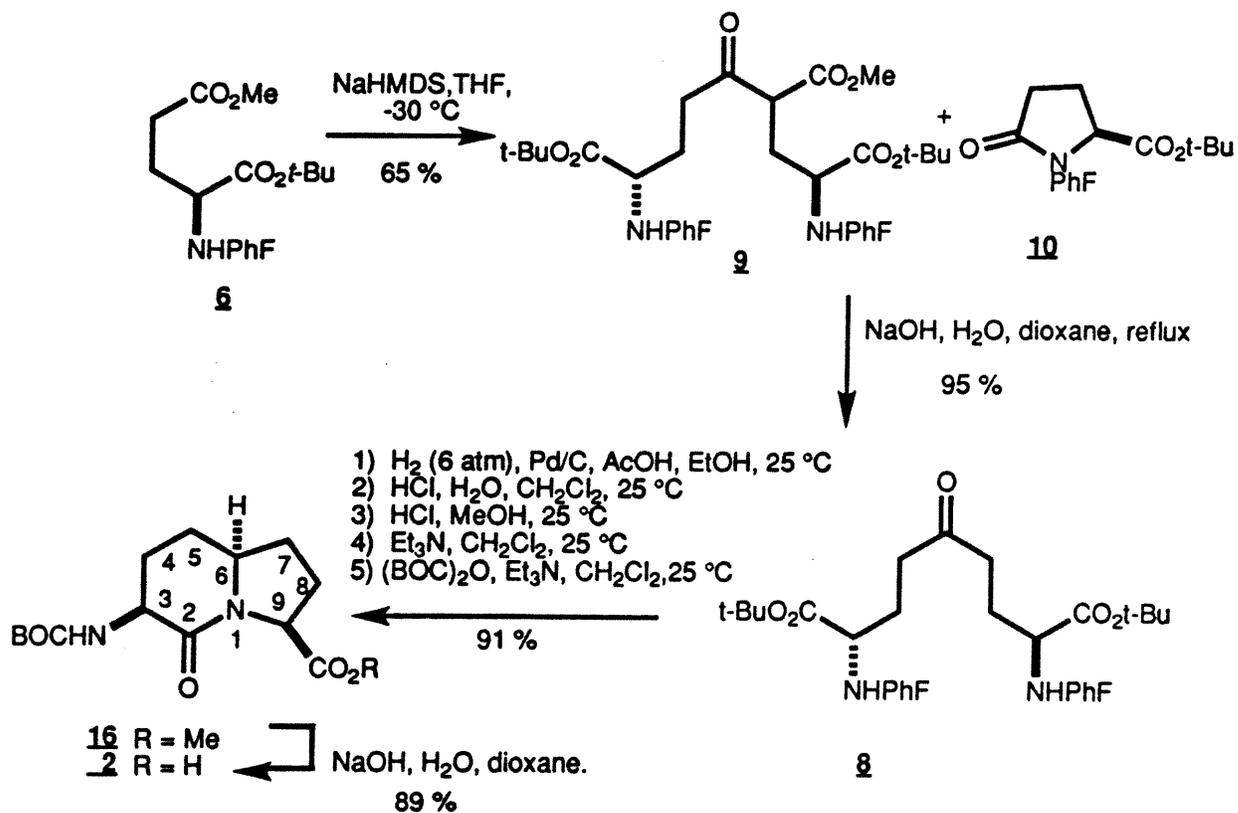


Schéma 3: Synthèse de l'acide (3*S*, 6*S*, 9*S*)-2-oxo-3-*N*-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxyllique (BOC-IAA-OH, 2).

Le glutamate protégé **6** est ensuite soumis à une condensation de Claisen puis à une réaction d'hydrolyse/décarboxylation pour conduire au (2*S*, 8*S*)-5-oxo-2,8-di-*N*-9-(9-PhF)amino azélate de di-*tert*-butyle **8** (Schéma 3, p. 18).²⁴ La réaction de Claisen pour obtenir le β-cétoester **9** se produit à -30 °C par l'addition lente de NaHMDS sur une solution du glutamate **6** avec un rendement de 65 % après chromatographie. Le produit secondaire de la réaction est le pyroglutamate **10** (25 %) qui se forme par la cyclisation intramoléculaire de l'azote sur l'ester méthylique en milieu basique. Le mélange diastéréomérique du β-cétoester **9** est par la suite transformé à la cétone symétrique **8** par une réaction d'hydrolyse/décarboxylation avec un rendement de 95 % après chromatographie.

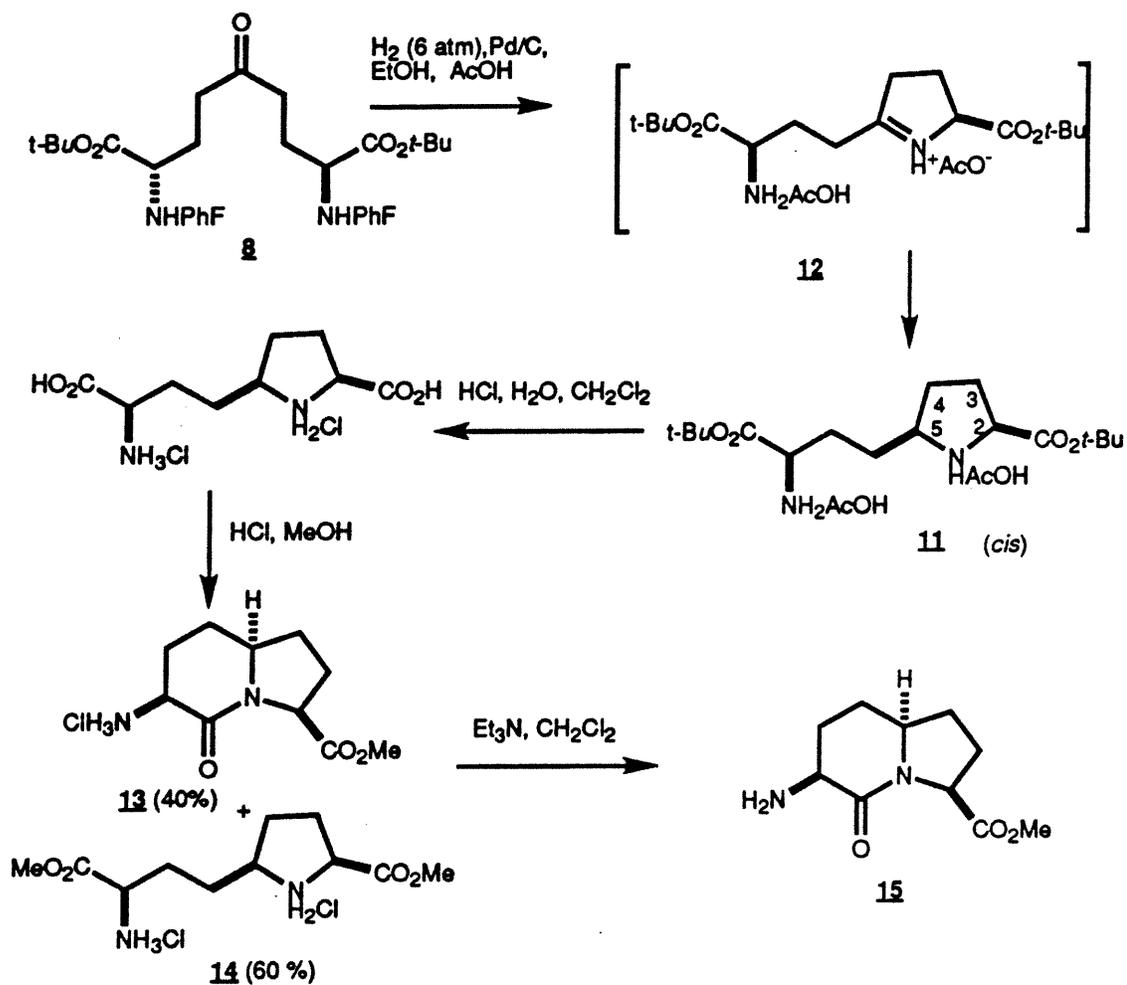


Schéma 4: Étapes de cyclisation de la cétone symétrique **8**.

La cyclisation finale pour conduire à l'acide (3*S*, 6*S*, 9*S*)-2-oxo-3-*N*-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylique **2**, à partir de la cétone **8**, consiste en une séquence de six étapes simples avec un rendement global de 91 % (Schéma 3 et 4, p. 18 et 19). Les cinq premières étapes ne requièrent aucun traitement des produits des réactions mis à part l'évaporation des solvants. L'hydrogénation catalytique de la cétone **8**, en présence d'acide acétique et sous six atmosphères d'hydrogène, produit le 5-alkylproline **11**, sans PhF, par la formation et réduction de l'imminium **12**. La réduction est stéréosélective pour conduire principalement à l'isomère *cis* du 5-alkylproline **11**. Les esters *tert*-butyliques sont hydrolysés en milieu acide puis remplacés par des esters méthyliques pour favoriser la cyclisation intramoléculaire. Un mélange 40:60 du bicyclic **13** et de l'alkylproline **14** est obtenu. La composition de ce mélange à l'équilibre peut être évalué par RMN de ¹H après avoir directement évaporé un échantillon du mélange réactionnel. Les deux signaux singulets des esters méthyliques de l'alkylproline **14** apparaissent à 3,83-3,88 ppm, dans le CD₃OD, tandis que le signal singulet de l'ester méthylique du bicyclic **13** apparaît à 3,71 ppm dans le même solvant. La cyclisation de l'alkylproline **14** est achevée en soumettant le mélange à un excès de triéthylamine pour créer les bases libres des fonctions amines. Cette réaction est suivie par RMN de ¹H. Une réaction complète se traduit par la présence d'un seul pic singulet à 3,71 ppm, dans le CD₃OD, qui correspond à l'ester méthylique **15**. Le groupement BOC est ensuite installé sur l'amine avec le (BOC)₂O comme réactif en présence de triéthylamine. Après chromatographie, l'ester méthylique **16** est hydrolysé avec un léger excès de NaOH, dans un mélange 1:1 d'eau et de dioxane, pour conduire à l'acide (3*S*, 6*S*, 9*S*)-2-oxo-3-*N*-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylique (BOC-IAA-OH, **2**). L'assignation de la stéréochimie 3*S*, 6*S*, 9*S* de **2** est basée sur la comparaison des déplacements chimiques et de la multiplicité des signaux en RMN de ¹H dans le CDCl₃ avec ceux publiés dans la littérature.²⁴ Ces derniers sont supportés par les différents couplages dipolaires (effets NOE) par une structure cristallographique de l'ester méthylique **16**. La pureté énantiomérique n'a pas été déterminée lors de cette synthèse puisqu'une pureté supérieure à 99 % a été trouvée lors de la synthèse précédente.²⁴

3.2 Synthèse en solution du *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp], (1).

Le succès de la condensation d'acides aminés en solution a été démontré bien avant l'apparition des techniques sur support solide. Pour des fins pratiques, des synthèses de petits peptides linéaires et cycliques sont encore réalisées en solution. Par exemple, la préparation d'hexapeptides cycliques du type *cyclo*[Xxx-Yyy-Zzz]₂ a été réalisée avec succès par la condensation de tripeptides et cyclisation en solution.⁴⁰ Par analogie, la préparation du *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1) a donc été envisagée en solution.

Une voie convergente est utilisée pour la préparation du peptide cyclique 1. La stratégie implique la formation du dipeptide IAA-Asp, dimérisation du dipeptide puis cyclisation du térapeptide résultant. La fonction BOC est utilisée comme groupe protecteur des fonctions amines. L'ester allylique et l'ester benzylique sont choisis respectivement comme groupes protecteurs des fonctions acides en α et β de l'acide aspartique. Tous ces groupes protecteurs sont sélectionnés pour être enlevés indépendamment sans affecter les autres groupes. L'ester allylique est utilisé au lieu de l'ester de méthylfluorényle (OFm) afin d'éviter l'épimérisation du centre en α associée à ce dernier.⁴¹

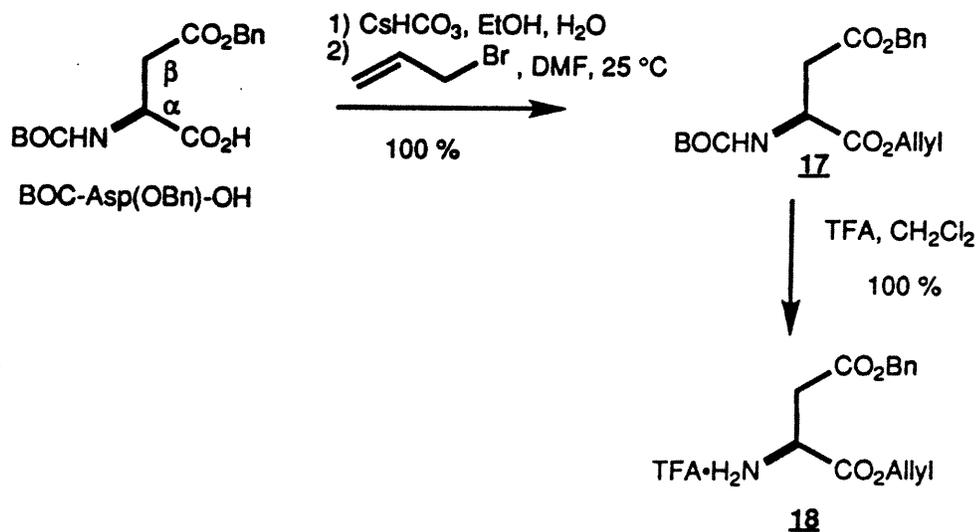


Schéma 5: Préparation du TFA·H₂N-Asp(OBn)-OAllyl (18).

La préparation du TFA·H₂N-Asp(OBn)-OAllyl (**18**) nécessite une étape de formation de l'ester allylique et une étape de déprotection du groupement BOC à partir du BOC-Asp(OBn)-OH commercialement disponible (Schéma 5, p. 22). La formation de l'ester allylique procède par la préparation préalable du sel de césium du BOC-Asp(OBn)-OH.⁴² Le sel de césium est ensuite traité avec du bromure allylique, dans le DMF, pour conduire quantitativement à l'allyl ester **17** après une simple filtration et évaporation du solvant.⁴³ La force motrice de la réaction est la précipitation du CsBr. Le groupe BOC est enlevé quantitativement en présence d'un excès de TFA dans le dichlorométhane pour conduire au TFA·H₂N-Asp(OBn)-OAllyl (**18**).

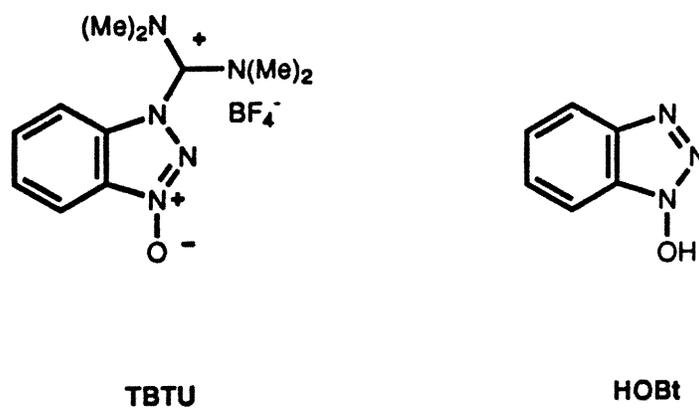


Figure 7: Structures du TBTU et du HOBt.

Pour la synthèse peptidique, l'absence de réactions secondaires, des temps de réaction courts et une réduction de l'épimérisation des centres en α des fonctions acides activées sont des caractéristiques importantes pour un réactif de couplage idéal. L'apparition des dérivés de l'hydroxybenzotriazole (HOBt, Figure 7, p. 23) tels que les dérivés phosphonium (BOP⁴⁴, etc.) ou guanidinium (TBTU⁴⁵, etc., Figure 7, p. 23) ont permis d'augmenter l'efficacité des couplages peptidiques en limitant les problèmes énumérés ci-hauts. Dans la préparation du *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1), les couplages en solution sont réalisés avec du TBTU et la cyclisation finale avec un mélange de TBTU et HOBt conjointement avec la triéthylamine et la DIEA comme bases tertiaires.

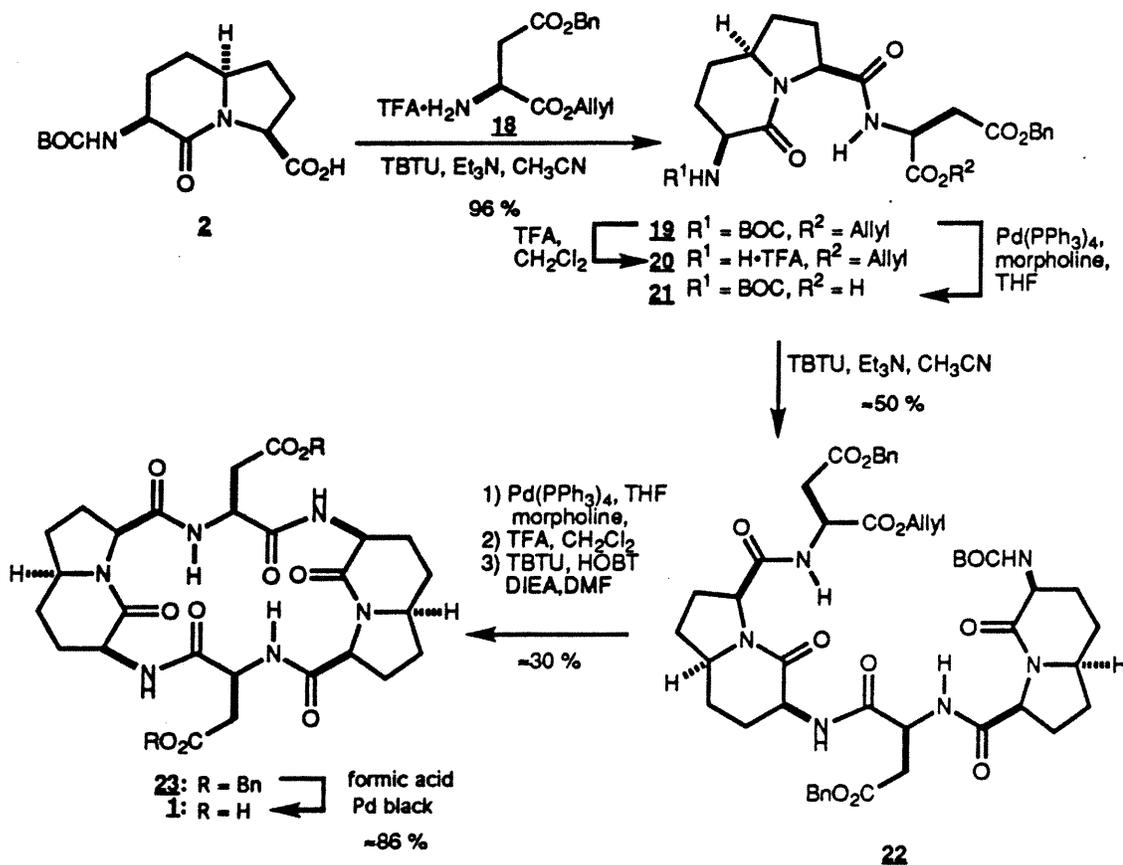


Schéma 6: Synthèse en solution du cyclo[IAA-Asp-IAA-Asp] (1).

La formation du dipeptide BOC-IAA-Asp(OBn)-OAllyl (19) est la seconde étape pour la synthèse en solution du cyclo[IAA-Asp-IAA-Asp] (1, Schéma 6, p. 24). Le BOC-IAA-OH (2) est couplé au TFA·H₂N-Asp(OBn)-OAllyl (18) en présence de triéthylamine et de TBTU, dans l'acétonitrile, avec un rendement de 96 % sans purification sur colonne.⁴⁵ La pureté diastéréomérique du dipeptide peut être évaluée qualitativement par RMN de ¹H et de ¹³C. Par la singularité des

signaux RMN, il est possible d'affirmer que la présence d'épimère est négligeable et ce malgré l'utilisation d'une base stériquement peu encombrée comme la triéthylamine. Par exemple, le signal du proton amide à 7,6 ppm (voir annexe xLvi), qui se trouve à proximité du centre racémisable, n'est pas accompagné d'un pic secondaire. Ce résultat démontre l'efficacité du réactif de couplage TBTU, conjointement avec la triéthylamine comme base, pour les couplages peptidiques impliquant le BOC-IAA-OH (2).

Les déprotections du dipeptide BOC-IAA-Asp(OBn)-OAllyl (19) aux extrémités *N*- et *C*-terminales sont réalisées indépendamment après avoir divisé le matériel en deux portions égales (Schéma 6, p. 24). Le traitement de l'une des moitiés avec un excès de TFA dans du dichlorométhane conduit au TFA·H₂N-IAA-Asp(OBn)-OAllyl (20). La déprotection de l'ester allylique nécessite une catalyse par un métal tel que le Pd⁰ dans un milieu nucléophile. Dans notre cas, l'ester allylique est déprotégé avec une quantité catalytique de Pd(PPh₃)₄ en présence d'un excès de morpholine dans le THF pour obtenir le BOC-IAA-Asp(OBn)-OH (21) avec un haut rendement.⁴³

Le couplage des dipeptides TFA·H₂N-IAA-Asp(OBn)-OAllyl (20) et BOC-IAA-Asp(OBn)-OH (21) est réalisé en utilisant les mêmes conditions que le couplage précédent (Schéma 6, p. 24).⁴⁵ Par contre, l'obtention du BOC-IAA-Asp(OBn)-IAA-Asp(OBn)-OAllyl (22) est obtenue avec un rendement de 50 %. La haute tendance à l'émulsion est un problème important du traitement du produit de cette étape de dimérisation. Cette difficulté peut expliquer en partie la perte de rendement mais aucune preuve n'est disponible pour expliquer rationnellement ce faible résultat.

Les déprotections du térapeptide 22 aux extrémités *C*- et *N*-terminales sont réalisées selon les protocoles décrits ci-haut (Schéma 6, p. 24). La cyclisation est réalisée dans le DMF avec une faible concentration en peptide (1,5 mM) afin d'éviter les couplages intermoléculaires. Un excès de TBTU (3 équ.) et de HOBT (3 équ.) est utilisé avec un large excès de DIEA (6 équ.).⁴⁶ Les étapes de déprotection et de cyclisation permettent d'obtenir le *cyclo*[IAA-Asp(OBn)-IAA-Asp(OBn)] (23) avec un rendement de 30 % après purification du peptide brut par HPLC semi-préparatif en phase inversée sur colonne C-18. Dans les

mêmes conditions, le rendement obtenu est comparable aux rendements de cyclisation de différents hexapeptides rapportés dans la littérature.⁴⁶

L'enlèvement des groupes benzyles est la dernière étape pour l'obtention du peptide cyclique **1**. Une hydrogénation catalytique avec le Pd/C en présence d'hydrogène gazeux peut être susceptible de former des produits secondaires tel que le dérivé imide cyclique.⁴⁷ Pour cette raison, un clivage par hydrogénation catalytique de transfert de phase est utilisé.⁴⁸ Le peptide cyclique protégé **23** est traité avec une quantité catalytique de Pd réduit et un excès d'acide formique dans le méthanol pour conduire au peptide cyclique déprotégé **1**. Malgré cette précaution, certains produits secondaires non-identifiés sont détectés par l'analyse HPLC du produit brut de la réaction. Après purification par HPLC semi-préparatif en phase inversée sur colonne C-18, le *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (**1**) est obtenu avec un rendement de 85 %.

Le *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (**1**) est préparé avec succès utilisant une stratégie en solution. Un rendement global de 10 % est obtenu à partir du TFA·H₂N-Asp(OBn)-OAllyl (**18**) et du BOC-IAA-OH (**2**). Ce rendement modeste pourrait être augmenté en optimisant certaines étapes plus problématiques que d'autres. Ceci n'est pas fait puisque, malgré cette réussite, le temps de préparation du peptide cyclique en solution est long et les étapes de traitement des produits sont assez laborieuses. De plus, cette stratégie en solution est limitée à la synthèse d'un seul peptide à la fois. Ceci est peu intéressant puisque l'extension de ce projet nécessite la préparation de plusieurs peptides analogues au peptide **1**. Cela est possible par une technique de synthèse combinatoire qui est plus facilement réalisable par l'utilisation de supports polymériques. Le prochain chapitre décrit une méthode de synthèse du *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (**1**) sur support solide.

CHAPITRE 4

Synthèse sur support solide

4.1 Revue de la littérature et stratégie.

La synthèse sur supports solides est devenue la méthode de choix pour la préparation de peptides. Depuis la première utilisation par Merrifield et son équipe,⁴⁹ la synthèse sur support solide a évolué de façon dramatique.⁵⁰ L'apparition des nouveaux schémas de protection des acides aminés, le développement des réactifs de couplage plus performants et l'avancement considérable des techniques de purification par HPLC sont des facteurs qui ont permis d'étendre le champ d'application de la synthèse de peptides sur support solide.

L'intérêt grandissant pour les peptides cycliques homodétiques a permis le développement de nouvelles techniques de synthèse sur support solide pour leur préparation.⁵¹ La plus intéressante consiste à coupler les acides aminés et à cycliser le peptide tout en gardant celui-ci fixé au support polymère.^{52,53} Cette méthode est employée pour la synthèse de peptides cycliques incorporant, entre autres, le résidu d'acide aspartique. La technique consiste à créer un lien covalent temporaire entre le support polymère et l'acide carboxylique en β de la chaîne latérale de l'acide aspartique ayant les fonctions en α protégées. Après déprotection de la fonction amine, les acides aminés sont couplés puis le peptide est cyclisé après déprotection des extrémités *N* - et *C* -terminales.

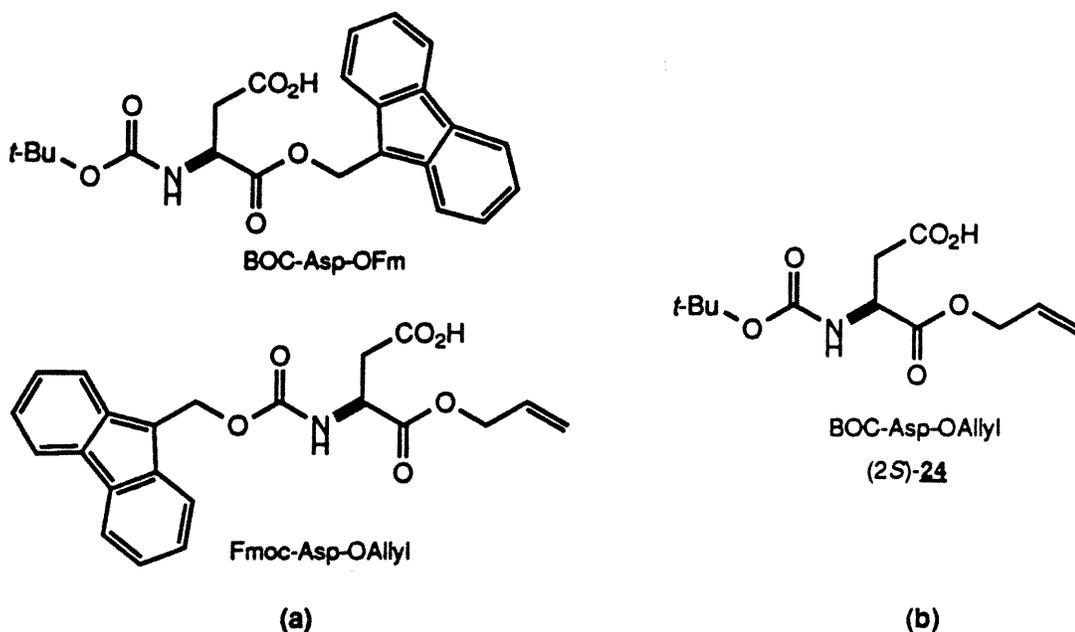


Figure 8: Schémas de protection de l'acide aspartique (a) connus et (b) proposé pour la synthèse sur support solide.

Deux schémas de protection de l'acide aspartique sont utilisés (Figure 8a, p. 28). Avec le groupe Fmoc comme protecteur de l'amine, l'ester allylique (OAllyl) est employé pour la protection du carboxylate en α .^{54,55} Avec le groupe BOC comme protecteur de l'amine, l'ester de méthylfluorényle (OFm) est employé.⁵⁶⁻⁵⁹ Par contre, comme mentionné au chapitre précédent, cet ester est susceptible de produire de la racémisation au niveau du centre en α . Cette racémisation survient à cause de la déprotection prématurée du groupe OFm et de l'activation de l'acide libre par les agents de couplage lors de l'élongation du peptide.⁴¹ De plus, l'incorporation de l'ester de méthylfluorényle sur la résine peut être problématique étant donné le grand encombrement stérique de la partie fluorényle.⁵⁹ Pour ces raisons, un schéma

de protection de type α -BOC/ α -OAllyl (Figure 8b, p. 28) pour l'acide aspartique est proposé comme alternative pour la synthèse sur support solide du *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1, Schéma 7, p. 29).

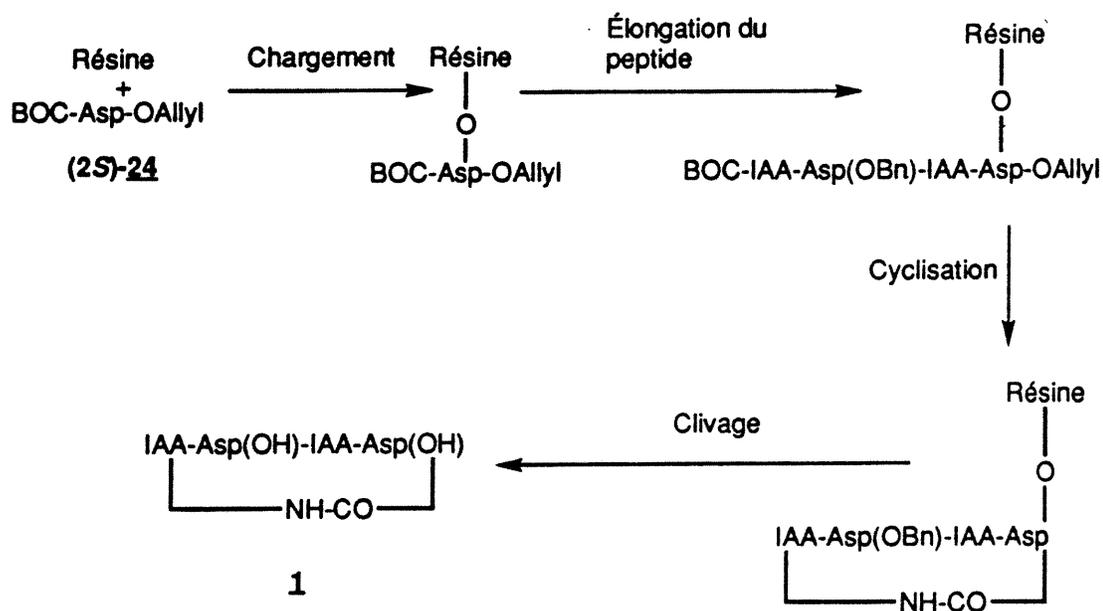


Schéma 7: Stratégie générale pour la synthèse du *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1).

4.2 Préparation de l'acide (2S)-N-(BOC)aspartique- α -allyl ester (BOC-Asp-OAllyl, (2S)-24).

L'acide (2S)-N-(BOC)aspartique- α -allyl ester (BOC-Asp-OAllyl, (2S)-24) est préparé en trois étapes à partir de l'acide (2S)-aspartique. La stratégie implique la protection de la fonction amine par le groupement BOC, une formation d'oxazolidinone et une ouverture nucléophile. Cette voie directe est conçue pour être la plus économique que possible en temps et en coût de synthèse.

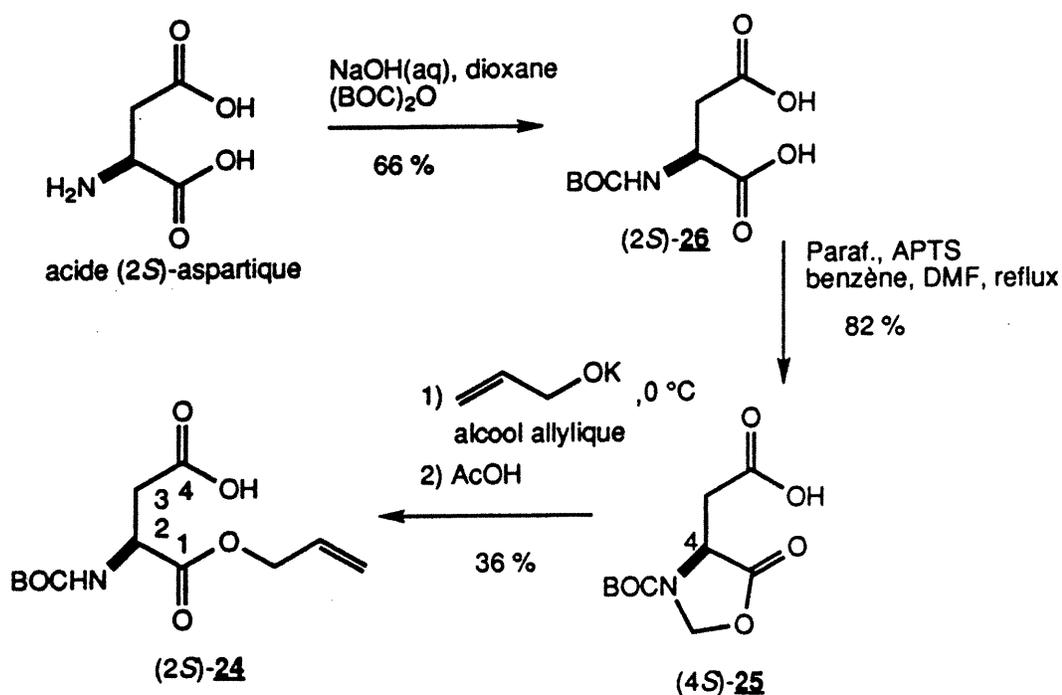


Schéma 8: Préparation de l'acide (2S)-N-(BOC)aspartique- α -allyl ester (BOC-Asp-OAllyl, (2S)-24)

L'acide (4*S*)-3-(BOC)-5-oxo-4-oxazolidinoneacétique ((4*S*)-25) est préparé en deux étapes à partir de l'acide (2*S*)-aspartique (Schéma 8, p. 30). La fonction BOC est installée sur l'amine avec le (BOC)₂O en milieu basique pour conduire à l'acide (2*S*)-*N*-(BOC)aspartique ((2*S*)-26) avec un rendement de 66 % après cristallisation.⁶⁰ L'oxazolidinone (4*S*)-25 est ensuite formée en présence d'un excès de paraformaldéhyde et d'une quantité catalytique d'acide *p*-toluènesulfonique, dans le benzène à reflux, avec un rendement de 82 % après chromatographie.⁶¹

Une réaction d'ouverture nucléophile de l'oxazolidinone (4*S*)-25 donne l'ester allylique (2*S*)-24 (Schéma 8, p. 30). Cette procédure est basée sur la synthèse de l'ester méthylique en α de l'acide glutamique via l'ouverture de l'oxazolidinone correspondante par le méthanoate de sodium.⁶² Dans notre cas, l'allyloate de potassium est le nucléophile de choix. L'utilisation du sel de sodium, au lieu du potassium, conduit à l'ester allylique avec un faible rendement (<20 %). Par contre, l'ouverture de l'oxazolidinone par l'allyloate de potassium, à 0 °C et dans l'alcool allylique anhydre, conduit à l'acide (2*S*)- α -allyl *N*-(BOC) aspartique (BOC-Asp-OAllyl, (2*S*)-24) avec un rendement de 36 % après chromatographie. L'autre produit de la réaction est l'acide (2*S*)-*N*-(BOC)aspartique (2*S*)-26 (50 %) qui peut être réutilisé dans la séquence de réactions.

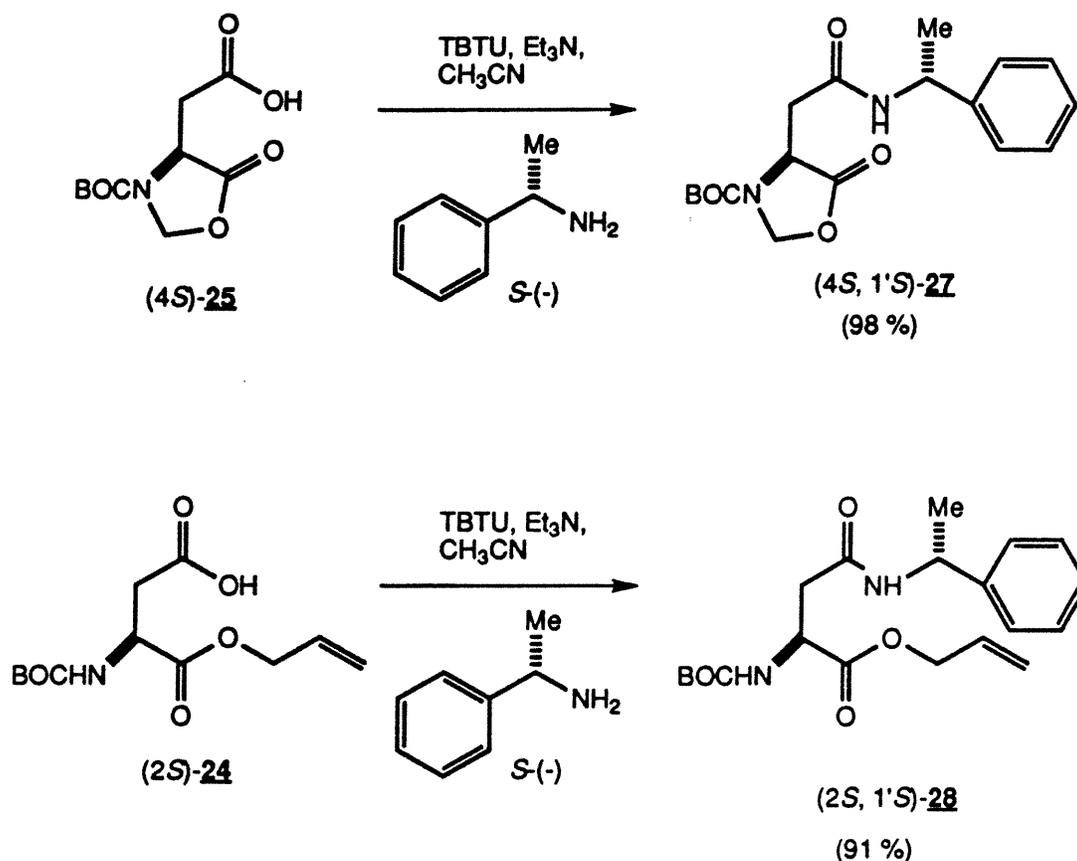


Schéma 9: Détermination de la pureté énantiomérique.

La racémisation associée à l'ouverture de l'oxazolidinone (4S)-25 est évaluée en déterminant la pureté diastéréomérique des dérivés α-méthylbenzylamides de l'oxazolidinone (4S)-25 et de l'ester allylique (2S)-24 par RMN de ¹H (Schéma 9, p. 32). La (*R*)- et la (*S*)-α-méthylbenzylamine sont couplées de la même façon à l'oxazolidinone (4S)-25 et à l'ester allylique (2S)-24 avec le TBTU et la triéthylamine dans l'acétonitrile pour conduire aux dérivés α-méthylbenzylamides (4S, 1'S)-27 et (2S, 1'S)-28 correspondants avec de hauts rendements.⁶³ Lorsque la (*S*)-α-méthylbenzylamine à 99 % de pureté énantiomérique est utilisée, l'examen du signal des protons en position C2 du cycle oxazolidinone (δ 5,33; 5,41), dans l'acétone-d₆, démontre une pureté diastéréomérique d'environ 98 % pour l'amide (4S, 1'S)-27. Une pureté

énantiomérique d'environ 99 % est donc observée pour l'oxazolidinone (4*S*)-25. De même, lorsque la (*S*)- α -méthylbenzylamine de 99 % de pureté énantiomérique est utilisée, l'examen du signal des protons vinyliques de l'ester allylique (δ 5,27; 5,31), dans l'acétone- d_6 , démontre une pureté diastéréomérique d'environ 91 % pour l'amide (2*S*, 1'*S*)-28. Une pureté énantiomérique approximative de 92 % est donc observée pour l'ester allylique (2*S*)-24. La quantité de racémisation n'est pas déterminée avec précision mais une perte de la pureté optique du centre α de l'ordre de quelques pourcents est évidente lors de l'ouverture de l'oxazolidinone (4*S*)-25 par l'allyloate de potassium à 0 °C. Ce résultat est en accord avec la racémisation observée lors de l'ouverture d'une oxazolidinone par le méthanoate de lithium.⁶⁴ L'ester allylique (2*S*)-24 est toutefois utilisé tel quel pour la synthèse sur support solide du *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1).

4.3 Synthèse sur support solide du *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1).

La synthèse sur support solide du *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1) est faite sur deux résines différentes compatibles avec le groupe protecteur BOC. Le *p*-chlorométhyl copoly(styrène-1%-divinylbenzène), appelé résine de Merrifield (Figure 9a, p. 34),⁶⁵ contenant approximativement 1 mmol de chlorométhyle par gramme de résine, est utilisé. Ce support est peu coûteux mais le lien ester entre le peptide et le polymère est susceptible au clivage lors du traitement au TFA (25 % dans CH₂Cl₂) pour la déprotection de la fonction BOC.⁶⁶ Le lien ester est encore plus fragile si le premier acide aminé est lié au support solide par le carboxylate en β ou γ de la chaîne latérale de l'acide aspartique ou de l'acide glutamique.⁶⁷ Pour cette raison, l' α -(*p*-chlorométhyl phénylacétamido)benzyl copoly(styrène-1 %-divinylbenzène), résine PAB-BHA⁶⁸ (Figure 9b, p. 34), contenant approximativement 0,5 mmol de chlorométhyle par gramme de résine, est aussi utilisée pour la préparation du peptide cyclique 1. Pour cette résine, le pont acétamido rend le lien ester plus stable en milieu acide.

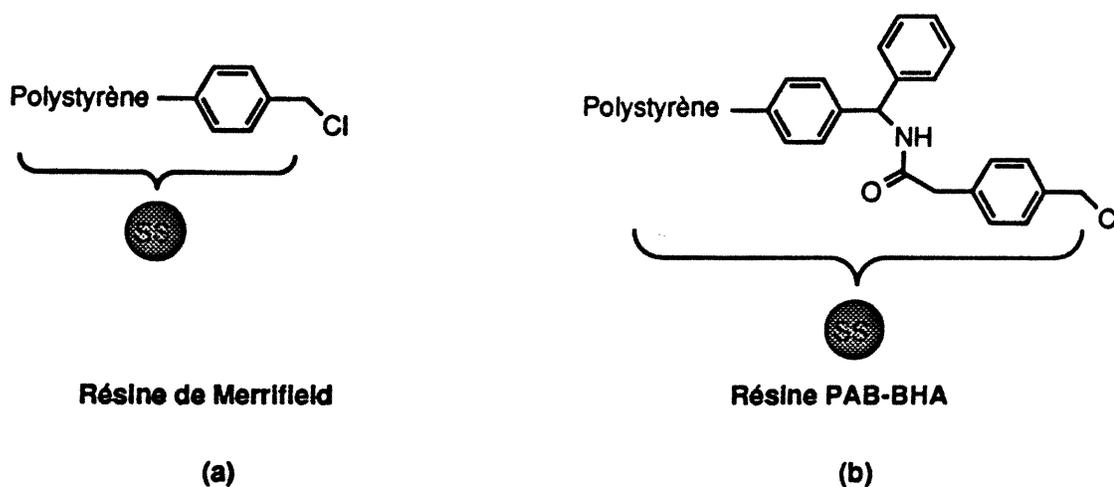


Figure 9: Supports solides employés.

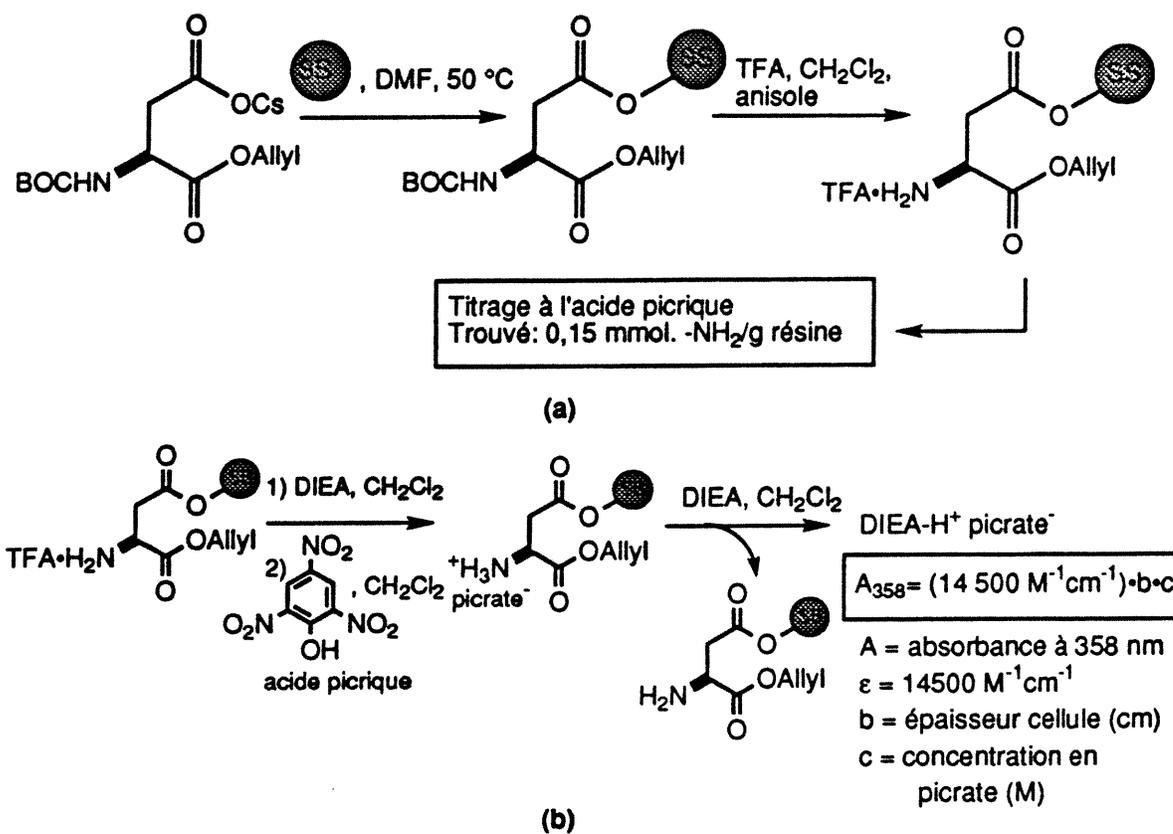


Schéma 10: (a) Encrage au support solide et (b) titrage à l'acide picrique.

L'attachement du premier acide aminé à la résine de Merrifield et à la résine PAB-BHA est réalisé avec le sel de césium du BOC-Asp-OAllyl (2S)-24 (Schéma 10a, p. 34).⁴² Dans les deux cas, la résine est traitée avec 0,2 mmol de BOC-Asp-OCs par gramme de résine, à 50 °C et dans le DMF, pour former le lien ester entre la résine et la fonction carboxylate en β . Après déprotection du groupement BOC avec une solution 25 % v/v de TFA dans du CH_2Cl_2 contenant 2 % v/v d'anisole, un échantillon de chaque résine est prélevé pour l'évaluation de la quantité d'ester d'acides aminés présents sur la résine.

Un titrage de retour à l'acide picrique est utilisé pour évaluer la quantité d'amines libres présentes sur la résine (Schéma 10b, p. 34).⁶⁹ Le principe de ce titrage consiste premièrement à neutraliser le sel de TFA de l'échantillon de la résine puis à former le picrate avec l'acide picrique. Après lavage de la résine, le picrate est déplacé par la DIEA et le sel $\text{DIEA}^+\text{picrate}^-$ est élué pour permettre une lecture d'absorbance après une dilution adéquate de l'éluat. La quantité d'ester d'acides aminés présents sur la résine est directement proportionnelle à la quantité de sel $\text{DIEA}^+\text{picrate}^-$ éluée. Une substitution de 0,15 mmol d'ester d'acides aminés par gramme de résine est trouvée pour la résine de Merrifield et PAB-BHA. Le rendement de chargement du sel de césium est donc de 75 %. Ce degré de substitution est adéquat pour maintenir un effet de pseudo-dilution nécessaire pour minimiser les réactions entre les chaînes peptidiques sur la résine.⁵⁷

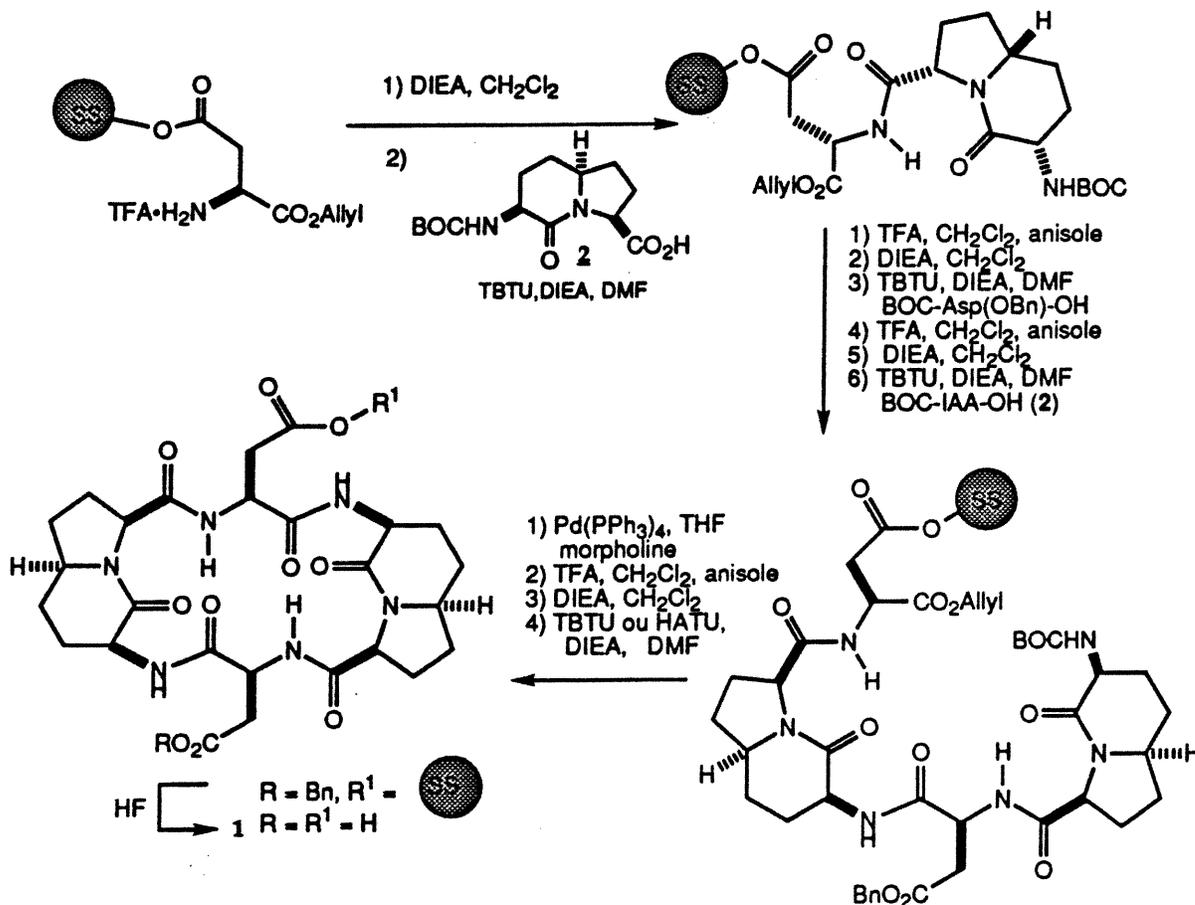
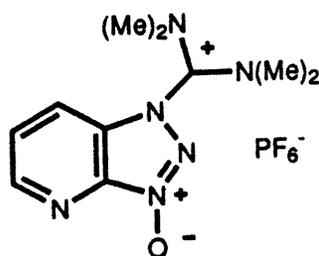


Schéma 11: Synthèse sur support solide cyclo[IAA-Asp-IAA-Asp] (1).

L'élongation du peptide sur le support solide de Merrifield et PAB-BHA procède de la même façon (Schéma 11, p. 36). Le sel de TFA résultant de la déprotection du BOC est neutralisé par une solution 10 % v/v de DIEA dans le CH₂Cl₂. Après lavage de la résine, le couplage du BOC-IAA-OH (2) est réalisé avec un léger excès de TBTU (1,1 équ.) et de DIEA (2 équ.) dans le DMF pour 12 heures. Le TBTU est choisi étant donné le haut rendement de couplage obtenu pour la préparation en solution du dipeptide BOC-IAA-Asp(OBn)-OAllyl (19). Par la suite, les étapes de déprotection, neutralisation et couplage sont

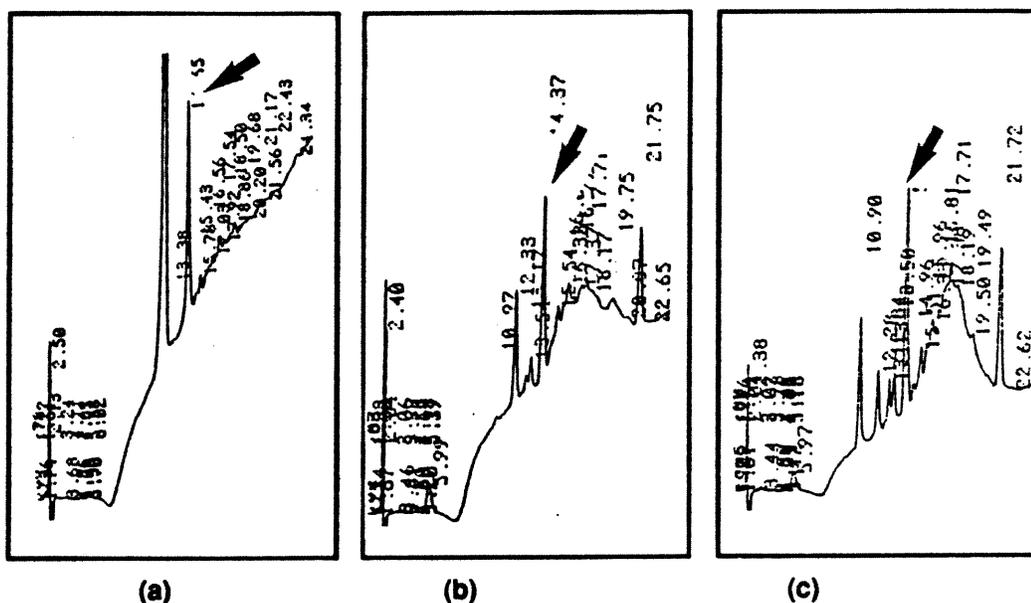
répétées jusqu'à la formation du térapeptide linéaire protégé. Chaque couplage est complet après 12 h selon les tests à la ninhydrine pour la révélation des amines.⁷⁰



HATU

Figure 10: Structure du HATU.

Les déprotections aux extrémités C- et N-terminales sont nécessaires avant la cyclisation du peptide sur le support solide (Schéma 11, p. 36). Pour les deux résines, l'ester allylique est enlevé en présence de Pd(PPh₃)₄ et de morpholine dans le THF. Le BOC est enlevé avec le TFA en présence d'anisole dans le CH₂Cl₂. Le peptide déprotégé est ensuite cyclisé en utilisant deux agents différents. La totalité de la résine de Merrifield chargée est traitée avec le TBTU et la DIEA dans le DMF pour 6 heures tandis que la résine de PAB-BHA chargée est séparée en deux portions pour l'utilisation de deux réactifs différents. Une portion est traitée avec le TBTU et la DIEA dans le DMF pour 6 heures. L'autre portion est traitée de la même façon mais avec le HATU qui est un dérivé azoté du TBTU (Figure 10, p.37).⁷¹ Dans les trois cas, des cyclisations complètes sont confirmées par des tests à la ninhydrine négatifs.



Le peptide cyclique **1** est obtenu avec une pureté adéquate pour sa caractérisation après purification par HPLC. Une technique semi-préparative sur colonne de C-18 est utilisée. Pour la purification d'un échantillon de 5 mg issu de la synthèse sur la résine de Merrifield, 2,4 mg de peptide cyclique **1** est obtenu. Ceci correspond à un rendement global de 5 % basé sur une substitution de départ de 0,15 mmol/g de résine. D'autre part, la purification d'un échantillon de 6 mg issu de la synthèse sur la résine PAB-BHA, quel que soit le réactif de cyclisation utilisé, donne 2 mg de peptide cyclique **1**. Ceci correspond à un rendement global de 25 % basé sur la substitution de départ.

En résumé, le *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (**1**) est préparé avec succès selon la méthode d'élongation et de cyclisation du peptide directement sur le support solide. Pour le *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (**1**), le rendement total après purification est cinq fois plus élevé si la résine PAB-BHA est utilisée au lieu de la résine de Merrifield. Les résultats de la cyclisation avec le HATU sont comparables à ceux obtenus avec le TBTU. La nouvelle stratégie utilisant le BOC-Asp-OAllyl ((2*S*)-**24**) comme acide aminé lié au polymère est efficace et peut-être appliquée à la synthèse d'autres peptides cycliques incorporant le résidu d'acide aspartique. De plus, l'acide aspartique peut possiblement être substitué par l'acide glutamique dans le processus d'ouverture nucléophile de l'oxazolidinone. De cette façon, des peptides incorporant l'acide glutamique pourrait être préparés suivant la même méthode.

CHAPITRE 5

Caractérisation du cyclo[IAA-Asp-IAA-Asp]

5.1 Analyse conformationnelle.

Après la synthèse en solution et sur support solide, le *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (**1**) purifié est caractérisé par la spectrométrie de masse et par l'analyse HPLC en phase inversée. La pureté du produit est appuyée par la présence d'un seul pic sur le chromatogramme HPLC. La nature de ce pic est confirmée par la spectroscopie de masse en basse (FABMS: m/e 591 [MH]⁺) et en haute résolution (SMHR: Calc. pour C₂₆H₃₅N₆O₁₀ [MH]⁺ 591,2415; trouvée 591,2400).

Des expériences de RMN modernes sont utilisées pour caractériser le peptide cyclique **1**.⁷² L'assignation des signaux est faite avec l'aide des couplages scalaires des spectres de corrélation bidimensionnelle homonucléaire ¹H-¹H COSY et TOCSY. L'homogénéité de la conformation est appuyée par l'influence de la température sur les signaux RMN de ¹H. La conformation probable du peptide **1** est déterminée par les différentes constantes de couplage scalaire des signaux RMN de ¹H, par les couplages dipolaires (effets NOEs) du spectre de corrélation bidimensionnelle homonucléaire ¹H-¹H NOESY avec un temps de mixage de 500 msec ainsi que par la dépendance des déplacements chimiques des protons amides en fonction de la température.

Déterminer la présence d'un ou de plusieurs conformères en équilibre en solution est la première étape de l'analyse conformationnelle. Dans de petits peptides cycliques, il est possible d'envisager une grande rigidité de la chaîne peptidique (angles ϕ , ψ , ω) associée à une flexibilité des chaînes latérales des acides aminés (angles χ).⁷² Dans ces peptides, le changement

conformationnel le plus courant de la chaîne peptidique est l'isomérisation des liens amides Xxx-Pro de *trans* ($\omega = 180^\circ$) à *cis* ($\omega = 0^\circ$). Par exemple, dans le DMSO- d_6 , le *cyclo*[Glu-Pro-Gly]₂ est caractérisé par un ratio 3:1 de l'isomère avec des liens amides tous *trans* et l'isomère où les liens Xxx-Pro sont *cis*.⁷³

Le spectre RMN de ¹H du *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1), dans un mélange 9:1 H₂O:acétone- d_6 , est représenté à la figure 12 (p. 42). L'acétone deutérée est ajoutée pour permettre l'ajustement du champ magnétique et pour faciliter la solubilisation du peptide. La majorité du signal de l'eau ($\delta = 4,8$) est éliminé du spectre par irradiation sélective de sa fréquence de résonance. La présence de deux seuls signaux fins (a, b) pour les quatre protons amides et l'apparition d'une seule série de signaux pour chaque type de résidus soutiennent que le *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1) est caractérisé par une symétrie C₂. Par la singularité et la haute résolution des signaux, un seul isomère ou plusieurs isomères en échange rapide peuvent être présents en solution. Dans le *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1), les résidus bicycliques (IAAs) fixent les liens Xxx-Pro à une géométrie toute *trans* ($\omega = 180^\circ$). Les changements conformationnels possibles de la chaîne peptidique sont donc associés aux angles ϕ et ψ . Lorsque le spectre est enregistré à 273 K et à 323 K, les constantes de couplage ($J_{CH\alpha-NH}$) entre les protons en α et les NH amides ainsi que la résolution des signaux amides demeurent les mêmes. Il est ainsi possible d'assumer l'homogénéité conformationnelle de la chaîne peptidique (angles ϕ , ψ et ω) du *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1) en solution entre ces températures. De plus, la conservation des déplacements chimiques ainsi que la résolution des signaux entre les spectres du peptide 1 enregistrés à 2 mM et à 30 mM indique que le peptide 1 a peu tendance à l'agrégation en solution dans 9:1 H₂O:acétone- d_6 .

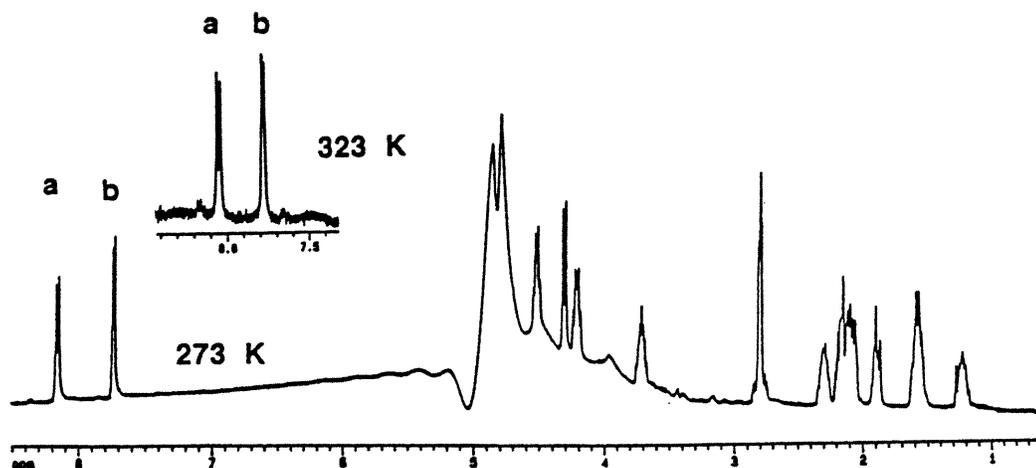


Figure 12: Spectre RMN de ^1H (non-référentiel, 400 MHz) du *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1), 30 mM dans 9:1 H_2O :acétone- d_6 à pH = 3,5.

L'assignation des signaux RMN de ^1H est possible avec les couplages scalaires issus des spectres COSY, TOCSY (Figures 13, p. 43). Les signaux des protons amides, des protons en α et en β des résidus d'acide aspartique ainsi que des protons en α des IAAs sont assignables par les couplages scalaires. Par contre, mis à part les protons en tête de pont, les signaux des protons des cycles des IAAs n'ont pas été attribués.

Signaux	δ (nbre protons)	Couplage scalaire
a	8,19 (2H)	c
b	7,84 (2H)	e
c	4,70 (2H)	a, g
d	4,45 (2H)	h
e	4,35 (2H)	b, h
f	3,85 (2H)	h
g	3,01 (4H)	c
h	1,1-2,3 (16H)	—

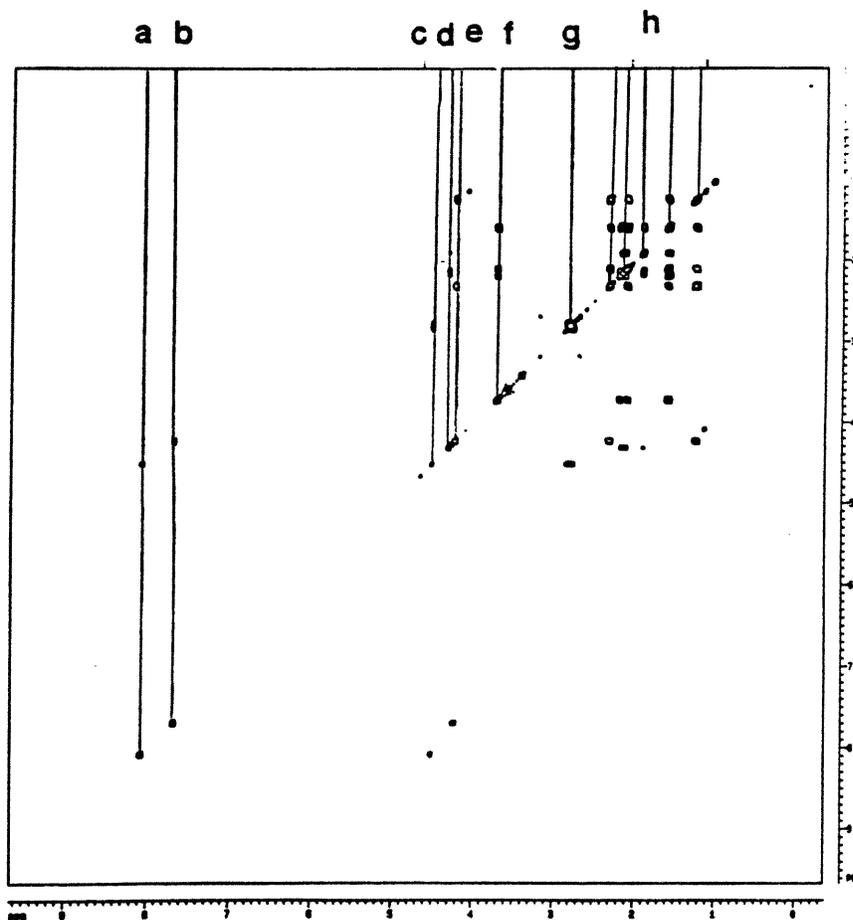
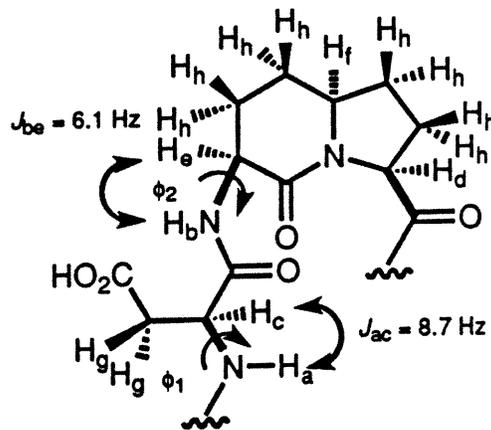


Figure 13: Déplacements chimiques (référés vs TMS), intégration des signaux, couplages scalaires et spectre COSY (600 MHz) du peptide 1, 20 mM dans 9:1 H₂O:acétone-d₆ à pH = 3,5 et 303 K.

Les angles de torsion ϕ sont déterminés expérimentalement par les constantes de couplages entre les protons α et les protons amides ($J_{CH\alpha-NH}$, Figure 13, p. 43). L'équation de Karplus modifiée par Wütrich est utilisée (Équation 1, p. 44).⁷⁴ Pour chaque constante de couplage, quatre solutions sont possibles après la résolution de l'équation quadratique. Pour les résidus d'acide aspartique, des angles dièdres expérimentaux ϕ_1 de -143° et -97° sont associés à une constante de couplage de 8,7 Hz. Pour les résidus IAAs, une constante de couplage de 6,1 Hz correspond à des angles ϕ_2 de $83^\circ, 37^\circ, -165^\circ$ et -75° . Les angles expérimentaux peuvent être comparés aux mêmes angles des conformères I et II issus de la recherche conformationnelle MonteCarlo (voir chapitre 2). Les angles -143 et 83° pour ϕ_1 et ϕ_2 correspondent aux valeurs moyennes ($\Delta = 15^\circ$ et 20°) des mêmes angles de torsion dans le conformère I (Figure 14, p. 45). Par contre, les angles ϕ_1 et ϕ_2 de -143 et -165° sont plus près ($\Delta = 43^\circ$ et 2°) des valeurs des mêmes angles du conformère II (Figure 14, p. 45). Selon la détermination des angles dièdres ϕ_1 et ϕ_2 , les deux conformations peuvent être possibles.

$$J_{CH\alpha-NH} = 6,4 \cos^2\theta - 1,4 \cos\theta + 1,9 ; \theta = |\phi - 60^\circ|$$

$$J_{CH\alpha-NH(Asp)} = 8,7 \text{ Hz}; \cos\theta = -0,92; \theta = 157^\circ; \theta = |\phi_1 - 60^\circ|; \phi_1 = -97^\circ, -143^\circ$$

$$\cos\theta = 1,14 \text{ (rejet, } \cos > 1)$$

$$J_{CH\alpha-NH(IAA)} = 6,1 \text{ Hz}; \cos\theta = 0,92; \theta = 23^\circ; \theta = |\phi_2 - 60^\circ|; \phi_2 = 83^\circ, 37^\circ$$

$$\cos\theta = -0,71; \theta = 135^\circ; \theta = |\phi_2 - 60^\circ|; \phi_2 = -165^\circ, -75^\circ$$

Équation 1: Équation de Karplus modifiée par Wütrich et solutions.⁷⁴

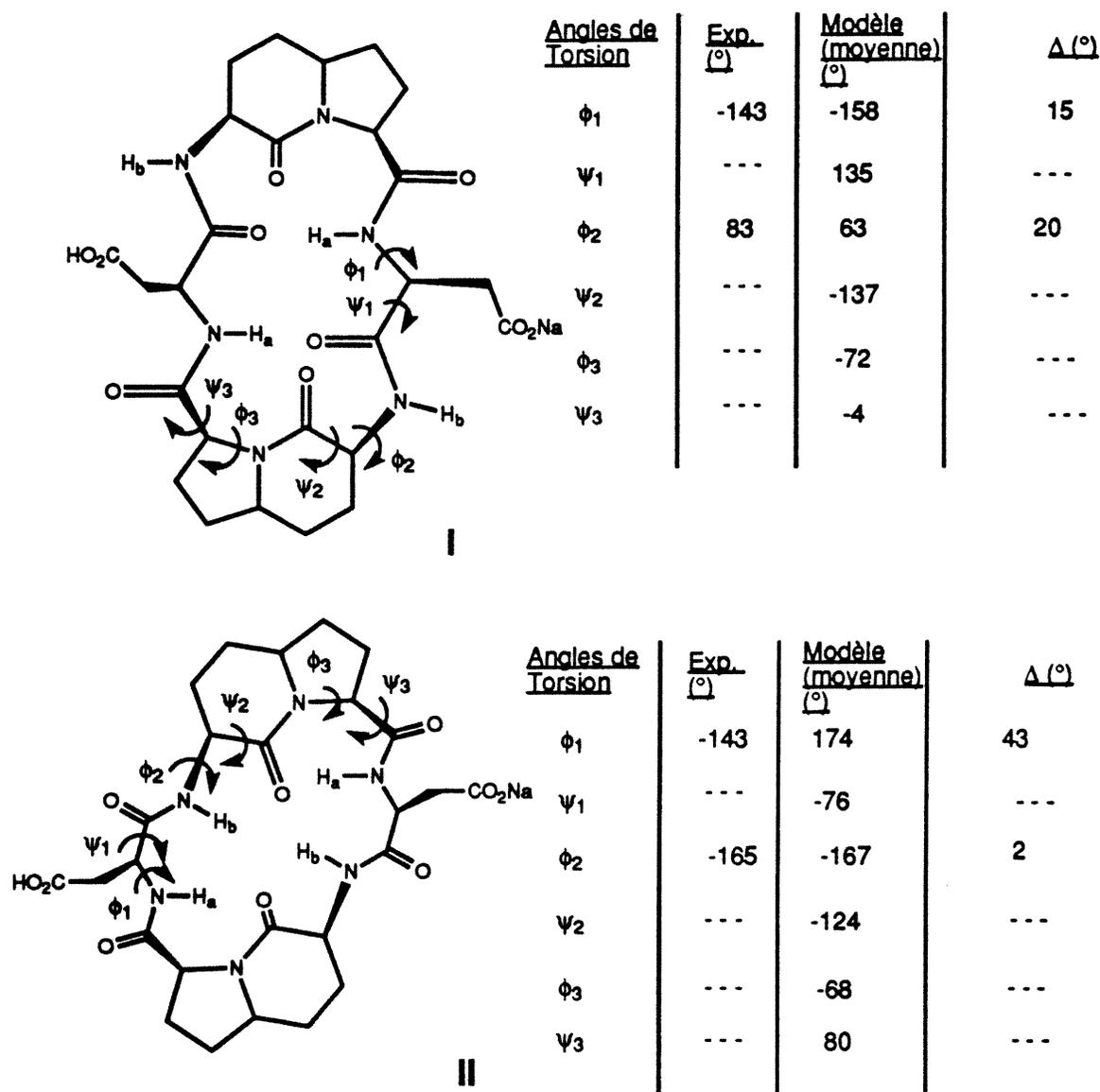


Figure 14: Conformations probables pour le *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1).

Avant de résoudre le problème de la conformation de la chaîne peptidique en solution, l'étude du positionnement des chaînes latérales des résidus d'acide aspartique est nécessaire. La résolution des signaux des protons diastéréotopiques du méthylène en β du résidu d'acide aspartique et les constantes de couplages $J_{CH\alpha-CH_2\beta}$ donne de l'information sur la mobilité et la position de ces chaînes latérales (Figure 15 et 16, p. 46 et 47). Dans le mélange H₂O:acétone-d₆, des constantes vicinales $J_{CH\alpha-CH_2\beta}$ et $J_{CH\alpha-CH_2\beta'}$ équivalentes de 5-6 Hz confirment que les chaînes sont positionnées en moyenne au dessus du cycle à un angle χ d'environ 60°.75 La coalescence partielle des deux signaux (doublets doublés) est la preuve d'une mobilité rapide des chaînes latérales dans ce solvant. Cette coalescence est probablement causée par un équilibre des interactions entre les groupes carboxyliques seuls et les groupes carboxyles et les molécules d'eau. Dans le DMSO, des constantes $J_{CH\alpha-CH_2\beta}$ et $J_{CH\alpha-CH_2\beta'}$ équivalentes de 5-6 Hz sont également observées pour les mêmes signaux. De plus, dans ce solvant, la résolution des deux protons diastéréotopiques démontre une organisation des chaînes latérales des résidus d'acide aspartique. Ceci est prévisible puisque le DMSO est seulement un accepteur de ponts hydrogènes tandis que l'eau est donneur et accepteur de ponts hydrogènes.

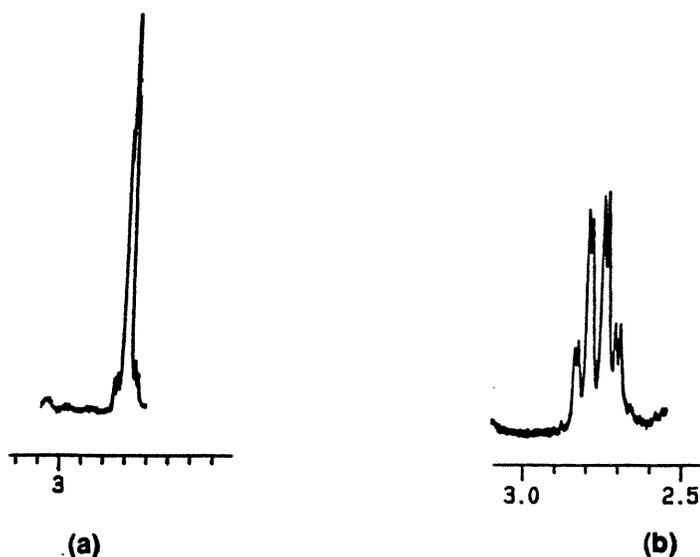


Figure 15: Signal RMN ¹H du -CH₂β- des résidus Asp dans (a) 9:1 H₂O:acétone-d₆ , pH = 3,5 et (b) DMSO-d₆, pH = 4 du *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1).

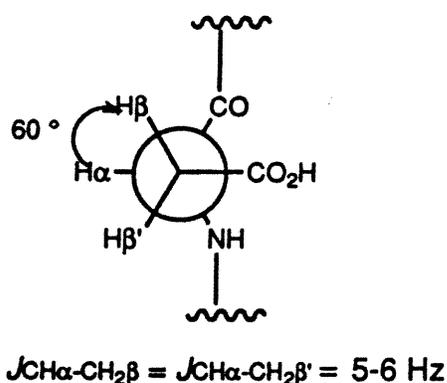


Figure 16: Positionnement des chaînes latérales des résidus Asp dans le *cyclo[IAA-Asp-IAA-Asp]* (1).

Les signaux transversaux du spectre NOESY donnent de l'information sur les distances entre les différents couples de protons. Les couplages dipolaires (effets NOEs) sont observés entre les protons dont la distance est inférieure à 3-4 Å (Figure 17, p. 48).⁷² Selon les effets NOEs en fonction des distances entre les différents couples de protons amides, la conformation I de la chaîne peptidique pour le *cyclo[IAA-Asp-IAA-Asp]* (1) serait moins probable que la conformation II. La corrélation presque parfaite entre le minimum I en énergie obtenu par l'analyse MonteCarlo et les valeurs des angles dièdres ϕ , calculées expérimentalement, laisse croire en l'existence du conformère I. Par contre, dans ce conformère issu de la modélisation, les distances interatomiques entre les protons amides a et b sont de 4,6 et 4,2 Å. Ces valeurs sont au delà des limites pour l'observation des effets NOEs. Dans le conformère II, ces distances sont de 3,7 et 2,7 Å. De plus, pour ce dernier, l'angle ϕ_1 de 174° dans le modèle fait place, expérimentalement, à un angle de -143°. Ceci a pour effet de réduire encore plus la distance de 2,7 Å observée dans le modèle. D'après les couplages dipolaires entre les différents protons amides, la conformation II est plus probable pour le peptide cyclique 1.

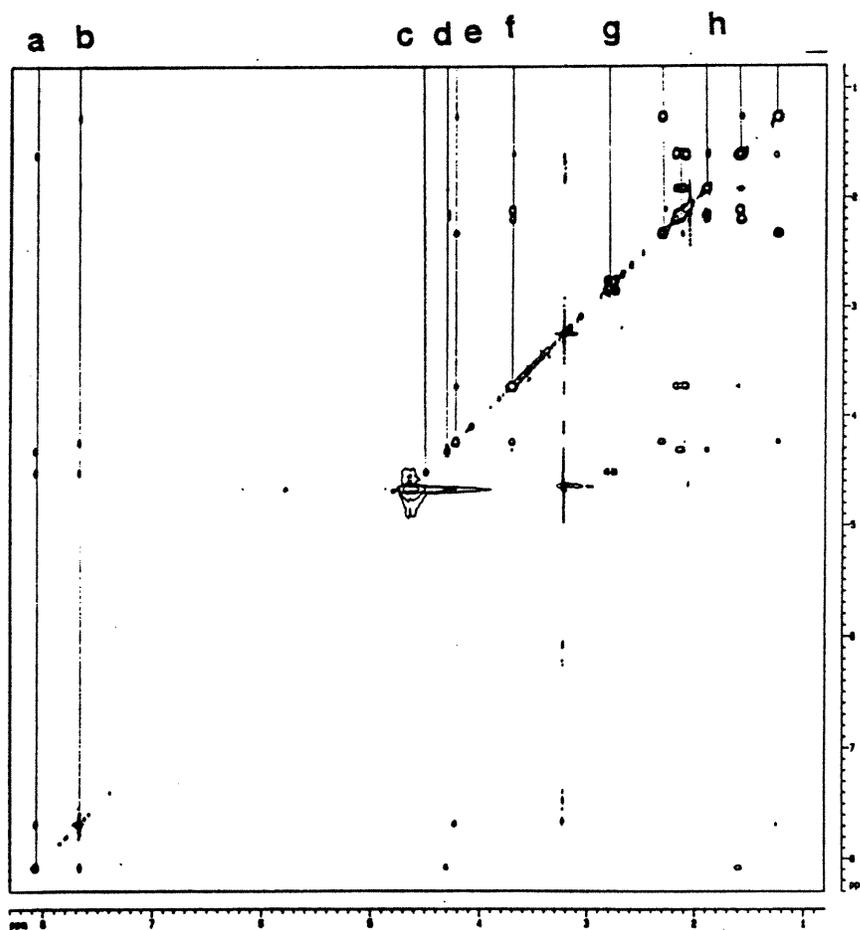
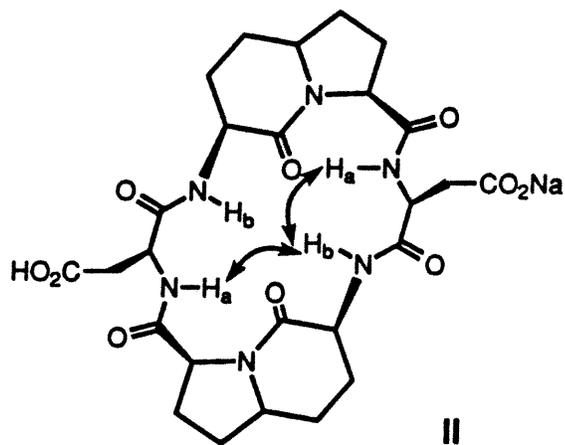


Figure 17: Couplages dipolaires observés et spectre NOESY (600 MHz) du peptide 1, 20 mM dans 9:1 H₂O:acétone-d₆ à pH = 3,5 et 303 K.

Les gradients de déplacements chimiques des protons amides en fonction température ($\Delta\delta/\Delta T$), nous informent sur la présence de ponts hydrogènes impliquant ces protons. En général, dans l'eau et le DMSO- d_6 , des gradients $\Delta\delta/\Delta T >|-4 \text{ ppb/K}|$ indiquent des échanges importants entre les protons amides et le solvant. De l'autre côté, des gradients $\Delta\delta/\Delta T <|-3 \text{ ppb/K}|$ sont associés à la formation de ponts hydrogènes intra- ou intermoléculaires protégeant les protons amides du solvant.^{76,77} L'expérience est réalisée dans un mélange 9:1 H₂O:acétone- d_6 et dans le DMSO- d_6 , avec 5 mesures entre 303 et 323 K, à une concentration de 2 mM pour éviter les interactions intermoléculaires (voir graphes aux annexes). Le DMSO- d_6 , qui est le solvant de choix pour ces expériences,⁷² peut être utilisé car la conformation du peptide 1 demeure semblable à celle rencontrée dans l'eau selon la conservation des constantes de couplage $J_{\text{CH}\alpha\text{-NH}}$ et selon la multiplicité des signaux en RMN de ^1H . Les gradients $\Delta\delta/\Delta T$ des protons amides sont différents selon le solvant employé (Tableau 1, p. 49). Dans le mélange H₂O:acétone- d_6 , des mesures, en valeur absolue, de 6 et 3 ppb/K sont mesurés respectivement pour les protons amides des résidus d'acide aspartique et IAA. Dans le DMSO, des gradients $\Delta\delta/\Delta T$ de 4 et 0 ppb/K sont mesurés pour les mêmes résidus. Ceci démontre clairement que seuls les protons amides des résidus IAA sont impliqués dans un pont hydrogène. Ce lien est probablement intramoléculaire étant donné la haute dilution et la faible tendance à l'agrégation du peptide 1.

Résidus	$-\Delta\delta/\Delta T$ dans 9:1 H ₂ O:acétone- d_6 (ppb/K)	$-\Delta\delta/\Delta T$ dans DMSO- d_6 (ppb/K)
IAA	3	0
Asp	6	4

Tableau I: Gradients $\Delta\delta/\Delta T$ des protons amides entre 303 et 323 K, 2 mM.

Les mesures des gradients $\Delta\delta/\Delta T$ pour les protons amides supportent la conformation II du peptide cyclique **1** où tous les protons amides pointent vers l'intérieur du macrocycle. Il est démontré précédemment que les chaînes latérales des résidus d'acide aspartique sont orientées au dessus du cycle peptidique. Cette conformation empêche la formation de ponts hydrogènes entre les groupes carboxyliques et les protons amides des IAAs. Le gradient $\Delta\delta/\Delta T$ indiquent que les protons amides des résidus IAAs sont impliqués dans un pont hydrogène intramoléculaire. La conformation I est donc peu probable puisque, dans cette forme, les protons amides des IAAs sont directement exposés au solvant.

Les résultats de l'analyse conformationnelle démontre que, pour le *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (**1**), la conformation II est plus probable que la conformation I. En solution, le peptide **1** adopte probablement une conformation où les résidus IAA sont placés aux positions i et $i + 1$ d'un repliement tordu. Une assignation absolue de la conformation sera possible par l'obtention d'une structure cristalline du peptide **1**. Des efforts sont maintenant déployés pour obtenir un crystal convenable. Toutefois, le peptide cyclique est caractérisé, expérimentalement, par une forme rigide qui oriente les deux chaînes latérales des résidus d'acide aspartique au dessus du cycle peptidique. Avec ces caractéristiques, le peptide **1** est un candidat potentiel pour agir comme mimique des protéases aspartiques. La section suivante consiste à démontrer les interactions entre les groupes carboxyles selon leur constante de dissociation.

5.2 Détermination des constantes de dissociation.

Dans les protéases aspartiques, des valeurs anormales des constantes de dissociation des acides carboxyliques dans l'eau sont observées¹⁶ ($pK_{a1} \approx 2$, $pK_{a2} \approx 5$). La distance d'environ 3 Å entre ces groupes fonctionnels ainsi que leur positionnement symétrique de part et d'autre du site actif rend les interactions possibles entre les deux groupes carboxyles (voir section 1.3).

L'influence de la proximité des acides carboxyliques sur la valeur de leur pK_a est démontrée dans plusieurs polyacides (Figure 18, p. 51). Par exemple, l'acide malonique possède des pK_a de 2,55 et 5,10 dans l'eau à 25 °C.⁷⁸ La rigidité du système contribue encore plus aux valeurs anormales des constantes de dissociation. L'acide maléique, qui est rigidifiée par un lien double, possède des valeurs de pK_a de 1,91 et 6,33 dans l'eau à 25 °C.¹⁶ Un autre exemple marquant est le triacide de Kemp²¹ qui associe proximité et stabilité conformationnelle pour l'obtention de valeurs de pK_a de 3,3; 5,85 et 7,3 dans l'eau à 25 °C. Dans ce système, les trois acides carboxyliques sont maintenus à proximité ($\approx 2,5$ Å) en position axiale. Cette conformation est favorisée puisque des interactions 1, 3-diaxiales sont présentes lorsque les groupes méthyles sont axiaux.

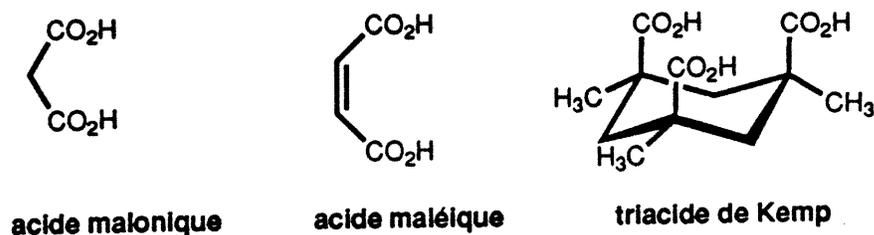


Figure 18: Exemples de polyacides.

Dans le *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1), il est possible d'assumer que le cycle peptidique adopte une seule conformation homogène dans l'eau. De plus, l'analyse conformationnelle supporte que les chaînes latérales des résidus d'acide aspartique sont positionnées au dessus du cycle procurant une proximité entre les groupes carboxyles. Des valeurs anormales de pKa sont attendues si des interactions entre ces groupes sont présentes. La détermination des constantes de dissociation des deux acides carboxyliques est nécessaire pour évaluer l'état de protonation du peptide 1 selon le pH du milieu et ainsi démontrer son potentiel pour agir comme mimétique des protéases aspartiques.

Les constantes de dissociation sont déterminées dans l'eau à 25 °C par un titrage potentiométrique d'une solution aqueuse du peptide 1, préalablement acidifiée avec du HCl, par une solution aqueuse de NaOH. Les équations de Simms⁷⁹ sont utilisées pour le calcul du nombre de protons installés au niveau des carboxylates à chaque volume de base ajouté. Le nombre de protons installés est calculé par la différence entre la quantité totale théorique des protons présents en solution ($n_{\text{INIT}} - n_{\text{TIT}} + n_{\text{EQ}}$) et la quantité de protons détectés à l'électrode (n_{OBS} , Équation 2, p. 53). Les deux constantes de dissociation sont équivalentes aux pH lorsque 1,5 et 0,5 protons sont présents au niveau des groupes carboxylates. Un programme informatique est utilisé pour le calcul des protons installés et pour la détermination des constantes de dissociation (voir données et graphe aux annexes).⁸⁰

$$nH = (nINIT - nTIT + nEQ - nOBS) / (nORG)$$

nombre de H⁺ initial (mol) = nINIT = (nACID) + (nORG x nPROT)

où: nACID = quantité de HCl ajouté au départ (mol)

nORG = quantité de peptide 1 ajouté au départ (mol)

nPROT = nombre de fonctions protonées (2 pour le diacide 1)

nombre de H⁺ titrés par OH⁻ (mol) = nTIT = (VOL) x (CONCBASE)

où: VOL = volume total de base ajouté (l)

CONCBASE = concentration de la base (M)

nombre de H⁺ provenant de la dissociation de l'eau (mol) = nEQ = cEQ x VOLTOT

où: VOLTOT = volume total (l)

cEQ = concentration de H⁺ à l'équilibre (M) = $KH_2O/10^{(-pH)}$

KH_2O = dissociation de l'eau = $1,66 \times 10^{-14}$

nombre de H⁺ observé à l'électrode (mol) = nOBS = cOBS x VOLTOT

où: cOBS = concentration de H⁺ observée (M)

Équation 2: Équation utilisée pour le calcul des protons installés (nH) à chaque volume de NaOH ajouté.

Des constantes de dissociation de 3,2 (pKa₁) et 6,9 (pKa₂) sont obtenues pour les acides carboxyliques du *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1). La valeur normale de la constante de dissociation, dans l'eau et à 25 °C, de l'acide carboxylique de la chaîne latérale de l'acide aspartique est de 4,0⁸¹. Dans le peptide 1, la première constante est inférieure de 0,9 unité à la valeur normale tandis que la deuxième constante est supérieure de 2,9 unités. Ces valeurs de pKa indiquent que l'analyse conformationnelle du peptide 1 est réalisée dans un état de monoprotation des carboxylates (pH = 4 pour analyse dans DMSO-d₆, pH = 3,5 pour analyse dans 9:1 H₂O:acétone-d₆).

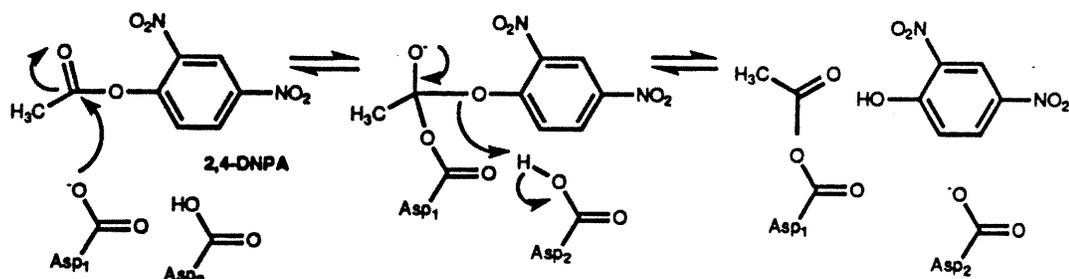
Les valeurs des constantes de dissociation confirment la proximité des chaînes latérales des résidus d'acide aspartique dans le peptide 1. Une différence de 3,7 unités est observée entre les deux pKa's. Ceci est explicable par la formation d'un patron de ponts hydrogènes dans la forme monoprotinée du peptide. La perte du deuxième proton résulte en une proximité des deux charges négatives portées par les carboxylates. La répulsion des charges est réduite que par le déplacement de part et d'autre des chaînes latérales. Ce mouvement peut être empêché, partiellement, par un patron de liens hydrogènes entre les carboxylates et les protons amides des résidus IAAs.

Ces résultats démontrent clairement le potentiel du peptide 1 à agir comme mimique des protéases aspartiques . Avec l'installation d'un seul proton au niveau des carboxylates entre les pH 3,2 et 6,9, le peptide 1 peut activer un lien ester ou amide pour catalyser son hydrolyse. L'étude de l'activité hydrolytique du *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1) sur le 2,4-dinitrophénylacétate est décrite au chapitre suivant.

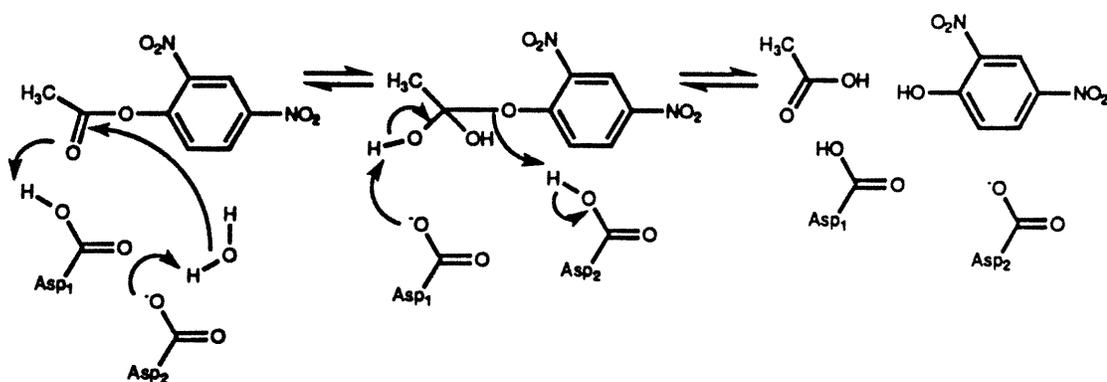
CHAPITRE 6

Activité hydrolytique

Une étude de cinétique est faite pour évaluer le potentiel du *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1) à hydrolyser le 2,4-dinitrophénylacétate (2,4-DNPA). Cet ester activé est choisi pour permettre de suivre la réaction d'hydrolyse par spectrométrie d'absorbance grâce à la libération du 2,4-dinitrophénolate.



Mécanisme nucléophile



Mécanisme acide général-base générale

Figure 19: Mécanismes possibles pour l'hydrolyse du 2,4-DNPA par le *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1).

L'hydrolyse du *p*-nitrophénylacétate et du 2,4-DNPA par l'ion acétate est démontrée dans la littérature.⁸² Il est postulé que cette réaction procède par un mécanisme impliquant directement l'ion acétate comme nucléophile.⁸³ Par analogie avec le mode d'action des protéases aspartiques (voir section 1.3), l'hydrolyse du 2,4-DNPA par le *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1) peut se produire par deux mécanismes différents (Figure 19, p. 55).

L'expérience d'hydrolyse est effectuée à 35 °C dans un milieu 9:1 d'eau:isopropanol pour augmenter la solubilité des réactifs. La force ionique est ajustée à $\mu = 0,3$ avec du KCl et les pH sont fixés avec l'aide de différents tampons. Un rapport peptide/substrat de 10 est utilisé lors des mesures de l'activité. Pour tous les pH, des expériences contrôles sont faites pour vérifier l'activité hydrolytique du milieu tamponé seul sur le 2,4-DNPA. Les détails de l'expérience sont mentionnés à la section expérimentale (voir paragraphe 8.8).

Temps (min)	Absorbances à 410 nm			
	pH = 3 (contrôle)	pH = 4 (contrôle)	pH = 5 (contrôle)	pH = 7 (contrôle)
0	0,011 (0,007)	0,018 (0,017)	0,031 (0,026)	0,033 (0,035)
45	0,010 (0,009)	0,022 (0,019)	0,044 (0,036)	0,041 (0,039)
90	0,015 (0,014)	0,026 (0,024)	0,055 (0,046)	0,049 (0,049)

Tableau 2: Activité hydrolytique du peptide 1 (1×10^{-4} M) sur le 2,4-DNPA (1×10^{-5} M) à 35 °C et à pH = 3 (tampon formate de sodium/acide formique), pH = 4 et 5 (tampon acétate de sodium/acide acétique), pH = 7 (tampon MOPS).

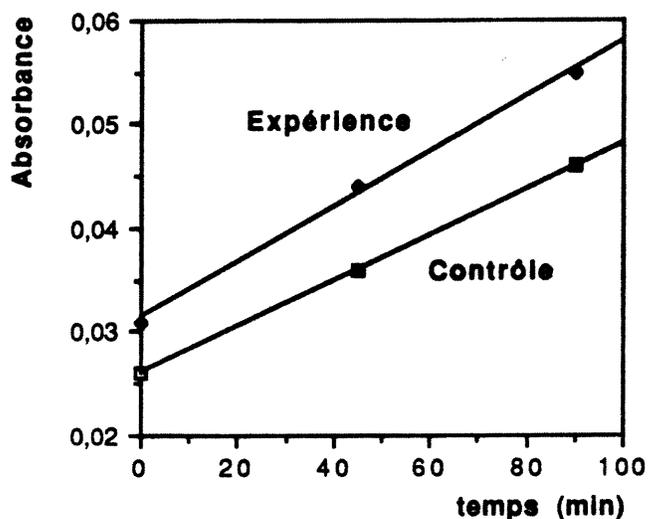


Figure 20: Graphe de l'absorbance en fonction du temps pour l'expérience et le contrôle à pH = 5.

Les mesures des absorbances en fonction du temps sont compilées dans le tableau 2 (p. 56). Pour tous les pH, une augmentation de l'absorbance est observée. Toutefois, l'augmentation de l'absorbance dans les expériences avec le peptide 1 est comparable à celle des expériences contrôles avec les tampons seuls. La plus grande activité est observée à pH = 5. À ce pH, en comparant les pentes des graphes de l'absorbance en fonction de la température pour l'expérience avec le contrôle, une accélération d'environ 20 % est observée pour l'hydrolyse du 2,4-DNPA par le peptide 1 (Figure 20, p. 57). Ces résultats démontrent l'inactivité du peptide cyclique 1 à accélérer l'hydrolyse du 2,4-DNPA.

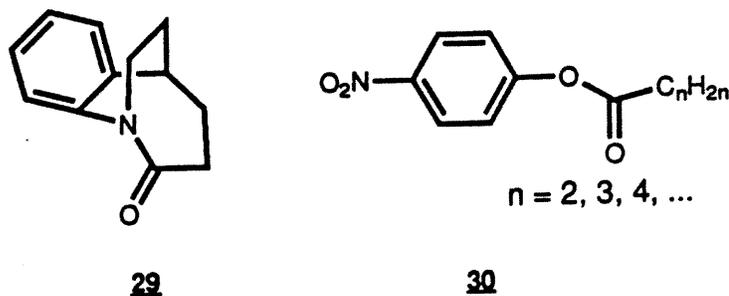


Figure 21: Substrats suggérés pour l'étude de l'activité hydrolytique du *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1).

L'étude de l'activité hydrolytique est limitée à un seul substrat (2,4-DNPA). Il est trop tôt pour affirmer avec certitude que le peptide cyclique **1** ne possède aucune activité hydrolytique. Cette étude doit s'étendre à plusieurs autres candidats. Par exemple, l'amide tendu **29** (Figure 21, p. 58),⁸⁴ qui possède une réactivité pour l'attaque des diacides,²⁰ est un substrat de choix. D'autre part, un autre ester activé comme **30** peut être un autre choix judicieux. Une certaine affinité pourrait être observée entre la chaîne alkyle du substrat et la partie alkyle des résidus IAA. Une étude plus approfondie doit être faite pour évaluer la candidature du *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1) à agir comme mimique des protéases aspartiques.

CHAPITRE 7:

Conclusion

Dans l'objectif de rejoindre l'activité catalytique des protéases aspartiques en mimant les aspects structuraux de leur site actif, le *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1) a été synthétisé puis caractérisé dans ce travail de recherche. Premièrement, le BOC-IAA-OH (2) a été préparé avec succès selon la méthode rapportée²⁴ et le peptide cyclique 1 fut synthétisé avec un rendement de 11 % par la méthode en solution. Étant donné que cette technique nécessite des étapes de purification laborieuses et un temps de préparation élevé, une méthodologie pour la préparation du peptide cyclique 1 utilisant un support de polymère comme matrice pour l'élongation et la cyclisation du peptide a été développée. Cette voie nécessite la préparation du BOC-Asp-OAllyl (2*S*)-24 qui a été lié au support solide. Le peptide 1 a été obtenu avec un rendement de 25 % pour la synthèse sur la résine PAB-BHA. La synthèse sur support solide est avantageuse puisqu'elle ne requière aucune étape de purification et le temps de préparation du peptide cyclique 1 est court. De plus, la méthode générale d'élongation et de cyclisation sur support solide peut être applicable pour la préparation, par technique combinatoire, d'autres peptides cycliques incorporant soit un résidu d'acide aspartique ou d'acide glutamique avec d'autres acides aminés.

La conformation du *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1) a été déterminée par des expériences de RMN modernes. La structure concorde assez bien avec un des minima d'énergie déterminés par la recherche conformationnelle de MonteCarlo. Elle est caractérisée par une forme compacte qui place les résidus IAAs aux positions i et $i + 1$ de repliements tordus plutôt qu'aux positions $i + 1$ et $i + 2$ de repliements β de type II'.

Par les restrictions conformationnelles apportées par les IAAs, les chaînes latérales des résidus d'acide aspartique dans le peptide 1 sont positionnées au dessus du cycle et à proximité pour imiter les aspects structuraux du site actif des protéases aspartiques. Malgré ses caractéristiques, le peptide 1 est peu efficace pour accélérer l'hydrolyse du 2,4-dinitrophénylacétate.

Le *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1) est une molécule intéressante pour d'autres applications. Par exemple, il est démontré que les peptides cycliques sont des candidats qui possèdent des propriétés biologiques surprenantes.⁷² L'activité biologique du peptide 1 reste encore inconnue. De plus, par sa conformation particulière, le *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1) est un ligand potentiel pour la complexation de métaux. Les groupes carboxylates des résidus d'acide aspartique ou d'acide glutamique servent souvent de ligands dans plusieurs sites actifs de métalloenzymes.⁸⁵ Il s'avère donc intéressant d'étudier la conformation ainsi que les propriétés catalytiques du peptide 1 en présence de métaux normalement retrouvés dans les sites actifs des métalloenzymes (Fe, Co, Zn, Mg, ...).

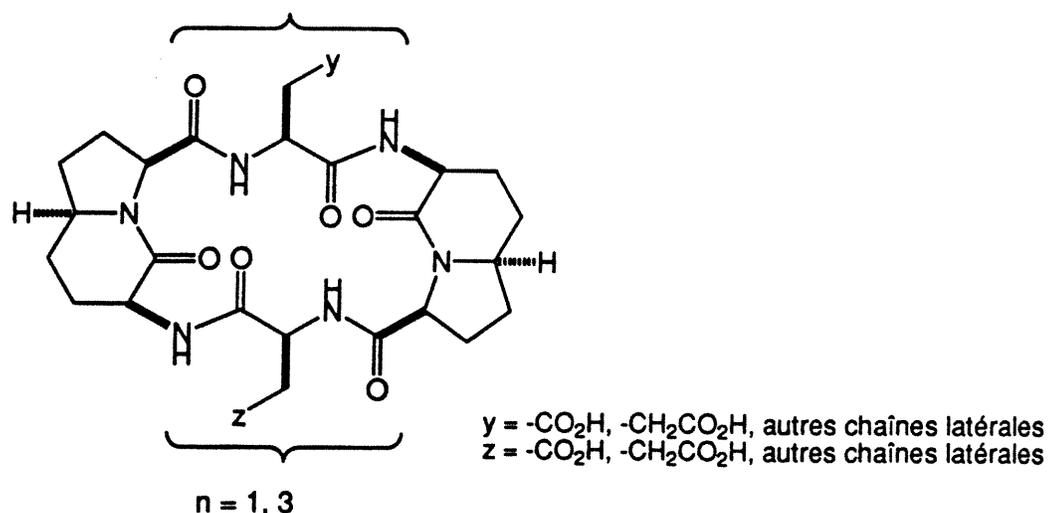


Figure 22: Génération de bibliothèques de peptides cycliques incorporant le résidu IAA et Asp ou Glu.

La figure 22 (p.60) représente certaines possibilités de peptides cycliques, contenant au moins un résidu d'acide aspartique ou d'acide glutamique et deux résidus IAAs, qui peuvent être préparés par la méthode générale sur support solide. De tels peptides peuvent servir de composés modèles dans l'étude des interactions entre les différentes chaînes latérales de résidus d'acides aminés, de mimiques d'autres sites actifs d'enzymes ou de métalloenzymes et même de peptides qui peuvent posséder des propriétés biologiques intéressantes.

En conclusion, par la synthèse et la caractérisation du *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1), il est démontré que l'incorporation de IAAs dans de petits peptides cycliques permet de restreindre la conformation de la chaîne peptidique pour contrôler le positionnement des chaînes latérales d'acides aminés naturels. Ainsi, il est possible de mimer les caractéristiques des sites actifs d'enzymes. Le *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1) est un exemple où les groupes carboxyles de deux résidus d'acide aspartique sont positionnés de façon à mimer le site actif des protéases aspartiques.

CHAPITRE 8:

Section expérimentale

8.1 Généralités.

Toutes les réactions ont été effectuées sous atmosphère d'azote. Les solvants ainsi que les réactifs distillés ont été transférés avec des seringues. Le THF et l'éther éthylique ont été distillés sur du sodium/benzophénone; le méthanol a été distillé sur du $\text{Mg}(\text{OCH}_3)_2$; le bromobenzène, le chlorure de triméthylsilane et le dichlorométhane ont été distillés sur du CaH_2 ; le chloroforme a été distillé sur du P_2O_5 ; le DMF a été distillé sur du MgSO_4 ; la pyridine et la triéthylamine ont été distillées sur du BaO ; l'alcool allylique a été distillé sur du K_2CO_3 . De l'eau distillé et déionisé a été utilisée pour la préparation des solutions lors de la mesure des constantes de dissociation et pour déterminer l'activité hydrolytique du peptide 1. Les points de fusion ne sont pas corrigés. Les spectres de masse à basse résolution (FABSM) et à haute résolution (SMHR, FAB) ont été obtenus du Centre Régional de Spectroscopie de Masse de l'Université de Montréal. Les spectres de RMN de ^1H (300/400/600 MHz) et ^{13}C (75/100 MHz) ont été enregistrés dans différents solvants deutérés (CDCl_3 , D_2O , acétone- d_6 , $\text{DMSO}-d_6$, $\text{H}_2\text{O}:\text{acétone}-d_6$). Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm (unités δ) par rapport au tétraméthylsilane ($(\text{CH}_3)_4\text{Si}$, $\delta = 0$ ppm) et les constantes de couplage sont exprimées en hertz. Les déplacements chimiques des carbones aromatiques des groupes PhF ne sont pas rapportés. Les chromatographies-éclairées sur colonnes ont été faites avec de la silice 230-400 mesh. Les analyses et purifications par HPLC ont été faites en phase inversée sur des colonnes de C-18 (6 μm , 60 Å) avec un détecteur UV avec détection à 214 nm. Des colonnes cartouches de 8 x 100 mm et 25 x 100 mm ont été utilisées, avec leur module de compression, pour l'analyse et la purification des peptides 1 et 23.

8.2 Modélisation moléculaire

La détermination de la conformation minimale en énergie du *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1) a été réalisée avec le logiciel Macromodel version 4.5.²⁸ La structure plane du peptide cyclique a été dessinée avec une fonction carboxylate protonée puis l'autre associée avec un ion sodium. L'énergie de cette structure a été minimisée en utilisant le champ de force AMBER*²⁹ avec le minimiseur «*Steepest Descent*» (SD) pour 2000 itérations dans le vide. La structure résultante a été soumise à une recherche conformationnelle par la méthode MonteCarlo.^{26,27} Le champ de force AMBER* a été choisi avec un modèle continu pour l'eau comme solvant.³⁰ L'algorithme «*Polack-Rivière Conjugated Gradient*» (PRCG) avec un critère de convergence de 0,01 kJ/mol-Å pour 500 itérations (max.) été utilisé pour minimiser les conformères générés. Les sélections par défaut ont été utilisées pour le choix des angles dièdres et des liens de fermeture. Les liens amides sont fixés à une géométrie *trans* ($\omega = 180^\circ$). Pour 1000 étapes de recherche, 143 structures groupées dans 72 conformères différents ont été conservées dans 50 kJ/mol du minimum global.

8.3 Synthèse de l'acide (3S,6S,9S)-2-oxo-3-N-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylique (BOC-IAA-OH, 2).

8.3.1 Acide (2S)-glutamique γ -méthyl ester (3).³⁴

Du chlorure d'acétyle fraîchement distillé (20 ml; 0,28 mmol) est ajouté goutte-à-goutte, à 0 °C, sur du méthanol (250 ml) puis la solution est agitée

pendant 5 min à 0 °C. L'acide (2S)-glutamique (36,8 g; 250 mmol) est ensuite ajouté lentement puis le mélange est agité vigoureusement à 0°C pendant 10 min pour dissoudre la majorité du solide. La solution est ensuite agitée lentement à température ambiante pour 24 h. De la pyridine (25 ml) est additionnée, le mélange est agité lentement à température ambiante pour 48 h et le précipité est filtré puis lavé avec de l'éthanol 100%. Le solide recueilli est séché dans un appareil Abder-Alden sur P₂O₅ et chauffage par un reflux d'acétone. L'ester méthylique **3** est obtenu sous la forme d'un solide blanc.

Rendement: 39% (15,5 g; 96 mmol).

P.f.: 182-184 °C (litt. 182 °C).³⁴

RMN ¹H: (D₂O avec DOH comme référence δ= 4,80; 300 MHz) δ 2,11 (m, 2H); 2,52 (t, 2H, *J* = 7,5); 3,66 (s, 3H); 3,73 (t, 1H, *J* = 6,4).

FABSM: *m/e* 162 (100, [MH]⁺), 149 (9), 133 (9), 116 (18).

8.3.2 9-bromo-9-phénylfluorène (4).³⁶

Dans un ballon de type Morton muni d'un agitateur mécanique et sous atmosphère d'azote, une solution de bromobenzène (158 ml; 1,5 mol) dans 800 ml d'éther éthylique anhydre est refroidie à 0 °C puis du *n*-butyllithium (767 ml; 1,15 mol; 1,5 M/hexane) est ajouté, à 0 °C, pendant 30 min. Le mélange est agité à 0 °C pour 20 min puis une solution de 9-fluorénone (180 g; 1,0 mol) dans 300 ml de THF anhydre est additionnée à 0 °C pendant 30 min. La solution est agitée pour 2 h à température ambiante et 250 ml d'eau sont ajoutés. Les phases sont séparées et la phase organique lavée avec de l'eau (800 ml) puis avec de la saumure (800 ml). La saumure est jetée et les phases aqueuses combinées sont extraites avec de l'éther éthylique (2 x 200 ml). Toutes les phases organiques sont réunies puis évaporées jusqu'à l'obtention d'un solide puis du toluène (800 ml) et du HBr 48% (400 ml) aqueux sont ajoutés et le mélange est agité pour 24 h à température ambiante. Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite avec du toluène (400 ml). Les phases organiques sont combinées, séchées sur sulfate de sodium puis

évaporées à sec. Le résidu est recristallisé dans de l'isooctane pour donner le bromure **4** sous la forme d'un solide jaune .

Rendement : 70% (225 g; 0,70 mol).

P.f.: 98-100 °C (litt. 99 °C).³⁶

8.3.3 Acide (2S)-N-9-(9-PhF)glutamique γ -méthyl ester (5).³⁵

Dans un ballon de type Morton muni d'un agitateur mécanique, d'un condenseur à reflux et sous atmosphère d'azote, du chlorure de triméthylsilane (6,7 ml; 53 mmol) est ajouté à une suspension de l'acide (2S)-glutamique γ -méthyl ester (**3**; 8,1 g; 50 mmol) dans du chloroforme (100 ml). La suspension est chauffée à reflux pour 2 h puis refroidie à température ambiante. De la triéthylamine (14,6 ml; 105 mmol) est ensuite ajoutée goutte-à-goutte ainsi que du nitrate de plomb (9,9 g; 30 mmol) et une solution de 9-bromo-9-phénylfluorène (**4**; 19,3 g; 60 mmol) dans du chloroforme (125 ml). Le mélange est agité pour 3 jours à température ambiante, sous azote, puis du méthanol (35 ml) est ajouté. Après 15 min d'agitation rapide, le mélange est filtré et le filtrat est évaporé. Le résidu est ensuite partagé dans 170 ml d'acétate d'éthyle et 170 ml d'acide citrique 5 % aqueux. La phase organique est refroidie à 0 °C puis extraite successivement avec du NaOH aqueux (1 M; 2 x 65 ml) et de l'eau (2 x 35 ml). Les phases aqueuses combinées sont lavées avec de l'éther éthylique (65 ml). La phase aqueuse est ensuite acidifiée à pH=6 avec de l'acide acétique puis extraite avec plusieurs portions d'acétate d'éthyle pour récupérer complètement le produit (il est possible d'ajouter du NaCl solide à la phase aqueuse pour faciliter l'extraction). Les phases organiques sont combinées, séchées sur sulfate de sodium puis évaporées à sec. Le résidu obtenu est recristallisé dans de l'éther éthylique pour donner l'acide glutamique protégé **5** sous la forme d'un solide brunâtre.

Rendement: 85% (17 g; 42 mmol).

P.f.: 80-85 °C (litt. 142-143 °C).³⁵

RMN ¹H: (CDCl₃, 300 MHz) δ 1,65-1,90 (m, 2H); 2,37 (m, 2H); 2,64 (dd, 1H, *J* = 7,3; 4,8); 3,67 (s, 3H); 7,15-7,75 (m, 13H).

RMN ¹³C: (CDCl₃) δ 28,9; 30,2; 51,6; 55,3; 72,8; 174,2; 178,6.

FABSM: *m/e* 402 (7, [MH]⁺), 241 (100).

8.3.4 trichloroacétimide de *tert*-butyle (7).³⁹

Du NaH (0,82 g; 20,5 mmol; 60 % dans de l'huile) est ajouté, sous atmosphère d'azote, sur de l'éther éthylique anhydre (20 ml). De l'alcool *tert*-butylique (21 ml; 220 mmol) est ensuite additionné goutte-à-goutte et le mélange est agité pour 30 min à température ambiante. Le mélange est refroidi à 0 °C puis du trichloroacétonitrile (19 ml; 190 mmol) fraîchement distillé est ajouté goutte-à-goutte pendant 30 min à 0 °C. Le mélange est ensuite agité pour 1 h à température ambiante. La solution est évaporée à une huile puis du pentane (20 ml) contenant du méthanol (1 ml) sont ajoutés. Le mélange est agité vigoureusement pour ensuite être filtré et le filtrat évaporé à sec. Le trichloroacétimide de *tert*-butyle **7** qui est obtenu sous la forme d'un liquide brunâtre est conservé à 4 °C en solution dans le cyclohexane (1 M).

Rendement: 95% (39,3 g; 180 mmol).

RMN ¹H: (CDCl₃, 300 MHz) δ 1,58 (s, 9H); 8,25 (large s, 1H).

8.3.5. (2S)-N-9-(9-PhF)glutamate de α -*tert*-butyle- γ -méthyle (6).³⁸

À un solution de l'acide (2S)-N-9-(9-PhF)glutamique γ -méthyl ester (5; 15,5 g; 38,7 mmol) dans du dichlorométhane (40 ml) est ajouté du trichloroacétimide de *tert*-butyle (7; 77,4 ml; 77,4 mmol; 1 M/cyclohexane). Le mélange est agité 4 jours, à température ambiante et sous atmosphère d'azote, filtré puis une autre portion de trichloroacétimide de *tert*-butyle (1 M/cyclohexane; 38,7 ml; 38,7 mmol) est ajoutée au filtrat. Le mélange est agité pour une autre journée dans les mêmes conditions. La solution est filtrée de nouveau et le filtrat est évaporé à sec. Le résidu est chromatographié sur colonne-éclair de silice utilisant de l'hexane contenant 10 % d'acétate d'éthyle comme éluant. Le résidu est recristallisé dans de l'isooctane pour donner le diester 6 comme un solide blanc .

Rendement: 83% (14,7 g; 32,2 mmol).

P.f.: 99-100 °C (litt. 100 °C).³⁸

RMN ¹H: (CDCl₃, 300 MHz) δ 1,17 (s, 9H); 1,69 (dd, 2H, $J = 14,4; 7,2$); 2,25-2,55 (m, 3H); 3,65 (s, 3H); 7,15-7,75 (m, 13H).

RMN ¹³C: (CDCl₃) δ 27,7; 30,2; 51,3; 55,0; 72,7; 80,6; 173,8; 174,4.

FABSM: m/e 458 (41, [MH]⁺), 356 (28), 241 (100), 165 (35).

8.3.6 (2S,8S)-5-oxo-2,8-di-N-9-(9-PhF)amino azélate de di-*tert*-butyle (8).²⁴

Une solution du (2S)-N-9-(9-PhF)glutamate de α -*tert*-butyle- γ -méthyle (6; 14,29 g; 31,2 mmol) dans du THF anhydre (30 ml), sous atmosphère d'azote, est refroidie à -30 °C puis du NaHMDS (34,4 ml; 34,4 mmol; 1 M/THF) est additionné goutte-à-goutte pendant 45 min à -30 °C. Le mélange est agité à -30 °C pour 3h puis du NaH₂PO₄ aqueux (1M; 150 ml) et de l'acétate d'éthyle (90

ml) sont ajoutés. Les phases sont séparés et la phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3 x 90 ml). Les phases organiques combinées sont lavées avec de la saumure, séchées sur sulfate de sodium puis évaporées à sec. Le résidu est chromatographié sur colonne-éclair de silice utilisant de l'hexane contenant 10% d'acétate d'éthyle comme éluant. Le β -cétoester **9** résultant (9,0 g; 10,2 mmol) est ensuite dissout dans du dioxane (40,5 ml) puis du NaOH aqueux (1 M; 30,5 ml; 30,5 mmol) aqueux est ajouté. Le mélange est chauffé à reflux pour 30 min puis du NaH₂PO₄ (1M; 110 ml) et de l'acétate d'éthyle (110 ml) sont ajoutés. Les phases sont séparés et la phase aqueuse est extraite de l'acétate d'éthyle (3 x 80 ml). Les phases organiques combinées sont lavées avec de la saumure, séchées sur sulfate de sodium puis évaporées à sec. Le résidu est chromatographié sur colonne-éclair de silice utilisant de l'hexane contenant 15 % d'acétate d'éthyle comme éluant. La cétone **8** est obtenue comme un solide blanc.

Rendement: 62 % (8,0 g; 9,7 mmol).

P.f.: 129 °C (lit. 129 °C).²⁴

RMN ¹H: (CDCl₃, 300 MHz) δ 1,19 (s, 18H); 1,62 (m, 4H); 2,30-2,60 (m, 6H); 3,10 (d, 2H, $J=7,7$); 7,15-7,75 (m, 26H).

RMN ¹³C: (CDCl₃) δ 27,8; 29,3; 38,9; 55,2; 72,9; 80,7; 175,0; 209,9.

FABSM: m/e 826 (45, [MH]⁺); 568 (24), 241 (100), 217 (72), 181 (45).

8.3.7 (3S,6S,9S)-2-oxo-3-N-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate de méthyle (16).²⁴

À une solution du (2S,8S)-5-oxo-2,8-di-N-(9-PhF)amino azélate de di-*tert*-butyle (**8**; 2,76 g; 3,35 mmol) dans de l'éthanol anhydre (100 ml) contenant de l'acide acétique (10 ml), du palladium sur charbon (330 mg) est ajouté et le mélange est soumis à une pression de 6 atmosphère d'hydrogène. La réaction est agitée pour environ 24h à température ambiante pour ensuite être filtrée sur

un lit de terre de diatomée. Le filtre est lavé avec de l'éthanol 100% (80 ml) et le filtrat évaporé à sec. Cette manipulation est répétée une autre fois sur la même quantité de cétone **8** (2,76 g; 3,35 mmol). Les deux résidus combinés sont dissouts dans du dichlorométhane (92 ml) puis du HCl 6 M aqueux (92 ml) est ajouté. Le mélange à deux phases est agité pour 15 h à température ambiante pour ensuite être évaporé à sec. Une solution de HCl dans le méthanol est générée en additionnant goutte-à-goutte, à 0 °C, du chlorure d'acétyle (15 ml) sur du méthanol anhydre (125 ml). Le résidu sec de l'étape précédente est dissout dans du méthanol anhydre (50 ml) puis cette solution est additionnée à la solution de HCl dans le méthanol. Le mélange est agité pour 2 jours à température ambiante pour ensuite être évaporé à sec. Le résidu sec est ensuite dissout dans du dichlorométhane (150 ml) puis de la triéthylamine (3,3 ml; 24,0 mmol) est ajoutée. La solution est agitée à température ambiante pour 8 h. La réaction peut être suivie par spectroscopie de RMN du proton (Une réaction complète se traduit par la présence d'un seul pic singulet à 3,71 ppm dans CD₃OD). De la triéthylamine (1,2 ml; 8,5 mmol) et du (BOC)₂O (9,3 g; 42,5 mmol) sont ajoutés à la solution de l'étape précédente. Après 15 h d'agitation à température ambiante, du dichlorométhane (100 ml) et du NaH₂PO₄ aqueux (1 M; 100 ml) sont ajoutés. Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite avec du dichlorométhane (3 x 75 ml). Les phases organiques combinées sont lavées avec de la saumure, séchées sur sulfate de sodium puis évaporées à sec. Le résidu est chromatographié sur colonne-éclair de silice utilisant un gradient de 33-100 % d'acétate d'éthyle dans l'hexane. Le méthyl ester **16** est obtenu comme un solide blanc.

Rendement: 91% (1,90 g; 6,09 mmol).

P.f.: 111-112 °C (litt. 111-112 °C).²⁴

RMN ¹H: (CDCl₃, 300 MHz) δ 1,45 (s, 9H); 1,60-1,80 (m, 3H); 2,03-2,27 (m 4H); 2,47 (m, 1H); 3,70 (m épaulé, 1H); 3,75 (s, 3H); 4,16 (dd, 1H, *J* = 18,2; 7,9); 4,52 (d, 1H, *J* = 7,5), 5,53 (large d, 1H, *J* = 4,5).

RMN ¹³C: (CDCl₃) δ 26,4; 26,8; 27,8; 28,5; 31,7; 49,6; 51,8; 56,0; 57,6; 78,9; 155,8; 169,0; 172,2.

FABSM: *m/e* 313 (24, [MH]⁺), 257 (67), 213 (100), 197 (36).

8.3.8 Acide (3*S*,6*S*,9*S*)-2-oxo-3-*N*-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylique (2).²⁴

Une solution du (3*S*,6*S*,9*S*)-2-oxo-3-*N*-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylate de méthyle (16; 1,75 g; 5,61 mmol) dans du dioxane (8,5 ml) et du NaOH aqueux (1 M; 8,5 ml; 8,5 mmol) est agitée à température ambiante pour 1 h. La solution est ensuite acidifiée avec des cristaux d'acide citrique et extraite avec du chloroforme (3 x 80 ml). Les phases organiques combinées sont lavées avec de la saumure, séchées sur sulfate de sodium puis évaporées à sec. Le résidu est chromatographié sur colonne-éclair de silice utilisant un gradient de 1-5 % d'acide acétique dans de l'acétate d'éthyle. L'acide 2 est obtenu sous le forme d'un solide blanc.

Rendement: 89% (1,48 g; 4,97 mmol).

P.f.: 61-62 °C

RMN ¹H: (CDCl₃, 300 MHz) δ 1,44 (s, 9H); 1,60-1,80 (m, 3H); 2,05-2,30 (m, 4H); 2,41 (m, 1H); 3,70 (m, 1H); 4,22 (dd, 1H, *J* = 14,3; 8,2); 4,53 (d, 1H, *J* = 8,7); 5,65 (d, 1H, *J* = 4,5); 8,30 (large s, 1H).

RMN ¹³C: (CDCl₃) δ 26,5; 27,0; 28,3; 28,6; 32,0; 49,9; 57,1; 58,8; 79,8; 155,8; 170,6; 173,5.

SMHR: Calc. pour C₁₄H₂₃N₂O₅ ([MH]⁺) 299,1607; trouvé 299,1596.

8.4 Synthèse en solution du *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1).

8.4.1 (2*S*)-*N*-(BOC)aspartate de α-allyl-β-benzyle (BOC-Asp(OBn)-OAllyl, 17).^{42,43}

Une solution de l'acide (2*S*)-*N*-(BOC)aspartique β-benzyl ester (1,43 g; 4,43 mmol) dans de l'éthanol (4 ml) contenant de l'eau (1 ml) est traitée avec du bicarbonate de césium (0,95 g; 4,87 mmol) préalablement séché à l'étuve et refroidi dans un dessiccateur. La solution est agitée pendant 5 min à température ambiante puis évaporée à sec. Le résidu est dissout dans du benzène puis le solvant est évaporé à sec. Cette étape est répétée à quelques reprises pour enlever la majorité d'eau. Le sel de césium est ensuite séché dans un dessiccateur sous vide en présence de P₂O₅. Au sel de césium (4,43 mmol) dissout dans 30 ml de DMF, du bromure allylique (3,8 ml; 44,3 mmol) est ajouté. La solution est agitée pendant 12 h à température ambiante pour ensuite être filtrée et évaporée à sec. Le résidu est dissout dans du chloroforme (10 ml) et la solution est filtrée puis évaporée à sec. L'ester allylique 17 est obtenu sous la forme d'une huile claire et jaunâtre.

Rendement: 100 % (1,60 g; 4,42 mmol).

RMN ¹H: (CDCl₃, 300 MHz) δ 1,45 (s, 9H); 2,89 (dd, 1H, *J* = 18,2; 6,3); 3,08 (dd, 1H, *J* = 18,2; 6,3); 4,58-4,69 (m, 3H); 5,13 (s, 2H); 5,20-5,36 (m, 2H); 5,50 (d, 1H, *J* = 7,9); 5,85 (m, 1H); 7,36 (m, 5H).

RMN ¹³C: (CDCl₃) δ 28,2; 36,7; 49,9; 66,1; 66,6; 80,0; 118,5; 128,2; 128,3; 128,5; 131,4; 135,3; 155,2; 170,6 (2C).

FABSM: *m/e* 364 (24, [MH]⁺), 308 (71), 264 (86), 154 (33), 91 (100), 57 (48).

8.4.2 Trifluoroacétate du (2*S*)-aspartate de α-allyl β-benzyle (TFA-H₂N-Asp(OBn)-OAllyl, 18).

À une solution du (2*S*)-*N*-(BOC)aspartate de α-allyl β-benzyle (17; 1,60 g; 4,42 mmol) dans du dichlorométhane (34 ml), du TFA (6,8 ml; 88 mmol) est ajouté. La solution est agitée pendant 45 min à température ambiante puis évaporée à sec. Le sel de TFA 18 est obtenu comme une huile claire et brunâtre.

Rendement: 100 % (1,67 g; 4,42 mmol).

RMN ^1H : (CDCl_3 , 300 MHz) δ 3,21 (d, 2H, $J = 5,5$); 4,40 (t, 1H, $J = 6,3$); 4,64 (d, 2H, $J = 6,0$); 5,15 (s, 2H); 5,20-5,40 (m, 2H); 5,80 (m, 1H); 7,25-7,50 (m, 5H); 8,34 (large s, 3H).

8.4.3 BOC-IAA-Asp(OBn)-OAllyl (19).45

Une solution de l'acide (3*S*, 6*S*, 9*S*)-2-oxo-3-*N*-(BOC)amino-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylique (BOC-IAA-OH) (**2**; 0,113 g; 0,379 mmol) dans de l'acétonitrile (2,0 ml) est traitée avec du TBTU (0,134 g; 0,417 mmol) ainsi que de la triéthylamine (0,116 ml; 0,834 mmol). Après agitation rapide, une solution de trifluoroacétate du (2*S*)-aspartate de α -allyl β -benzyle (**18**; 0,157 g; 0,417 mmol) dans de l'acétonitrile (1,5 ml) est additionnée. Le mélange est agité à température ambiante pour 2 h puis de l'acétate d'éthyle (10 ml) ainsi que du NaOH aqueux (0,1 M; 7 ml) sont ajoutés. Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (2 x 5 ml). Les phases organiques combinées sont lavées avec du HCl aqueux (0,1 M; 2 x 5 ml) puis avec de la saumure. Les phases organiques sont séchées sur sulfate de sodium puis évaporées à sec pour donner le dipeptide **19**.

Rendement: 96 % (0,198 g; 0,365 mmol).

RMN ^1H : (CDCl_3 , 300 MHz) δ 1,44 (s, 9H); 1,51-1,70 (m, 3H); 1,88-2,18 (m, 3H); 2,35-2,50 (m, 2H); 2,92 (dd, 1H, $J = 12,6$; 3,6); 3,03 (dd, 1H, $J = 12,6$; 3,6); 3,64 (m, 1H); 4,17 (dd, 1H, $J = 19,0$; 10,9); 4,49 (d, 1H, $J = 8,3$); 4,58 (d, 2H, $J = 5,9$); 4,82 (m, 1H); 5,12 (s, 2H); 5,19-5,31 (m, 2H); 5,56 (d, 1H, $J = 4,9$); 5,84 (m, 1H); 7,34 (m, 5H); 7,59 (d, 1H, $J = 7,7$).

RMN ^{13}C : (CDCl_3 , 400 MHz) δ 26,6; 26,9; 28,0; 28,3; 32,4; 36,3; 48,9; 50,3; 56,7; 59,4; 66,4; 66,9; 79,6; 118,9; 128,3; 128,4; 128,6; 131,4; 135,3; 155,7; 170,0; 170,46; 170,52 (2C).

FABMS: m/e 544 (100, $[\text{MH}]^+$), 444 (77), 197 (88), 154 (80), 136 (60).

8.4.4 TFA·H₂N-IAA-Asp(OBn)-OAllyl (20).

À une solution du BOC-IAA-Asp(OBn)-OAllyl (19; 73 mg; 0,134 mmol) dans du dichlorométhane (2 ml), du TFA (0,2 ml; 2,6 mmol) est ajouté. La solution est agitée pendant 2 h à température ambiante puis évaporée à sec. Le sel de TFA 20 est obtenu comme une huile claire et brunâtre.

Rendement brut: 75 mg.

RMN ¹H: (CDCl₃, 300 MHz) δ 1,65 (m, 2H); 1,95-2,25 (m, 5H); 2,36 (m 1H); 2,99 (m, 2H); 3,59 (m, 1H); 4,03 (m, 1H); 4,42-4,66 (m, 3H); 4,85 (m, 2H); 5,09 (s, 2H); 5,16-5,35 (m, 2H); 5,80 (m, 1H); 7,33 (m, 5H); 7,85 (d, 1H, *J* = 7,7); 8,30 (large s, 3H).

8.4.5 BOC-IAA-Asp(OBn)-OH (21).⁴³

À une solution de BOC-IAA-Asp(OBn)-OAllyl (19; 72 mg; 0,133 mmol) dans du THF (1,33 ml) sous atmosphère d'azote, du Pd(PPh₃)₄ (15,4 mg; 0,0133 mmol) ainsi que de la morpholine (0,116 ml; 1,33 mmol) sont ajoutés. La solution est agitée pour 15 min à température ambiante, sous atmosphère d'azote et à la noirceur. Après évaporation à sec, du dichlorométhane (15 ml) est ajouté et la phase organique est extraite avec du HCl aqueux (0,1 M; 2 x 5 ml). La phase organique est lavée avec de la saumure, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée à sec. Le résidu est suspendu dans de l'éther éthylique (10 ml) puis la solution est filtrée. Le filtrat est évaporé à sec pour conduire à l'acide libre 21 sous la forme d'une huile jaunâtre.

Rendement brut: 61 mg.

RMN ¹H: (CDCl₃, 300 MHz) δ 1,44 (s, 9H); 1,49-1,74 (m, 3H); 1,90-2,18 (m, 3H); 2,34 (m, 2H); 2,98 (d, 2H, *J* = 2,9); 3,64 (m, 1H); 4,21 (dd, 1H, *J* = 19,0; 10,9); 4,54 (d, 1H, *J* = 8,0); 4,81 (m, 1H); 5,10 (d, 2H, *J* = 5,5); 5,75 (d, 1H, *J* = 6,5); 7,33 (m, 5H); 7,55 (d, 1H, *J* = 6,3).

8.4.6 BOC-IAA-Asp(OBn)-IAA-Asp(OBn)-OAllyl (22).⁴⁵

Au BOC-IAA-Asp(OBn)-OH (21; 17,6 mg; 0,035 mmol) dissout dans de l'acétonitrile (0,5 ml), du TBTU (14,0 mg; 0,0436 mmol) ainsi que de la triéthylamine (0,01 ml; 0,072 mmol) sont ajoutés. Après agitation rapide, du TFA·H₂N-IAA-Asp(OBn)-OAllyl (20; 19,8 mg; 0,035 mmol) est additionné. Le mélange est agité à température ambiante pour 12 h. Par la suite, de l'acétate d'éthyle (1 ml) ainsi que du NaOH aqueux (0,1 M; 1 ml) sont ajoutés. Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (2 x 2 ml). Les phases organiques combinées sont lavées avec du HCl aqueux (0,1 M; 2 x 2 ml) puis avec de la saumure. Les phases organiques sont séchées sur sulfate de sodium puis évaporées à sec pour donner le tétrapeptide 22 sous la forme d'une huile beige.

Rendement: 50% (16 mg; 0,017 mmol).

RMN ¹H: (CDCl₃, 300 MHz) δ 1,43 (s, 9H); 1,5-1,77 (m, 6H); 1,90-2,18 (m, 6H); 2,27-2,46 (m, 4H); 2,75-3,10 (m, 4H); 3,60 (m, 2H); 4,17 (dd, 1H, *J* = 18,0; 9,2); 4,28 (dd, 1H, *J* = 18,5; 9,0); 4,47 (m, 2H); 4,57 (d, 2H, *J* = 5,8); 4,85 (m, 2H); 5,11 (s épaulé, 2H); 5,13 (s épaulé, 2H); 5,18-5,34 (m, 2H); 5,65 (d, 1H, *J* = 5,0); 5,83 (m, 1H); 7,34 (m, 5H); 7,47 (d épaulé, 1H, *J* = 7,5); 7,52 (d épaulé, 1H, *J* = 7,9); 7,72 (d, 1H, *J* = 8,5).

FABSM: *m/e* 929 (9, [MH]⁺), 829 (100), 197 (60).

8.4.7 *cyclo*[IAA-Asp(OBn)-IAA-Asp(OBn)], (23).^{43,46}

Au BOC-IAA-Asp(OBn)-IAA-Asp(OBn)-OAllyl (**22**; 30,0 mg; 0,032 mmol) dans du THF (0,4 ml), sous atmosphère d'azote, du Pd(PPh₃)₄ (3,7 mg; 32 μmol) ainsi que de la morpholine (30 μl; 0,323 mmol) sont ajoutés. La solution est agitée pour 30 min à température ambiante, sous atmosphère d'azote et à la noirceur. Après évaporation du THF et de la majorité de la morpholine, 10 ml de dichlorométhane sont ajoutés et la phase organique est extraite avec du HCl aqueux (0,1 M; 2 x 4 ml). La phase organique est lavée avec de la saumure, séchée sur sulfate de sodium puis évaporée à sec. Le résidu sec est dissout dans du dichlorométhane (0,50 ml) puis du TFA (100 μl; 1,3 mmol) est ajouté. La solution est agitée pendant 30 min à température ambiante pour ensuite être rapidement évaporée à sec. Le sel de TFA est dissout dans du DMF (21,5 ml) puis du HOBT (13,0 mg; 0,0969 mmol) et du TBTU (31 mg; 0,0969 mmol) sont ajoutés. Après agitation rapide, du DIEA (34 μl; 0,194 mmol) est additionné et la solution est agitée pour 24 h à température ambiante. Le mélange est ensuite évaporé à sec et le résidu est suspendu dans de l'acétate d'éthyle (10 ml) et de l'eau (5 ml). Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (5 ml). Les phases organiques combinées sont lavées avec du HCl aqueux (0,1 M; 2 x 3 ml) et avec de l'eau (5 ml). Les phases organiques combinées sont séchées sur sulfate de sodium puis évaporées à sec. La totalité du peptide brut est ensuite purifié par HPLC semi-préparatif en phase inversée utilisant un gradient d'acétonitrile/eau contenant 0,1 % de TFA. Un gradient d'élution de 10-100 % d'acétonitrile en 45 min avec un débit de 10 ml/min est utilisé pour isoler le pic à 28,5 min qui correspond au peptide **23**.

Rendement: 31 % (8,0 mg; 0,010 mmol).

RMN ¹H: (CDCl₃, 300 MHz) δ 1,40 (s, 2H); 1,65 (s, 4H); 1,90-2,25 (m, 8H); 2,55 (s, 2H); 2,97-3,25 (m, 4H); 3,66 (s, 2H); 4,30 (s épaulé, 2H); 4,40 (s épaulé, 2H); 4,66 (s, 2H); 5,13 (s, 4H); 7,34 (s, 10H); 7,62 (s, 4H).

FABSM: *m/e* 772 (52, [MH]⁺), 108 (49), 91 (100).

Analyse par HPLC en phase inversée: Tr= 19,96 min (10-100 % acétonitrile/eau + 0,1 % TFA, sur 30 min à 1,5 ml/min).

8.4.8 *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp], (1).48

À une solution du *cyclo*[IAA-Asp(OBn)-IAA-Asp(OBn)] (**23**; 8,0 mg; 10 μ mol), sous atmosphère d'azote, dans du méthanol (1,5 ml) contenant 4,4 % d'acide formique, du noir de palladium (20 mg) est ajouté et le mélange est agité pour 15 min à température ambiante et sous atmosphère d'azote. Le mélange réactionnel est filtré sur un lit de terre de diatomée et le filtre est lavé avec du méthanol (2 ml). L'excès de méthanol est évaporé puis du palladium black (20 mg) est ajouté de nouveau. Le mélange est agité pour 45 min à température ambiante et sous atmosphère d'azote. Le mélange réactionnel est filtré sur un lit de terre de diatomée et le filtre est lavé avec du méthanol (2 ml) puis de l'eau (2 ml). Le filtrat est évaporé à sec puis le peptide déprotégé brut est purifié par HPLC semi-préparatif en phase inversée utilisant un gradient d'acétonitrile/eau contenant 0,1 % de TFA. Un gradient d'élution de 0-50 % d'acétonitrile en 50 min avec un débit de 9 ml/min est utilisé pour isoler le pic à 16,5 min qui correspond au peptide cyclique 1.

Rendement: 85 % (5,0 mg; 8,5 μ mol).

RMN ^1H : (DMSO- d_6 , pH = 4, 30 °C, 2 mM, 400 MHz) δ 1,12 (m, 2H); 1,50-1,73 (m, 4H); 1,83 (m, 2H); 2,04 (m, 4H); 2,14 (m, 2H); 2,32 (m, 2H); 2,72 (dd, 2H, $J = 16,4; 5,8$); 2,81 (dd, 2H, $J = 16,7; 4,9$); 3,76 (m, 2H); 4,24 (m; 6H); 7,4 (d, 2H, $J = 5,8$); 8,12 (d, 2H, $J = 7,8$).

SMHR: Calc. pour $\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{N}_6\text{O}_{10}$ ($[\text{MH}]^+$) 591,2415; trouvée 591,2400.

Analyse par HPLC en phase inversée: Tr= 14,39 min (0-50 % acétonitrile/eau + 0,1 % TFA, sur 25 min à 1,5 ml/min).

8.5 Synthèse de l'acide (2S)-N-(BOC)aspartique α -allyl ester (BOC-Asp-OAllyl, (2S)-24).

8.5.1 Acide (2S)-N-(BOC)aspartique ((2S)-26).⁶⁰

Une solution de l'acide (2S)-aspartique (10,0 g; 75,2 mmol) dans du dioxane (300 ml) et du NaOH aqueux (0,5 M; 300 ml) est refroidie à 0 °C et du (BOC)₂O (18 g; 83 mmol) est ajouté. Le mélange est agité pour 24 h à température ambiante. Le dioxane est par la suite évaporé et de l'acétate d'éthyle (400 ml) est additionné. Le mélange à deux phases est refroidi à 0 °C puis acidifié jusqu'à pH= 2-3 avec des cristaux d'acide citrique. Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (2 x 150 ml). Les phases organiques combinées sont lavées avec de l'eau (2 x 150 ml), avec de la saumure puis séchées sur sulfate de sodium et évaporées à sec. Le résidu est recristallisé dans de l'éther éthylique pour donner l'acide (2S)-N-(BOC)aspartique ((2S)-26) sous la forme d'un solide blanc .

Rendement: 66 % (11,5 g; 49,4 mmol).

P. f.: 117-119 °C (litt. 118-119 °C).⁸⁶

$[\alpha]_D^{20}$: -5,3 ° (c 1,1; CH₃OH; litt.: -5,5; c 1,0 CH₃OH).⁸⁶

RMN ¹H: (D₂O avec DOH comme référence δ = 4,80; 300 MHz) δ 1,36 (s, 9H); 2,85 (d, 2H, J = 4,5); 4,45 (t, 1H, J = 4,5).

8.5.2 Acide (4S)-3-(BOC)-5-oxo-4-oxazolidineacétique ((4S)-25).

À l'acide (2S)-N-(BOC)aspartique ((2S)-26; 3,0 g; 12,9 mmol) dissout dans du benzène (117 ml) et du DMF (13 ml), du paraformaldéhyde (1,8 g; 45 mmol) ainsi que de l'acide *p*-toluènesulfonique (0,74 g; 3,9 mmol) sont ajoutés.

Le mélange est porté à reflux pour 8 h dans un montage de Dean-Stark.⁶¹ Après évaporation des solvants, le résidu est chromatographié sur colonne-éclair de silice utilisant un mélange 1/1 d'hexane/acétate d'éthyle contenant 1 % d'acide acétique comme éluant. L'oxazolidinone (4*S*)-25 est recristallisée dans de l'acétate d'éthyle pour donner un solide blanc.

Rendement: 82 % (2,6 g; 10,6 mmol).

P. f.: 139 °C.

[α]_D²⁰: 145,6 ° (c 1,31; CH₃OH).

RMN ¹H: (CDCl₃, 300 MHz) δ 1,49 (s, 9H); 3,06 (dd, 1H, *J* = 17,9; 3,1); 3,21 (large s, 1H); 4,32 (large s, 1H); 5,25 (dd, 1H, *J* = 3,8; 1,3); 5,45 (large s, 1H); 10,52 (large s, 1H).

RMN ¹³C: (CDCl₃) δ 28,2; 34,5; 51,3; 78,5; 82,6; 152,1; 171,9; 175,4.

FABSM: *m/e* 246 (38, [MH]⁺), 190 (66), 146 (100).

8.5.3 Pureté énantiomérique de l'acide (4*S*)-3-(BOC)-5-oxo-4-oxazolidineacétique ((4*S*)-25) par la formation et l'analyse du (4*S*, 1'*S*)-3-(BOC)-5-oxo-4-oxazolidine acétate de *N'*-α-méthylbenzylamide ((4*S*, 1'*S*)-27).⁶³

Une solution de l'acide (4*S*)-3-(BOC)-5-oxo-4-oxazolidineacétique ((4*S*)-25; 24 mg; 0,10 mmol) dans de l'acétonitrile (2 ml) est traitée avec soit le (*R*)- ou le (*S*)-α-méthylbenzylamine (12 μl; 0,10 mmol) avec du TBTU (31 mg; 0,10 mmol) et de la triéthylamine (15 μl; 0,11 mmol). La solution est agitée pour 5 h à température ambiante puis de la saumure (5 ml) et de l'acétate d'éthyle (20 ml) sont ajoutés. Les phases sont séparées puis la phase organique est lavée avec de l'eau (2 x 20 ml) puis avec de la saumure. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium et évaporée à sec. Le résidu sec est directement analysé par RMN de ¹H. Lorsque du (*S*)-α-méthylbenzylamine à 99 % de pureté énantiomérique est utilisé, l'examen du signal des protons en position C₂ du cycle oxazolidinone (δ 5,33; 5,41), dans l'acétone-d₆, démontre une pureté

diastéréomérique de 98 % \pm 5 % pour l'amide (4*S*, 1'*S*)-27. Une pureté énantiomérique de 94-100 % est donc observée pour l'oxazolidinone (4*S*)-25.

(4*S*, 1'*S*)-3-(BOC)-5-oxo-4-oxazolidine acétate de *N'*- α -méthylbenzylamide ((4*S*, 1'*S*)-27).

Rendement brut: 35 mg.

RMN ¹H: (acétone-d₆, 400 MHz) δ 1,42 (d, 3H, $J = 7,1$); 1,45 (s, 9H); 2,88 (d, 1H, $J = 16,7$); 3,17 (dd, 1H, $J = 16,2; 4,5$); 4,28 (large s, 1H); 4,92 (large s, 1H); 5,03 (m; 1H); 5,33 (d, 1H, $J = 3,1$); 7,18-7,35 (m, 5H); 7,94 (d, 1H, $J = 9,5$).

(4*S*, 1'*R*)-3-(BOC)-5-oxo-4-oxazolidine acétate de *N'*- α -méthylbenzylamide ((4*S*, 1'*R*)-27).

Rendement brut: 34 mg.

RMN ¹H: (acétone-d₆, 400 MHz) δ 1,42 (d, 3H, $J = 7,1$); 1,50 (s 9H); 2,86 (d, 1H, $J = 17,0$); 3,17 (dd, 1H, $J = 17,1; 6,7$); 4,28 (large s, 1H); 5,05 (m, 1H); 5,16 (large s, 1H); 5,42 (d, 1H, $J = 3,3$); 7,18-7,35 (m, 5H); 7,94 (d, 1H, $J = 9,5$).

8.5.4 Acide (2*S*)-*N*-(BOC)aspartique α -allyl ester (BOC-Asp-OAllyl, (2*S*)-24).⁶²

Une solution d'allyloate de potassium est générée en dissolvant, à -20 °C et sous atmosphère d'azote, du potassium métallique (0,651 g; 16,7 mmol) dans de l'alcool allylique anhydre (10 ml). Après dissolution complète du solide, la solution est réchauffée à 0 °C puis est ajoutée goutte-à-goutte, pendant 10 min, à 0°C et sous atmosphère d'azote, à une solution de l'acide (4*S*)-3-(BOC)-5-oxo-4-oxazolidineacétique ((4*S*)-25; 1,94 g; 7,92 mmol) dans de l'alcool allylique anhydre (43 ml). Le mélange est agité à 0 °C pour 30 min puis réchauffé à température ambiante. De l'acide acétique (1,0 ml; 17,4 mmol) est

ajouté et le solvant est évaporé à sec. Le résidu est chromatographié sur colonne-éclair de silice utilisant un gradient de 20-30 % d'acétate d'éthyle dans l'hexane contenant 1 % d'acide acétique comme éluant. L'ester allylique (2S)-24 est obtenu comme une huile claire et jaunâtre.

Rendement: 36 % (0,779 g; 2,85 mmol).

RMN ¹H: (CDCl₃, 300 MHz) δ 1,45 (s, 9H); 2,87 (dd, 1H, *J* = 17,3; 4,5); 3,07 (dd, 1H, *J* = 17,3; 4,5); 4,60 (m épaulé, 1H); 4,65 (d épaulé, 2H, *J* = 5,7); 5,21-5,38 (m, 2H); 5,57 (d, 1H, *J* = 8,2); 5,90 (m, 1H); 8,90 (large s, 1H).

RMN ¹³C: (CDCl₃) δ 28,2; 36,5; 49,8; 66,3; 80,4; 118,7; 131,4; 155,5; 170,7; 175,8.

SMHR: Calc. pour C₁₂H₂₀N₁O₆ ([MH]⁺) 274,1273; trouvé 274,1291.

8.5.5 Pureté énantiomérique de l'acide (2S)-N-(BOC)aspartique α-allyl ester ((2S)-24) par la formation et l'analyse du (2S, 1'S)-N-(BOC)aspartate N'-α-méthylbenzylamide α-allyl ester ((2S, 1'S)-28).⁶³

Une solution de l'acide (2S)-N-(BOC)aspartique α-allyl ester ((2S)-24; 26 mg; 0,10 mmol) dans de l'acétonitrile (2 ml) est traitée avec soit le (*R*)- ou le (*S*)-α-méthylbenzylamine (12 μl; 0,10 mmol) avec du TBTU (31 mg; 0,10 mmol) et de la triéthylamine (15 μl; 0,11 mmol). La solution est agitée pour 5 h à température de la pièce puis de la saumure (5 ml) et de l'acétate d'éthyle (20 ml) sont ajoutés. Les phases sont séparées puis la phase organique est lavée avec de l'eau (2 x 20 ml) puis avec de la saumure. Les phases organiques sont séchées sur sulfate de sodium et évaporées à sec. Le résidu sec est directement analysé par RMN de ¹H. Lorsque du (*S*)-α-méthylbenzylamine de 99 % de pureté énantiomérique est utilisé, l'examen du signal des protons vinyliques de l'ester allylique (δ 5,27; 5,31), dans l'acétone-d₆, démontre une pureté diastéréotopique de 91 % ± 5 % pour l'amide (2S, 1'S)-28. Une pureté énantiomérique de 87-97 % est donc observée pour l'ester allylique (2S)-24.

(2S, 1'S)-N-(BOC)aspartate N'- α -méthylbenzylamide α -allyl ester ((2S, 1'S)-28).

Rendement brut: 37 mg.

RMN ^1H : (acétone- d_6 , 300 MHz) δ 1,43 (m, 12H); 2,70 (dd, 1H, $J = 16,3; 4,3$); 2,86 (dd; 1H, $J = 16,3; 4,3$); 4,52 (m, 1H); 4,60 (m, 2H); 5,05 (m, 1H); 5,18 (m, 1H); 5,35 (m, 1H); 5,93 (m, 1H); 6,20 (large d, 1H, $J = 8,3$); 7,17-7,38 (m, 5H); 7,62 (d, 1H, $J = 7,7$).

(2S, 1'R)-N-(BOC)aspartate N'- α -méthylbenzylamide α -allyl ester ((2S, 1'R)-28).

Rendement brut: 37 mg.

RMN ^1H : (acétone- d_6 , 300 MHz) δ 1,43 (m, 12H); 2,74 (dd, 1H, $J = 16,0; 5,1$); 2,83 (dd, 1H, $J = 16,1; 6,0$); 4,46-4,57 (m, 3H); 5,0-5,18 (m, 2H); 5,30 (m, 1H); 5,87 (m, 1H); 6,27 (large d, 1H, $J = 8,3$); 7,18-7,38 (m, 5H); 7,60 (large d, 1H, $J = 7,7$).

8.6 Synthèse sur support solide de *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1).

8.6.1 Test à la ninhydrine pour la révélation des amines.⁷⁰

Préparation des solutions:

Une fraction de 2 ml d'une solution de KCN (65 mg) dans 100 ml d'eau est diluée à 100 ml avec de la pyridine fraîchement distillée sur de la ninhydrine.

Cette solution est additionnée à une solution de de phénol (40 g) dans 10 ml d'éthanol 95%-**Solution A**. De la ninhydrine (2,5 g) est dissoute dans 50 ml d'éthanol 95 %-**Solution B**.

Test:

Un échantillon de résine (2-5 mg) est placé dans un tube à essai puis 6 gouttes de la **solution A** et 2 gouttes de la **solution B** sont ajoutées. Parallèlement, une expérience contrôle est préparée en mélangeant uniquement 6 gouttes de la **solution A** et 2 gouttes de la **solution B** . Les tubes sont agités vigoureusement puis chauffés à 100 °C pour 10 min. La présence d'amines libres sur la résine se traduit par l'apparition d'une coloration bleue tandis que la couleur de l'expérience témoin demeure inchangée.

8.6.2 BOC-Asp(OCs)-OAllyl.⁴²

L'acide (2*S*)-*N*-(BOC)aspartique α -allyl ester ((2*S*)-**24**; 0,50 g; 1,83 mmol) est dissout dans de l'éthanol contenant 25 % d'eau (11 ml). Du carbonate de césium (0,36 g; 1,83 mmol), préalablement séché à l'étuve et refroidi dans un dessiccateur, est ensuite additionné. La solution est agitée pendant 5 min à température ambiante puis évaporée à sec. Le résidu est dissout dans du benzène puis le solvant est évaporé à sec. Cette étape est répétée à quelques reprises pour enlever la majorité d'eau. Le sel de césium est séché dans un dessiccateur sous vide en présence de P₂O₅ pour 12 h avant d'être utilisé à l'étape suivante.

8.6.3 BOC-Asp(OMer.)-OAllyl.⁴²

Une solution du BOC-Asp(OCs)-OAllyl (0,20 g; 0,50 mmol) dans du DMF (12,5 ml) est traitée avec du *p*-chlorométhyl copoly(styrène-1%-divinylbenzène), (2,5 g; résine de Merrifield contenant approximativement 1 mmol de

chlorométhyl par gramme de résine). La suspension est agitée pour 3 jours à 50 °C, filtrée et la résine lavée avec les solutions suivantes (4 ml/g de résine): DMF; DMF contenant 10 % d'eau; DMF; éthanol anhydre. La résine est par la suite séchée sous vide pour l'évaluation de la substitution par un titrage à l'acide picrique.

8.6.4 BOC-Asp(OPAB-BHA)-OAllyl.⁴²

En suivant la même procédure qu'au paragraphe 8.6.3, une solution de BOC-Asp(OCs)-OAllyl (0,40 g; 1,0 mmol) est traitée avec l' α -(*p*-chlorométhyl phénylacétamido)benzyl copoly(styrène-1 %-divinylbenzène), (5,0 g; résine PAB-BHA contenant approximativement 0,5 mmol de chlorométhyl par gramme de résine). La résine est ensuite soumise à un titrage à l'acide picrique pour l'évaluation de la substitution.

8.6.5 Titrage à l'acide picrique pour l'évaluation de la quantité d'esters d'acides aminés présents sur la résine.⁶⁹

Un échantillon soit de la résine de Merrifield chargée (47 mg) ou de la résine PAB-BHA chargée (49 mg) est traitée avec 1 ml de chacune des solutions pour les temps suivants: CH₂Cl₂ (1 x 1 min); CH₂Cl₂:TFA:anisole (73:25:2, 1 x 2 min et 2 x 15 min); CH₂Cl₂ (5 x 1 min); DIEA:CH₂Cl₂ (1:9, 2 x 2 min); CH₂Cl₂ (3 x 2 min). L'échantillon est ensuite séché puis traité avec 2 ml de chacune des solutions pour les temps suivants: acide picrique 0,1 M dans CH₂Cl₂ (2 x 3 min); CH₂Cl₂ (5 x 2 min). L'échantillon de résine est par la suite traité avec 2 ml de chacune des solutions pour les temps suivants, en conservant les filtrats:

DIEA:CH₂Cl₂ (1:9, 2 x 3 min); CH₂Cl₂ (3 x 2 min). Les filtrats combinés sont ensuite dilués à 100 ml avec de l'éthanol 95 %. L'absorbance est lue ($\lambda = 358$ nm, $\epsilon = 14500$) contre un blanc composé de 4 ml de DIEA:CH₂Cl₂ (1:9) et 6 ml de CH₂Cl₂ complétés à 100 ml avec de l'éthanol 95 %. Une substitution de 0,14 mmol d'amine libre/g est obtenue pour la résine de Merrifield contre 0,15 mmol d'amine libre/g pour la résine PAB-BHA.

8.6.6 BOC-IAA-Asp(OBn)-IAA-Asp(OMer.)-OAllyl.

La totalité de la résine BOC-Asp(OMer.)-OAllyl (2,5 g au départ) est placée dans un réacteur à synthèse peptidique puis est traitée avec les solutions pour les temps suivants (10 ml/g de résine): CH₂Cl₂ (1 x 1 min); CH₂Cl₂:TFA:anisole (73:25:2, 1 x 2 min et 2 x 15 min); CH₂Cl₂ (5 x 1 min), DIEA:CH₂Cl₂ (1:9, 2 x 2 min); CH₂Cl₂ (2 x 1 min); DMF (2 x 1 min). La présence d'amines libres est confirmée par un test à la ninhydrine positif. La résine est ensuite suspendue dans du DMF (7 ml/g de résine) puis traitée avec du BOC-IAA-OH (2; 0,149 g; 0,50 mmol), du TBTU (0,177 g; 0,55 mmol) ainsi que du DIEA (0,174 ml; 1,0 mmol). Le mélange est agité pour 12 h à température ambiante. La solution est retirée puis la résine est lavée avec les solutions pour les temps suivants: DMF (2,5 ml/g de résine), (1 x 1 min), DMF (10 ml/g de résine, 2 x 1 min), éthanol 100 % (10 ml/g de résine, 2 x 1 min). Un couplage complet est confirmé par un test à la ninhydrine négatif. Suivant le même protocole, en utilisant les mêmes quantités de réactifs, deux autres cycles de déprotection-couplage sont effectués pour coupler le BOC-Asp(OBn)-OH (0,162 g; 0,50 mmol) et le BOC-IAA-OH (2; 0,149 g; 0,50 mmol). Des tests à la ninhydrine positifs et négatifs ont suivis respectivement chaque étape de déprotection et couplage.

8.6.7 BOC-IAA-Asp(OBn)-IAA-Asp(OPAB-BHA)-OAllyl.

En suivant la même procédure qu'au paragraphe 8.6.6, la totalité de la résine BOC-Asp(OPAB-BHA)-OAllyl (5,0 g au départ) est placée dans un réacteur à synthèse peptidique puis trois cycles de déprotection-couplage sont effectués pour coupler le BOC-IAA-OH (2; 0,298 g; 1,0 mmol), le BOC-Asp(OBn)-OH (0,323 g; 1,0 mmol) et le second BOC-IAA-OH (2; 0,298 g; 1,0 mmol) utilisant du TBTU (0,353 g; 1,1 mmol) ainsi que du DIEA (0,348 ml; 2,0 mmol). Des tests à la ninhydrine positifs et négatifs ont suivis respectivement chaque étape de déprotection et couplage.

8.6.8 *cyclo*[IAA-Asp(OBn)-IAA-Asp(OMer.)]

La totalité de la résine BOC-IAA-Asp(OBn)-IAA-Asp(OMer.)-OAllyl (2,5 g au départ) est lavée avec du THF (6 ml/g de résine) puis suspendue dans du THF (10 ml/g de résine) sous atmosphère d'azote, traitée avec du Pd(PPh₃)₄ (58 mg; 0,050 mmol) ainsi que de la morpholine (0,44 ml; 5,0 mmol). Le mélange est agité pour 15 min à température ambiante, sous atmosphère d'azote et à l'abri de la lumière. La solution est retirée et la résine est lavée avec du THF (6 ml/g de résine, 2 x 1 min). Un autre cycle de déprotection est effectué en traitant la résine avec les mêmes quantités de réactifs. Le mélange est agité cette fois pour 1 h à température ambiante, sous atmosphère d'azote et à l'abri de la lumière. La solution est retirée et la résine est lavée avec les solutions pour les temps suivants: THF (6 ml/g de résine, 4 x 1 min); CH₂Cl₂ (10 ml/g de résine, 2 x 1 min). Par la suite, la résine est traitée avec les solutions pour les temps suivants (10 ml/g de résine): CH₂Cl₂ (1 x 1 min); CH₂Cl₂:TFA:anisole (73:25:2, 1 x 2 min et 2 x 15 min); CH₂Cl₂ (5 x 1 min); DIEA:CH₂Cl₂ (1:9, 2 x 2 min); CH₂Cl₂ (2 x 1 min); DMF (2 x 1 min). La présence d'amines libres est confirmée par des tests à la ninhydrine positifs. La résine est suspendue dans 18 ml de DMF et du TBTU (0,177 g; 0,55 mmol) ainsi que du DIEA (0,174 ml; 1,0 mmol) sont ajoutés. Le mélange est agité pour 6 h à température ambiante. La solution est retirée puis la résine est lavée avec les solutions pour les temps suivants: DMF (2,5 ml/g de résine; 1 x 1 min); DMF (10

ml/g de résine, 2 x 1 min); éthanol 100 % (10 ml/g de résine, 2 x 1 min). Une cyclisation complète est confirmée par des tests à la ninhydrine négatifs.

8.6.9 *cyclo*[IAA-Asp(OBn)-IAA-Asp(OPAB-BHA)] utilisant le TBTU comme réactif de cyclisation.

En suivant la même procédure qu'au paragraphe 8.6.8, la moitié de la résine BOC-Asp(OPAB-BHA)-OAllyl (2,5 g au départ) est déprotégée puis le peptide est cyclisé utilisant du TBTU (0,177 g; 0,55 mmol).

8.6.10 *cyclo*[IAA-Asp(OBn)-IAA-Asp(OPAB-BHA)] utilisant le HATU comme réactif de cyclisation.

En suivant la même procédure qu'au paragraphe 8.6.8, la moitié de la résine BOC-Asp(OPAB-BHA)-OAllyl (2,5 g au départ) est déprotégée puis le peptide est cyclisé utilisant du HATU (0,209 g; 0,55 mmol) au lieu du TBTU.

8.6.11 *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1).

Une fraction de la résine soit de *cyclo*[IAA-Asp(OBn)-IAA-Asp(OMer.)] (1,0 g de la résine chargée) ou *cyclo*[IAA-Asp(OBn)-IAA-Asp(OPAB-BHA)] cyclisé avec TBTU (0,95 g de la résine chargée) ou *cyclo*[IAA-Asp(OBn)-IAA-Asp(OPAB-BHA)] cyclisé avec HATU (2,0 g de la résine chargée) est placé dans un réacteur en teflon avec de l'anisole (0,5 ml/g). Du HF liquide (10 ml/g) est

condensé dans le réacteur à -78 °C et le mélange est agité pour 1 h à 0 °C. Le HF est évaporé à sec et le résidu est lavé avec plusieurs portions d'éther éthylique. Le peptide 1 brut est extrait avec de l'acide acétique puis la solution est lyophilisée après avoir ajouté un volume équivalent d'eau. Une fraction du matériel est purifiée par HPLC semi-préparatif en phase inversée utilisant un gradient d'acétonitrile/eau contenant 0,1 % de TFA. Un gradient d'élution de 0 à 50 % d'acétonitrile en 50 min avec un débit de 9 ml/min est utilisé pour isoler le pic à 16,5 min qui correspond au peptide cyclique 1.

***cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1) obtenu du clivage du *cyclo*[IAA-Asp(OBn)-IAA-Asp(OMer.)].**

Après lyophilisation, 11 mg de peptide brut est obtenu. Une fraction de 5,0 mg est purifiée par HPLC pour donner 2,4 mg de peptide.

Rendement global: 5 % (2,4 mg; 4,1 μ mol)

***cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1) obtenu du clivage du *cyclo*[IAA-Asp(OBn)-IAA-Asp(OPAB-BHA.)] cyclisé avec TBTU.**

Après lyophilisation, 65 mg de peptide brut est obtenu. Une fraction de 6,0 mg est purifiée par HPLC pour donner 2,0 mg de peptide.

Rendement global: 26 % (2,0 mg; 3,4 μ mol).

***cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1) obtenu du clivage du *cyclo*[IAA-Asp(OBn)-IAA-Asp(OPAB-BHA.)] cyclisé avec HATU.**

Après lyophilisation, 135 mg de peptide brut est obtenu. Une fraction de 7,4 mg est purifiée par HPLC pour donner 2,4 mg de peptide pur.

Rendement global: 25 % (2,4 mg; 4,1 μ mol).

RMN ^1H , SMHR: Voir paragraphe 8.4.8

FABMS: *m/e* 591 (31, [MH]⁺), 217 (100), 131 (97), 109 (74).

Analyse par HPLC en phase inversée: Tr= 14,39 min (0-50 % acétonitrile/eau + 0,1 % TFA, sur 25 min à 1,5 ml/min,)

8.7 Détermination des constantes de dissociation du *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1).

Les constantes de dissociation des acides carboxyliques du peptide 1 ont été déterminées à $\mu = 0,3$ (KCl), T = 25 °C par un titrage potentiométrique de 4 ml d'une solution aqueuse du peptide 1 (11,1 mM; 26,2 mg; 44,4 μ mol) préalablement ajustée à pH = 2,6 avec du HCl aqueux (0,985 M; 120 μ l). Du NaOH aqueux a été utilisé comme solution titrante (27,2 mM; aussi à $\mu = 0,3$; KCl). Une burette automatique «Radiometer ABU-12», un titrateur automatique «Radiometer TTT-2» et une électrode combinée «Radiometer GK2321C» ont été utilisés pour le titrage. Le nombre de protons installés au niveau des acides carboxyliques, à chaque volume de NaOH ajouté, est calculé par la différence entre la quantité totale théorique de protons présents en solution et la quantité de protons détectés à l'électrode^{79,80}. Les deux constantes de dissociation sont équivalentes aux pH lorsque 1,5 et 0,5 protons sont installés au niveau des acides carboxyliques.

pKa #1 = 3,2.

pKa #2 = 6,9.

8.8 Détermination de l'activité hydrolytique.

8.8.1 Préparation des solutions mères et des tampons.

Solution mère du *cyclo*[IAA-Asp-IAA-Asp] (1) 8,8 mM: Le peptide 1 (26,0 mg; 44,1 μ mol) est solubilisé dans un volume total de 5 ml d'un mélange d'eau:isopropanol 9:1.

Solution mère du 2,4-dinitrophénylacétate (2,4-DNPA) 1 mM: Le 2,4-dinitrophénylacétate (2,4-DNPA; 22,6 mg; 0,1 mmol) est solubilisé dans un volume total de 100 ml d'un mélange d'eau:isopropanol 9:1.

Solution mère de KCl 3M: Du KCl (22,4 g; 0,3 mol) est solubilisé dans un volume total de 100 ml d'un mélange d'eau:isopropanol 9:1.

Tampon formate de sodium/acide formique 0,5 M (pH = 3): Du formate de sodium (54,4 mg) et de l'acide formique (157 μ l) sont mis en solution dans un volume total de 10 ml d'un mélange d'eau:isopropanol 9:1.

Tampon acétate de sodium/acide acétique 0,5 M (pH = 4): De l'acétate de sodium (68,1 mg) et de l'acide acétique (239 μ l) sont mis en solution dans un volume total de 10 ml d'un mélange d'eau:isopropanol 9:1.

Tampon acétate de sodium/acide acétique 0,5 M (pH = 5): De l'acétate de sodium (271 mg) et de l'acide acétique (97 μ l) sont mis en solution dans un volume total de 10 ml d'un mélange d'eau:isopropanol 9:1.

Tampon MOPS 0,5 M (pH = 7): Du MOPS (1,045 g) est solubilisé dans un volume total de 10 ml d'un mélange d'eau:isopropanol 9:1 en ajustant le pH à 7 avec du NaOH aqueux (0,1 M).

8.8.2 Cinétique d'hydrolyse du 2,4-DNPA.

L'activité hydrolytique a été déterminée à $\mu = 0,3$ (KCl), $T = 35$ °C, dans un milieu 9:1 d'eau:isopropanol, en observant l'augmentation de l'absorbance à 410 nm d'une solution du 2,4-dinitrophénylacétate (2,4-DNPA; 0,01 mM) en présence du peptide 1 (0,1 mM) à différents pH. Des contrôles pour tous les pH ont été préparés pour déterminer l'activité hydrolytique des tampons seuls. Les solutions finales de 2 ml ont été préparées de la façon suivante en suivant l'ordre d'addition des solutions mères. Les absorbances au temps zéro correspondent aux absorbances des solutions après l'addition du substrat 2,4-DNPA. Les résultats sont compilés au chapitre 6.

Étapes	1 Eau:IPA 9:1	2 Tampons (selon pH)	3 Solution mère de KCl	4 Solution mère du peptide 1	5 Solution mère de 2,4-DNPA
pH = 3 contrôle	1580 μ l	200 μ l	200 μ l	---	20 μ l
pH = 3	1557 μ l	200 μ l	200 μ l	22,7 μ l	20 μ l
pH = 4 contrôle	1580 μ l	200 μ l	200 μ l	---	20 μ l
pH = 4	1557 μ l	200 μ l	200 μ l	22,7 μ l	20 μ l
pH = 5 contrôle	1580 μ l	200 μ l	200 μ l	---	20 μ l
pH = 5	1557 μ l	200 μ l	200 μ l	22,7 μ l	20 μ l
pH = 7 contrôle	1580 μ l	200 μ l	200 μ l	---	20 μ l
pH = 7	1557 μ l	200 μ l	200 μ l	22,7 μ l	20 μ l

Références

- 1) Pour une introduction aux protéines voir: (a) Rawn, J. D. *Traité de biochimie*; Renouveau Pédagogique:Montréal, 1990; pp. 49-147. (b) Stryer, L. *Biochemistry*; 2nd ed.; W. H. Freeman:New-York, 1981; pp. 9-102. (c) Lehninger, A. L. *Biochemistry*; 2nd ed.; Worth Publishers:New-York, 1975; pp.71-182.
- 2) Pour une introduction aux enzymes voir: (a) réf. 1a; pp. 149-208. (b) réf. 1b; pp.103-204. (c) réf. 1c; pp. 183-277. (d) Pour une approche chimique des enzymes voir: Fersht, A. *Enzyme Structure and Mechanism*, 2nd ed., W. H. Freeman:New-York, 1985.
- 3) Phrase tirée du discours de M. Mutter lors de la réception du prix Max Bergmann à la troisième conférence Max Bergmann, Bolzano (Italie), 7-9 octobre 1982 dont la version écrite étendue est présentée dans: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1985, 24, 639.
- 4) Voir par exemple: (a) Fox, S.; Nanthakumar, A.; Wilkström, M. Karlin, K. D.; Blackburn, N. J. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 24. (b) Pelletier, Y.; Reber, C. *Can. J. Chem.* 1995, 73, 249. (c) Solomon, E. I.; Tuczec, F.; Root, D. E.; Brown, C. A. *Chem. Rev.* 1994, 94, 827 et références citées. (d) Tanase T.; Watton, S. P.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* 1994, 116, 9401. (e) Karlin, K. D. *Science* 1993, 261, 701 et références citées.
- 5) Pour une introduction aux protéases voir: (a) *The Enzymes*; Boyer, P. D., Ed.; Academic Press:New York, 1971, Vol. 3. (b) Barrett, A. J.; McDonald, J. K. *Mammalian Proteases: A Glossary and Bibliography*, Academic Press:New York, 1980, Vol. 1 et 2.
- 6) Classes reconnues par «the International Union of Biochemistry and Molecular Biology».

- 7) (a) Komiyama, M.; Bender, M. L. *Biorg. Chem.* **1977**, *6*, 13. (b) Bender, M. L.; Kezdy, F. J. *Annu. Rev. Biochem.* **1965**, *34*, 49.
- 8) (a) Boland, M. J.; Hardman, M. J.; *FEBS Lett.* **1972**, *27*, 282. (b) Hussain, S. S.; Lowe, G. *Biochem. J.* **1968**, 855.
- 9) (a) Keillor, J. W.; Brown, R. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7983. (b) Lochon, P. Schoenleber, J. *Tetrahedron* **1976**, *32*, 3023.
- 10) Heller, M. J.; Walder, J. A.; Klotz, I. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 2780.
- 11) (a) Jones, R. C. F.; Tankard, M.; Higton, A. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1991**, *1*, 353. (b) V. T. D'Souza, Bender, M. L. *Acc. Chem. Res.* **1987**, *20*, 146. (c) Cram, D. J.; Lam, P. Y.-S.; Ho, S. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 839.
- 12) (a) réf. 3 et références citées. (b) Nishi, N. *Peptide Chemistry* **1978**, 151.
- 13) (a) Vorherr, T.; Altmann, K.-H.; Mutter, M. *Helv. Chim. Acta* **1986**, *69*, 410. (b) Photaki, I.; Sakarellou-Daitsiotou, M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1976**, 589. (c) Sheehan, J. C.; Bennett, G. B.; Schneider, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 3455.
- 14) (a) Ishida, H.; Donowaki, K.; Suga, M.; Shimose, K.; Ohkubo, K. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 8987. (b) Schultz, R. M.; Huff, J. P.; Anagnostaras, P.; Olsher, U.; Blout, E. R. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1982**, *19*, 454. (c) Mitchell, A. R.; Gupta, S. K.; Roeske, R. W. *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 2877. (d) Kopple, K. D.; Nitecki, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 4457. (e) Sheehan, J. C.; McGregor, D. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 3000.
- 15) Pour une introduction aux protéases aspartiques voir: (a) *Aspartic Proteinases: Structure, Function, Biology, and Biomedical Applications*; Takahashi, K., Ed.; Plenum:New York, 1995. (b) *Aspartic Proteinases and Their Inhibitors*; Proceedings of FEBS Advanced Course No. 84/07; Kosta, V.; Ed.; Walter de Gruyter:Berlin, 1985.

- 16) Pearl, L.; Blundell, T. *FEBS Lett.* **1984**, *174*, 96.
- 17) Fruton, J. S. dans *The Enzymes*; Boyer, P. D. Ed.; Academic Press:London, 1981; Vol. 3, pp. 119-164.
- 18) Fruton., J. S. dans *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*; Meister, A. Ed.; John Wiley and Sons, Inc.:New York, 1976; Vol. 44, pp. 1-36.
- 19) (a) Hyland, L. J.; Tomaszek, T. A., Jr.; Roberts, G. D.; Carr, S. A.; Maggaard, V. W.; Bryan, H. L.; Fahkoury, S. A.; Moore, M. L.; Minnich, M. D.; Culp, J. S.; DesJarais, R. L.; Meek, T. D. *Biochemistry* **1991**, *30*, 8441. (b) Hyland, L. J.; Tomaszek, T. A., Jr.; Meek, T. D. *Biochemistry* **1991**, *30*, 8454.
- 20) Somayaji, V.; Keillor, J.; Brown, R. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2625.
- 21) Kemp, D. S.; Petrakis, K. S. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 5140.
- 22) (a) Curran, T. P.; Borysenko, C. W.; Abelleira, S. M.; Messier, R. J. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 3522. (b) Menger, F. M.; Lakida, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6794.
- 23) Uchida, H.; Achiwa, K. *SYNLETT* **1996**, 969.
- 24) Lombart, H.-G.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9437.
- 25) (a) Nagai, U.; Sato, K.; *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 647. (b) Baldwin, J. E.; Hulme, C.; Schofield, C. J.; Edwards, A. J. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 935. (c) Robl, J. A. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 393. (d) Hanessian, S.; Ronan, B.; Laoui, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 1397. (e) de la Figuera, N.; Rozas, I.; Garcia-Lopez, M. T.; Gonzalez-Muniz, R. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 613. (f) Mueller, R.; Revesz, L. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 4091.

- 26) Goodman, J.; Still, W. C. *J. Comput. Chem.* **1991**, *12*, 1110.
- 27) Chang, G.; Guida, W. C.; Still, W. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4379.
- 28) Mohamadi, D.; 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.
- 29) McDonald, D. Q.; Still, W. C. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 7743.
- 30) Still, W. C.; Tempczyk, A.; Hawley, R. C.; Hendrickson, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6127.
- 31) Ozeki, E.; Kimura, S.; Imanishi, Y. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1989**, *34*, 111.
- 32) Venkatachalam, C. M. *Biopolymers* **1968**, *6*, 1425.
- 33) Arnott, S.; Dover, S. D.; Elliott, A. *J. Mol. Biol.* **1967**, *30*, 201.
- 34) Hanby, W. E.; Waley, S. G.; Watson, J. *J. Chem. Soc.* **1950**, 3239.
- 35) (a) Koskiner, A. M. P.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 1859. (b) Jamison, T.F.; Rapoport, M. *Org. Synth.*, **1992**, *71*, 226.
- 36) Jamison, T. F.; Lubell, W. D.; Dener, J. M.; Krisché, M. J.; Rapoport, H. *Org. Synth.* **1992**, *71*, 220.
- 37) (a) Christie, B. D.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 1239. (b) Lubell, W. D.; Rapoport, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 236.
- 38) (a) Armstrong, A.; Brackenridge, I.; Jackson, R. F. W.; Kirk, J. M.; *Tetrahedron Lett.* **1988**, *20*, 2483. (b) Yue, C.; Thierry, J.; Potier, P. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 323.

- 39) Wessel, H. P.; Iversen, T.; Bundle, D. R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1985**, 2247.
- 40) Gierasch, L. M.; Deber, C. M.; Madisson, V.; Niu, C.-H.; Blout, E. R. *Biochemistry* **1981**, *20*, 4730.
- 41) Bednarek, M. I.; Bodansky, M. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1983**, *21*, 196.
- 42) Gisin, B. F. *Helv Chim. Acta* **1973**, *56*, 1476.
- 43) Kunz, H.; Waldmann, H.; Unverzagt, C. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1985**, *26*, 493.
- 44) Castro, B.; Dormoy, J. R.; Evin, G.; Selve, C. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *14*, 1219.
- 45) Dourtoglou, V.; Ziegler, J.-C.; Gross, B. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *15*, 1269.
- 46) Zimmer, S.; Hoffmam, E.; Jung, G.; Kessler, H. *Liebigs Ann. Chem.* **1993**, 497.
- 47) Perseo, G.; Forino, R.; Galantino, M.; Gioia, B.; Malatesta, V.; Castiglione, R. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1986**, *27*, 51.
- 48) Yagi, H.; Thakker, D.-R.; Lehr, R. E.; Jerina, D. M. *J. Org. Chem.* **1979**, *19*, 3442.
- 49) Merrifield, R. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149.
- 50) Barany, G.; Kneib-Cordonier, N.; Mullen, D. G. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1987**, *30*, 705.

- 51) Kates, S. A.; Solé, N. A.; Albericio, F.; Barany, G. In *Peptides: Design, Synthesis, and Biological Activity*. Basava, C.; Anantharamaiah, G. M. Eds. Birkhäuser:Boston. 1994; p.39.
- 52) Sklyarov, L. Y.; Shashkova, I. V. *J. Gen. Chem. USSR (Engl. Transl.)* **1969**, *39*, 2714.
- 53) Isied, S. S.; Kuehn, C. G.; Lyon, J. M.; Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 2632.
- 54) Trzeciak, A.; Bannwarth, W. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *32*, 4557.
- 55) Kates, S. A.; Solé, N. A.; Johnson, C. R.; Hudson, D.; Barany, G.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1549.
- 56) Rovero, P.; Quartara, L.; Fabbri, G. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *23*, 2639.
- 57) Fattorusso, R.; Morelli, G.; Lombardi, A.; Nastri, F.; Maglio, O.; D'Auria, G.; Pedone, C.; Pavone, V. *Biopolymers (Peptide Science)* **1995**, *37*, 401.
- 58) Spatola, A. F.; Darlak, K.; Romanovskis, P. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *5*, 591.
- 59) Valero, M.-L.; Giralt, E.; Andreu, D. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4229.
- 60) Bodanski, M.; Bodanski, A. *The Practice of Peptide Synthesis*; Springer-Verlag:Berlin; Heidelberg; New-York, 1984; p.20.
- 61) Ben-Ishai, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 5736.
- 62) Hanessian, S.; Sahoo, S. P. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *14*, 1425
- 63) Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bannwarth, W.; Gillesen, D. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927.
- 64) Fraser, J. L.; Jackson, R. F. W.; Porter, B. *Synlett* **1995**, 819.

- 65) Merrifield, R. B. *Biochemistry* **1964**, *9*, 1385.
- 66) Giralt, E.; Andreu, D.; Rafecas, L. *Tetrahedron Lett.* **1979**, 3587.
- 67) Marshall, G. R.; Merrifield, R. B.; *Biochemistry* **1965**, *4*, 2394.
- 68) Giralt, E.; Andreu, D.; Pons, M.; Pedroso, E. *Tetrahedron* **1981**, *37*, 2007.
- 69) Gisin, B. F. *Anal. Chim. Acta* **1972**, *58*, 248.
- 70) Sarin, V. K.; Kent, S. B. H.; Tam, J. P.; Merrifield, R. B. *Anal. Biochem.* **1981**, *117*, 147.
- 71) Carpino, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397.
- 72) Kessler, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 512 et références citées.
- 73) Spatola, A. F.; Anwer, M. K.; Rao, M. N. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1992**, *40*, 322.
- 74) Wüthrich, K. J.; Pardi, A.; Billeter, M. *J. Mol. Biol.* **1984**, *180*, 741.
- 75) (a) Pachler, K. G. R. *Spectrochim. Acta* **1964**, *20*, 581. (b) Tourwé, D.; Verschueren, K.; Frycia, A.; Davis, P.; Porreca, F.; Hruby, V. J.; Toth, G.; Jaspers, H.; Verheyden, P.; Van Binst, G. *Biopolymers* **1996**, *38*, 1.
- 76) Bara, Y. A.; Friedrich, A.; Kessler, H.; Molter, M. *Chem. Ber.* **1978**, *111*, 1045.
- 77) Urry, D. W.; Ohnishi, T.; Long, M. M.; Mitchell, L. W. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1975**, *7*, 367.
- 78) Albert, A.; Sergeant, E. P. *Ionisation Constants of Acids and Bases*; Wiley:New-York, 1962; p. 52.

- 79) Simms, H. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1926**, *48*, 1239.
- 80) Le programme utilisé a été mis au point par Dr J. Keillor de l'Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre Ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7.
- 81) réf. 1a; p. 59.
- 82) (a) Bender, M. L.; Turnquest, B. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 1656.
(b) Bruice, T. C.; Lapinski, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 2265.
- 83) Bender, M. L.; Neveu, M. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 5388.
- 84) Somayaji, V.; Brown, R. S. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2676.
- 85) (a) Rosenzweig, A. C.; Frederick, C. A.; Lippard, S. J.; Nordlund, P. *Nature* **1993**, *366*, 537. (b) Vincent, J. B.; Crowder, M. W.; Averill, B. A.; *Trends Biochem. Sci.* **1992**, *17*, 105. (c) Hansen, S.; Hansen, L. K.; Hough, E. J. *Mol. Biol.* **1992**, *225*, 543.
- 86) Schröder, E.; Klieger, E. *Liebigs Ann. Chem.* **1964**, *673*, 208.

ANNEXES

Rapport (.log) de la recherche MonteCarlo du *cyclo[IAA-Asp-IAA-Asp]* (1).

xiv

Final report:

72 unique conformations found

18 minimized with good convergence

Found 8 confs within 1.00 kcal/mol (4.18 kJ/mol) of glob. min.
Found 9 confs within 2.00 kcal/mol (8.37 kJ/mol) of glob. min.
Found 13 confs within 3.00 kcal/mol (12.55 kJ/mol) of glob. min.
Found 19 confs within 5.00 kcal/mol (20.92 kJ/mol) of glob. min.
Found 47 confs within 10.00 kcal/mol (41.84 kJ/mol) of glob. min.
Global minimum E = -142.87 found 11 times.

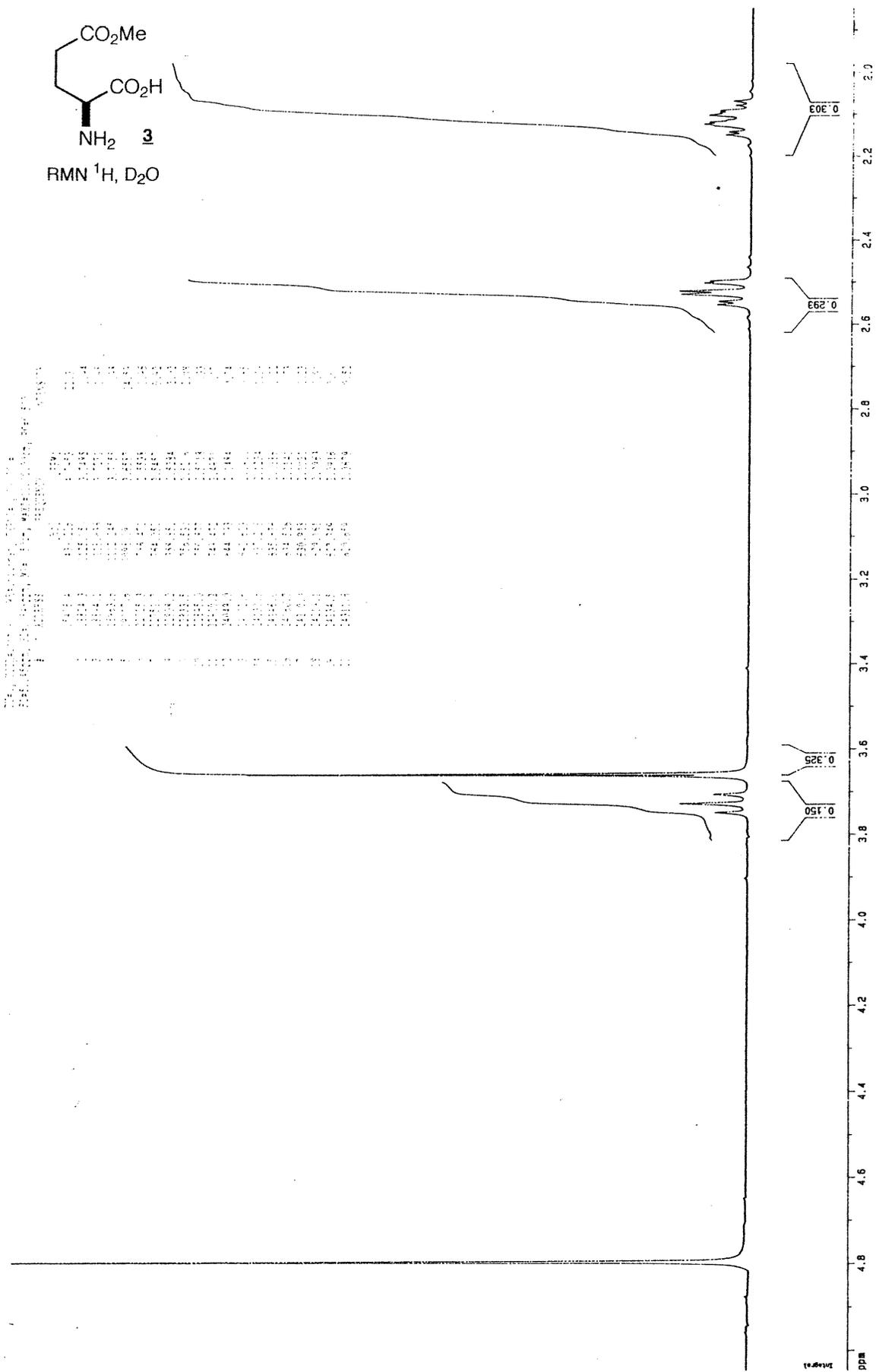
BatchMin normal termination

Total number of structures processed = 1000

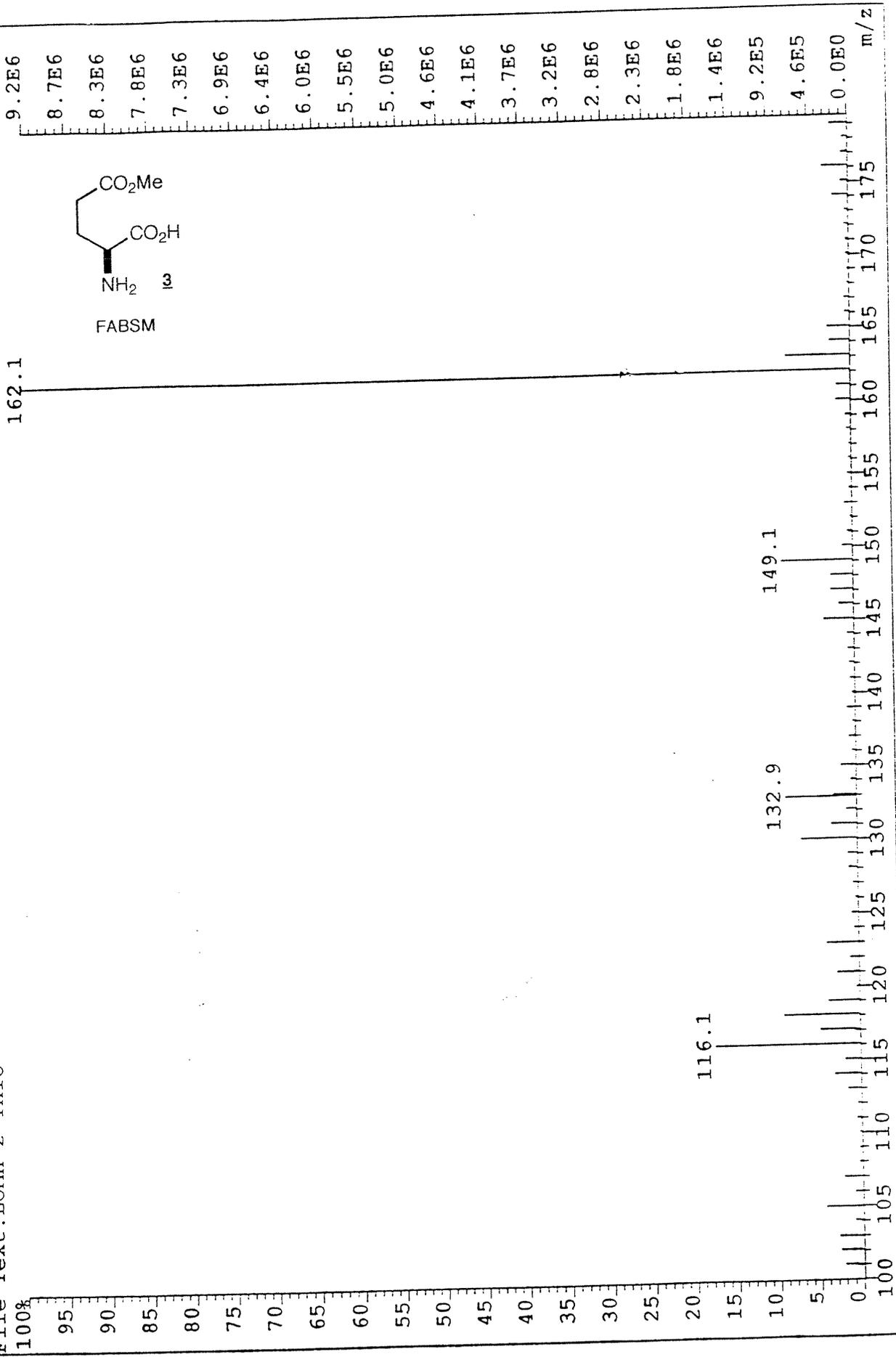
Conformations with poor convergence marked with a *

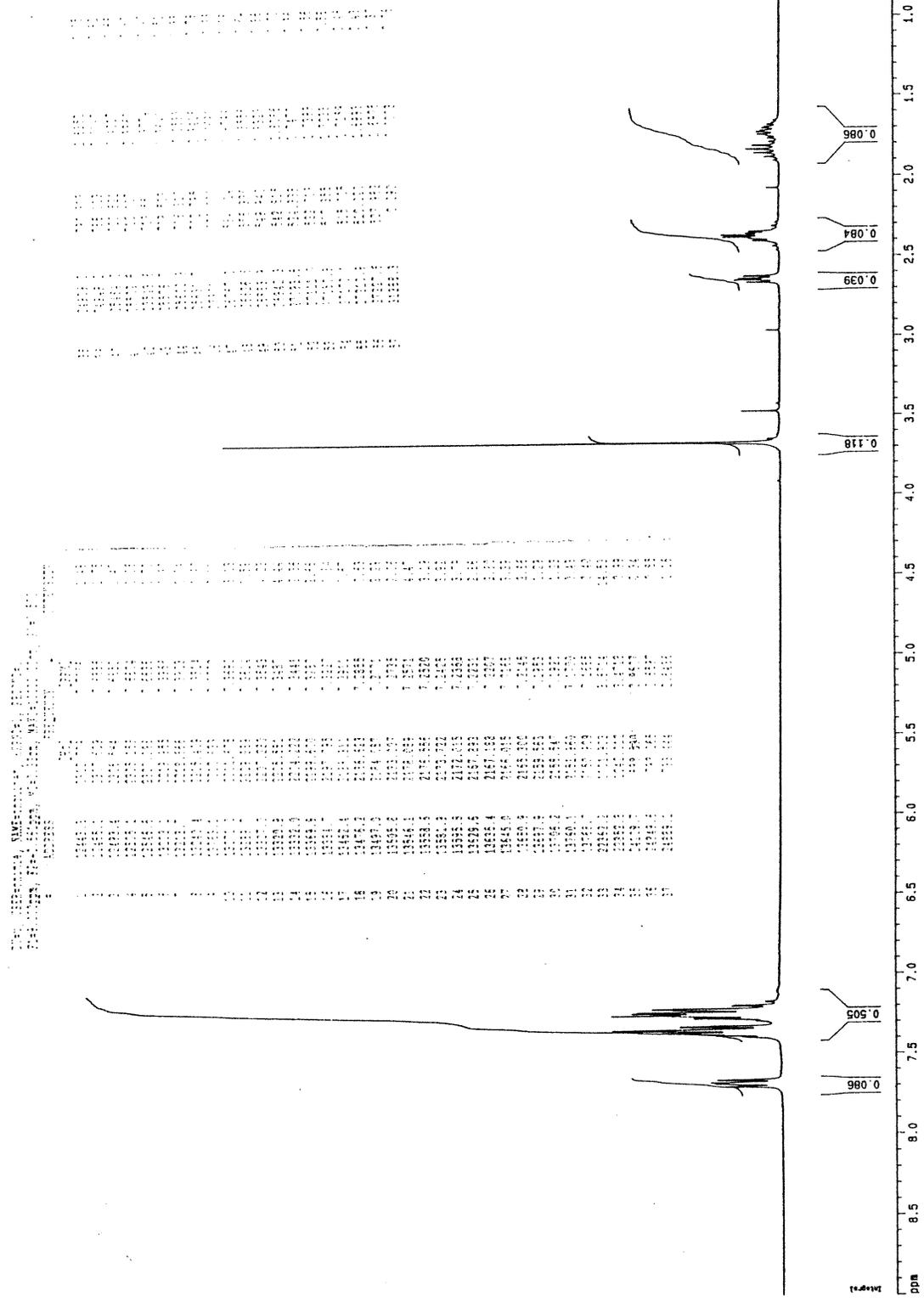
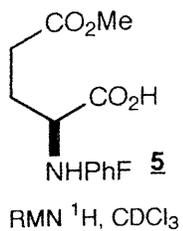
*Conformation	1 (-142.9	kJ/mol)	was found	11 times
Conformation	2 (-142.9	kJ/mol)	was found	13 times
*Conformation	3 (-142.0	kJ/mol)	was found	2 times
*Conformation	4 (-141.6	kJ/mol)	was found	1 times
*Conformation	5 (-141.4	kJ/mol)	was found	1 times
*Conformation	6 (-140.6	kJ/mol)	was found	1 times
*Conformation	7 (-140.3	kJ/mol)	was found	1 times
*Conformation	8 (-139.9	kJ/mol)	was found	1 times
*Conformation	9 (-138.3	kJ/mol)	was found	1 times
*Conformation	10 (-132.0	kJ/mol)	was found	3 times
*Conformation	11 (-131.9	kJ/mol)	was found	4 times
*Conformation	12 (-131.6	kJ/mol)	was found	2 times
*Conformation	13 (-131.0	kJ/mol)	was found	1 times
*Conformation	14 (-127.7	kJ/mol)	was found	1 times
*Conformation	15 (-127.6	kJ/mol)	was found	1 times
*Conformation	16 (-127.6	kJ/mol)	was found	1 times
*Conformation	17 (-124.2	kJ/mol)	was found	5 times
*Conformation	18 (-124.2	kJ/mol)	was found	3 times
*Conformation	19 (-123.9	kJ/mol)	was found	1 times
*Conformation	20 (-121.5	kJ/mol)	was found	1 times
*Conformation	21 (-120.2	kJ/mol)	was found	3 times
*Conformation	22 (-119.7	kJ/mol)	was found	1 times
*Conformation	23 (-118.5	kJ/mol)	was found	1 times
*Conformation	24 (-118.5	kJ/mol)	was found	2 times
Conformation	25 (-118.5	kJ/mol)	was found	3 times
*Conformation	26 (-117.5	kJ/mol)	was found	1 times
*Conformation	27 (-115.7	kJ/mol)	was found	1 times
*Conformation	28 (-115.7	kJ/mol)	was found	3 times
Conformation	29 (-115.4	kJ/mol)	was found	5 times
*Conformation	30 (-115.4	kJ/mol)	was found	1 times
*Conformation	31 (-115.0	kJ/mol)	was found	1 times
*Conformation	32 (-115.0	kJ/mol)	was found	1 times
Conformation	33 (-112.4	kJ/mol)	was found	2 times
*Conformation	34 (-112.2	kJ/mol)	was found	1 times
Conformation	35 (-112.1	kJ/mol)	was found	1 times
*Conformation	36 (-111.4	kJ/mol)	was found	1 times
*Conformation	37 (-110.5	kJ/mol)	was found	1 times
*Conformation	38 (-109.5	kJ/mol)	was found	1 times
*Conformation	39 (-109.1	kJ/mol)	was found	1 times
*Conformation	40 (-108.2	kJ/mol)	was found	1 times
Conformation	41 (-107.8	kJ/mol)	was found	3 times
*Conformation	42 (-107.4	kJ/mol)	was found	1 times
*Conformation	43 (-105.8	kJ/mol)	was found	1 times
*Conformation	44 (-104.5	kJ/mol)	was found	3 times
Conformation	45 (-103.4	kJ/mol)	was found	1 times
Conformation	46 (-101.9	kJ/mol)	was found	4 times
*Conformation	47 (-101.6	kJ/mol)	was found	1 times
*Conformation	48 (-100.8	kJ/mol)	was found	1 times
Conformation	49 (-99.91	kJ/mol)	was found	6 times
Conformation	50 (-99.91	kJ/mol)	was found	1 times
Conformation	51 (-99.80	kJ/mol)	was found	1 times
*Conformation	52 (-99.80	kJ/mol)	was found	1 times

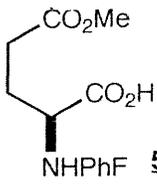
Conformation	53	(-99.79	kJ/mol)	was found	7 times
Conformation	54	(-99.79	kJ/mol)	was found	3 times
*Conformation	55	(-99.11	kJ/mol)	was found	1 times
*Conformation	56	(-98.20	kJ/mol)	was found	1 times
*Conformation	57	(-98.11	kJ/mol)	was found	1 times
*Conformation	58	(-98.09	kJ/mol)	was found	1 times
*Conformation	59	(-97.88	kJ/mol)	was found	1 times
Conformation	60	(-97.85	kJ/mol)	was found	2 times
*Conformation	61	(-97.84	kJ/mol)	was found	1 times
*Conformation	62	(-96.72	kJ/mol)	was found	1 times
*Conformation	63	(-96.63	kJ/mol)	was found	1 times
Conformation	64	(-96.63	kJ/mol)	was found	1 times
*Conformation	65	(-96.22	kJ/mol)	was found	1 times
*Conformation	66	(-96.08	kJ/mol)	was found	1 times
Conformation	67	(-95.16	kJ/mol)	was found	1 times
*Conformation	68	(-94.16	kJ/mol)	was found	1 times
*Conformation	69	(-93.31	kJ/mol)	was found	1 times
*Conformation	70	(-93.17	kJ/mol)	was found	1 times
Conformation	71	(-92.88	kJ/mol)	was found	3 times
Conformation	72	(-92.88	kJ/mol)	was found	2 times



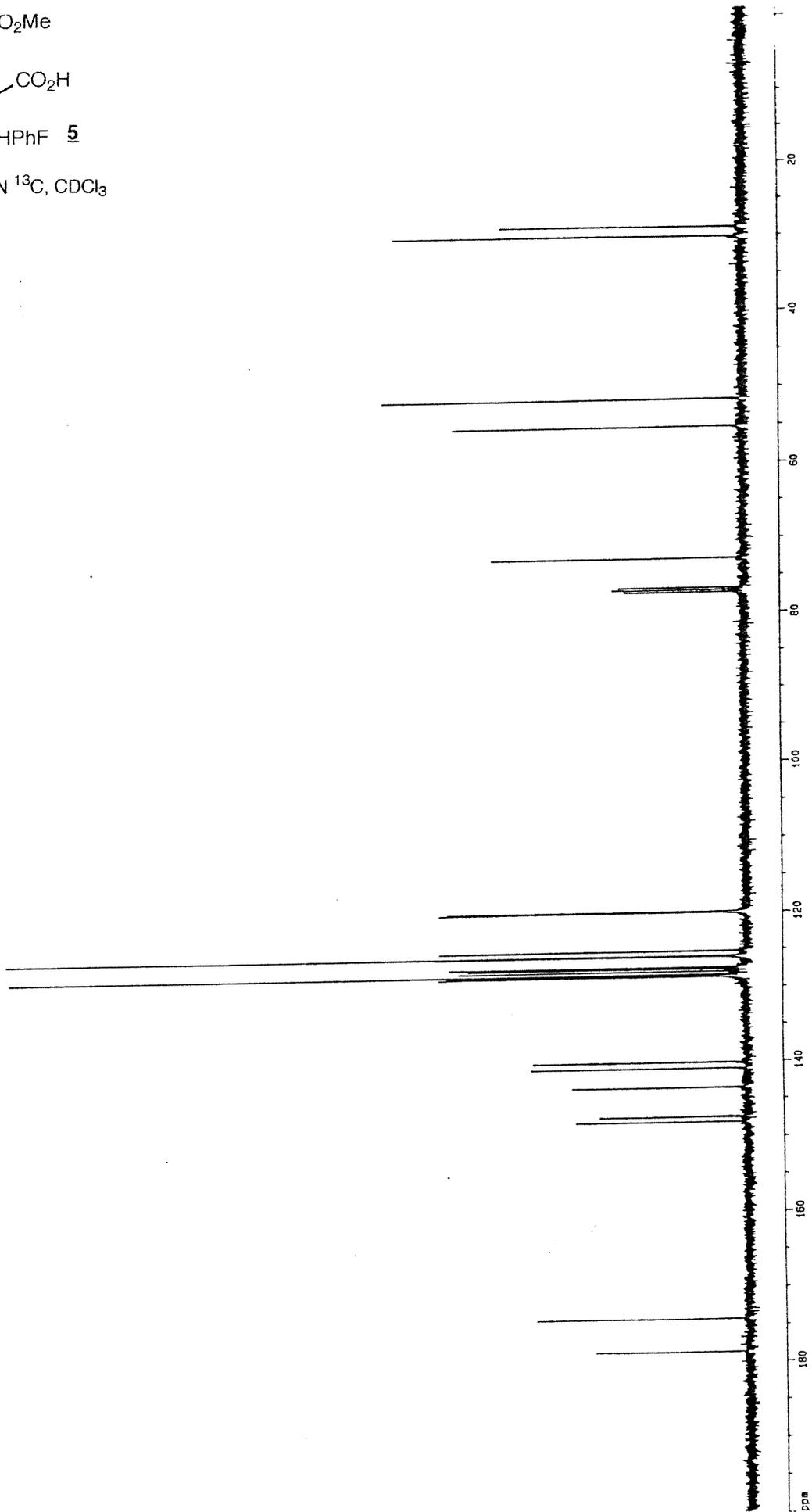
File: V95H0937FAZ06 Ident: 3 Acq: 9-AUG-1995 14:10:03 +0:25 Cal: GO_1
AutoSpecQ FAB+ Magnet BpI: 9179393 TIC: 34895240 Flags: HALL
File Text: LOMH-2-THIO







RMN ^{13}C , CDCl_3



DMU: USER=chimie, NAME=hal-5, EXPNO=1, PROCNO=1
 F1=234.674ppm, F2=-13.801ppm, M1=1.73cm, MAXI=10000.00cm, PC=1.000

13-C

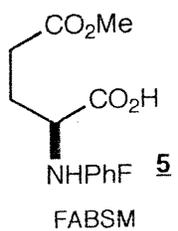
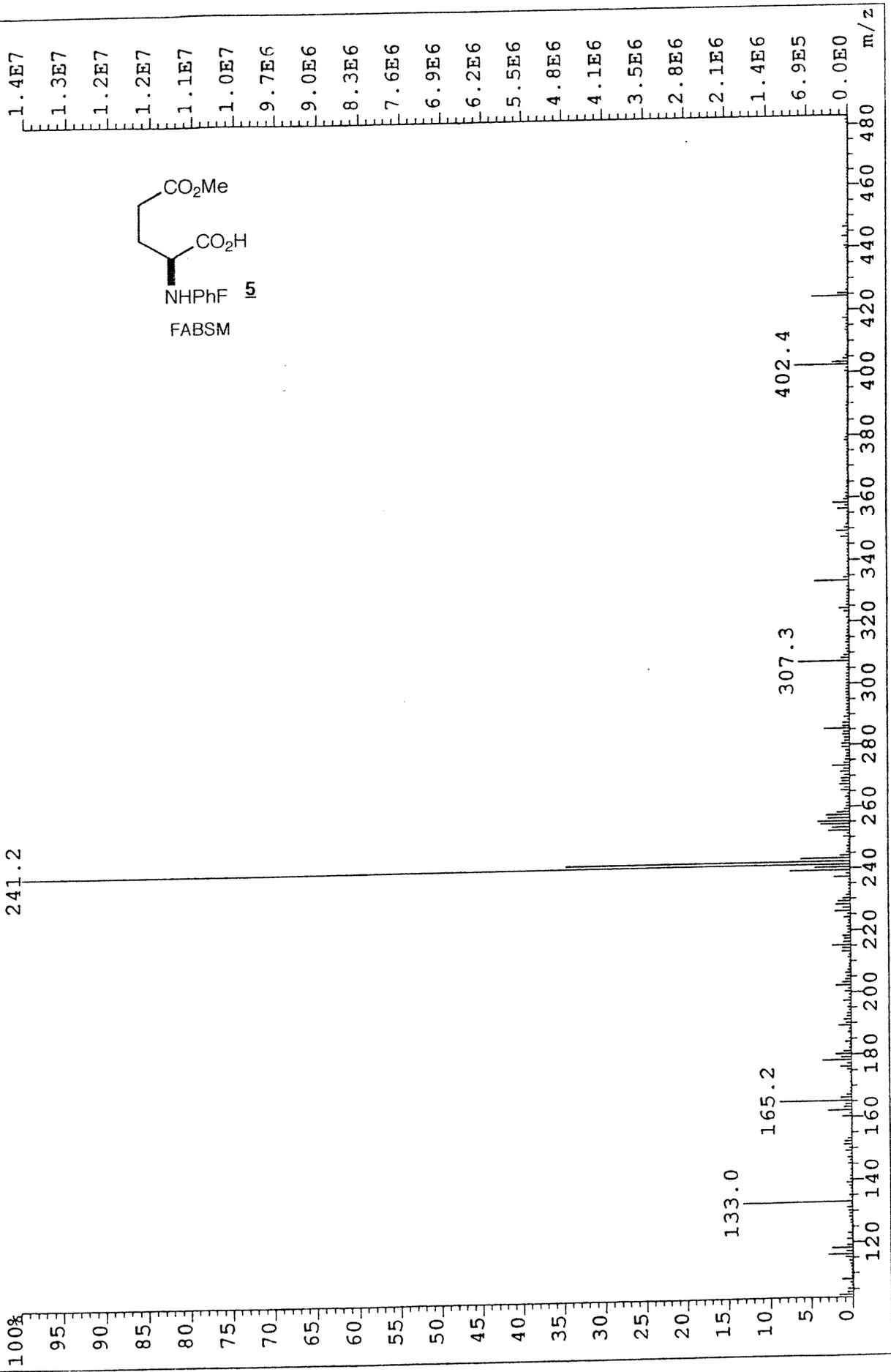
#	ADDRESS	FREQUENCY		INTENSITY
		[Hz]	[PPM]	
1	14790.9	17962.174	178.5954	2.00
2	15348.4	17527.637	174.2069	2.83
3	22849.3	14895.119	148.0424	2.27
4	23027.6	14827.131	147.3666	1.96
5	24046.7	14438.355	143.5026	2.30
6	24724.6	14179.751	140.9323	2.90
7	24929.1	14097.950	140.1193	2.80
8	27956.0	12947.101	128.6810	4.04
9	27992.6	12936.938	128.5900	3.96
10	28046.9	12912.411	128.3363	2.67
11	28152.9	12871.958	127.9342	3.77
12	28242.8	12837.663	127.5933	3.65
13	28300.9	12815.517	127.3732	3.89
14	28670.6	12674.506	125.9717	4.15
15	28693.4	12665.778	125.8850	9.89
16	28877.9	12595.400	125.1955	4.02
17	30236.8	12077.047	120.0336	4.05
18	30275.4	12062.309	119.8871	3.96
19	42699.7	7322.805	72.7813	3.36
20	47312.8	5560.387	55.2646	3.81
21	48275.2	5195.957	51.6423	4.75
22	53942.6	3033.971	30.1546	4.63
23	54285.9	2903.030	28.8532	3.18

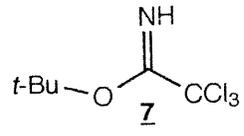
DEPT

DMU: USER=chimie, NAME=hal-6, EXPNO=2, PROCNO=1
 F1=172.702ppm, F2=-11.353ppm, M1=0.00cm, MAXI=10000.00cm, PC=1.100

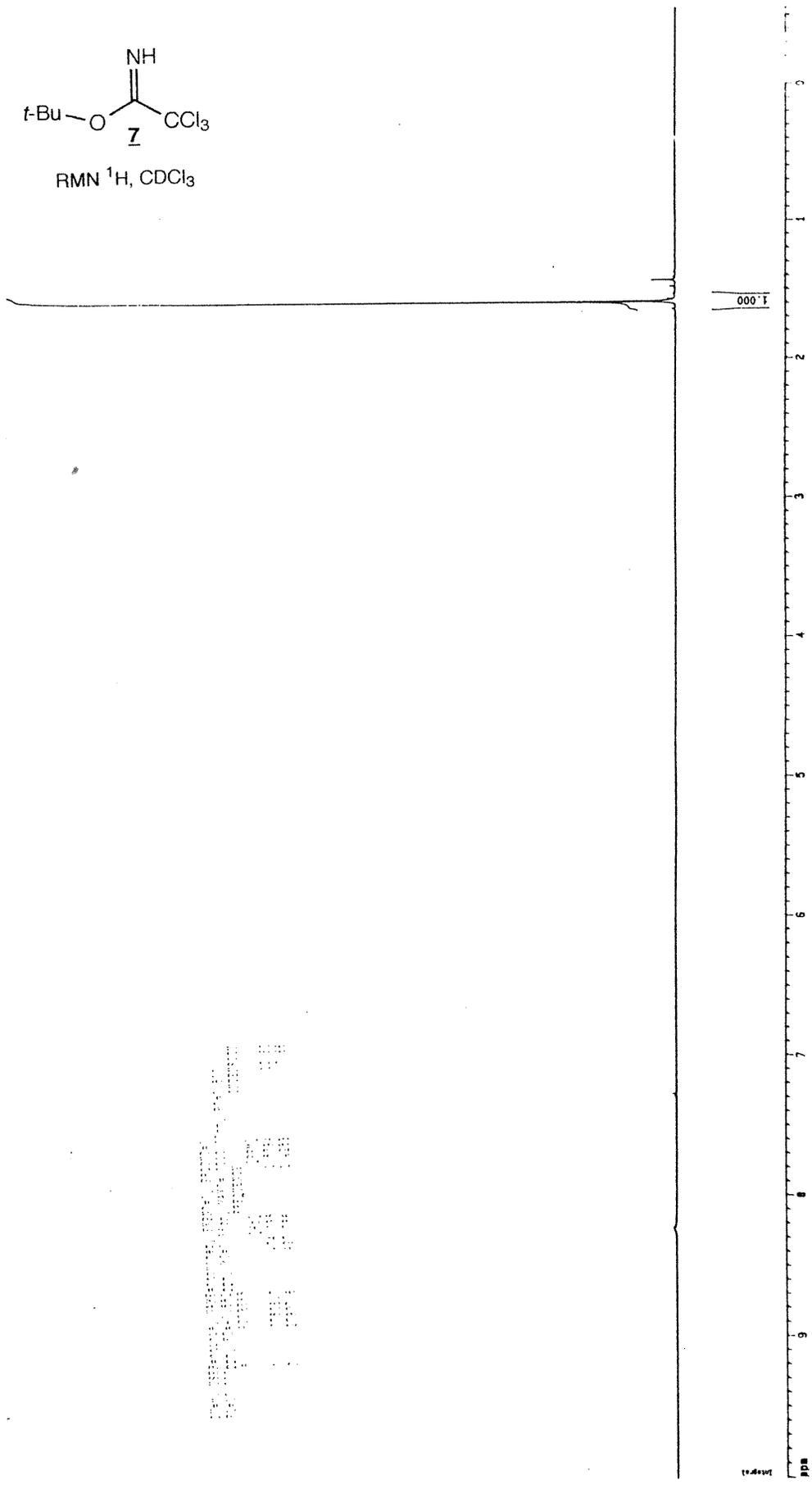
#	ADDRESS	FREQUENCY		INTENSITY
		[Hz]	[PPM]	
1	15655.1	12952.566	129.7354	1.36
2	15691.0	12942.411	128.6344	1.39
3	15778.0	12917.852	128.3904	2.85
4	15921.1	12877.398	127.9883	1.26
5	16042.4	12843.134	127.6477	1.26
6	16120.7	12821.096	127.4278	1.24
7	16619.8	12679.973	126.0261	1.47
8	16650.7	12671.236	125.9392	2.90
9	16899.9	12600.826	125.2394	1.36
10	18734.2	12082.504	120.0879	1.44
11	18786.4	12067.751	119.9410	1.46
12	41796.8	5565.709	55.3175	1.33
13	43086.3	5291.340	51.6460	1.70

File: V95H0220FAZ13 Ident: 3 Acq: 2-AUG-1995 15:17:59 +0:21 Cal:GO_1
AutoSpecQ FAB+ Magnet BpI:13833209 TIC:58051180 Flags:HALL
File Text:LOMH-75-THIO

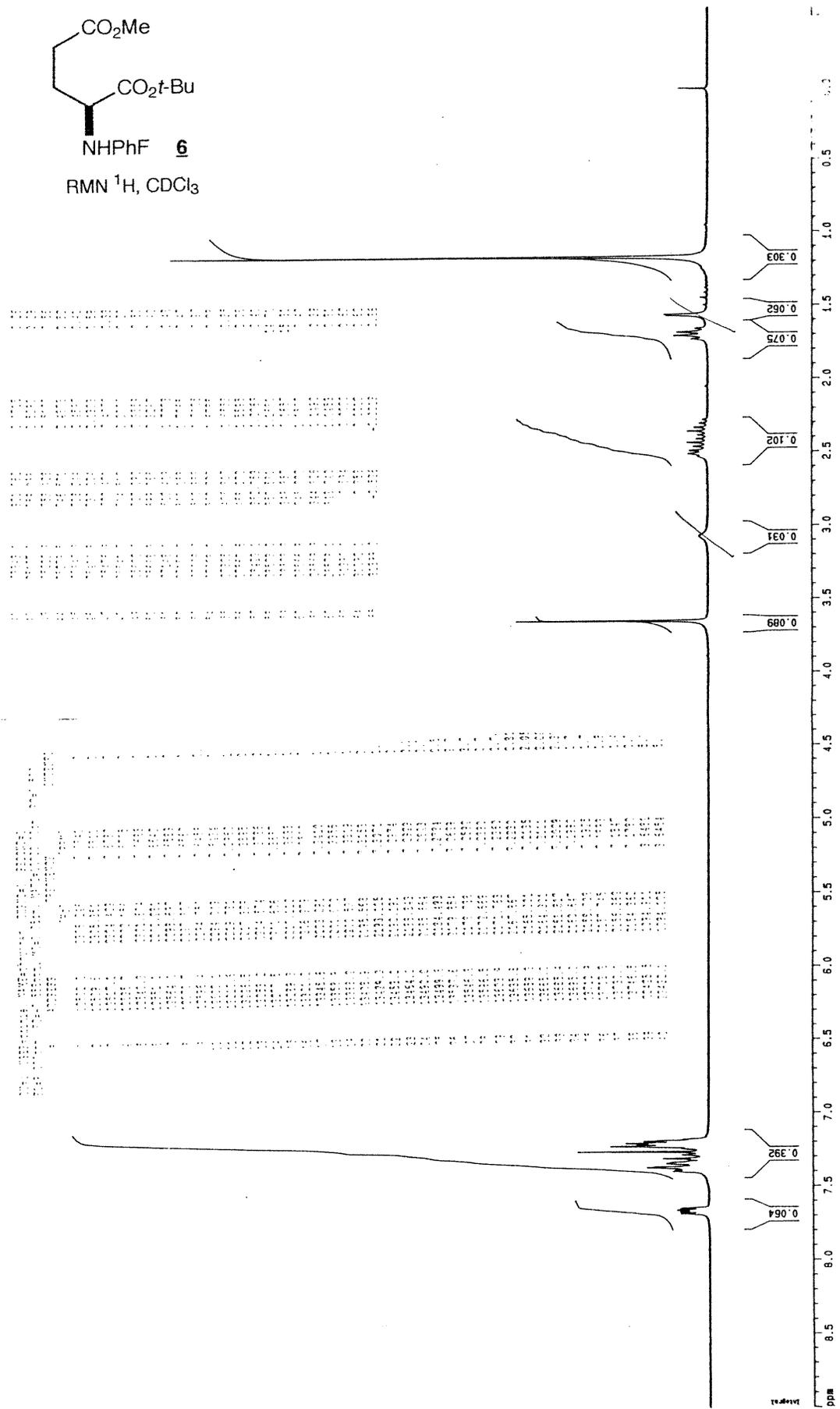


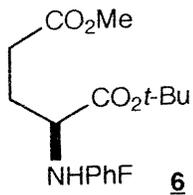


RMN ¹H, CDCl₃



1.400 (9H, s, t-Bu)
7.800 (1H, s, NH)

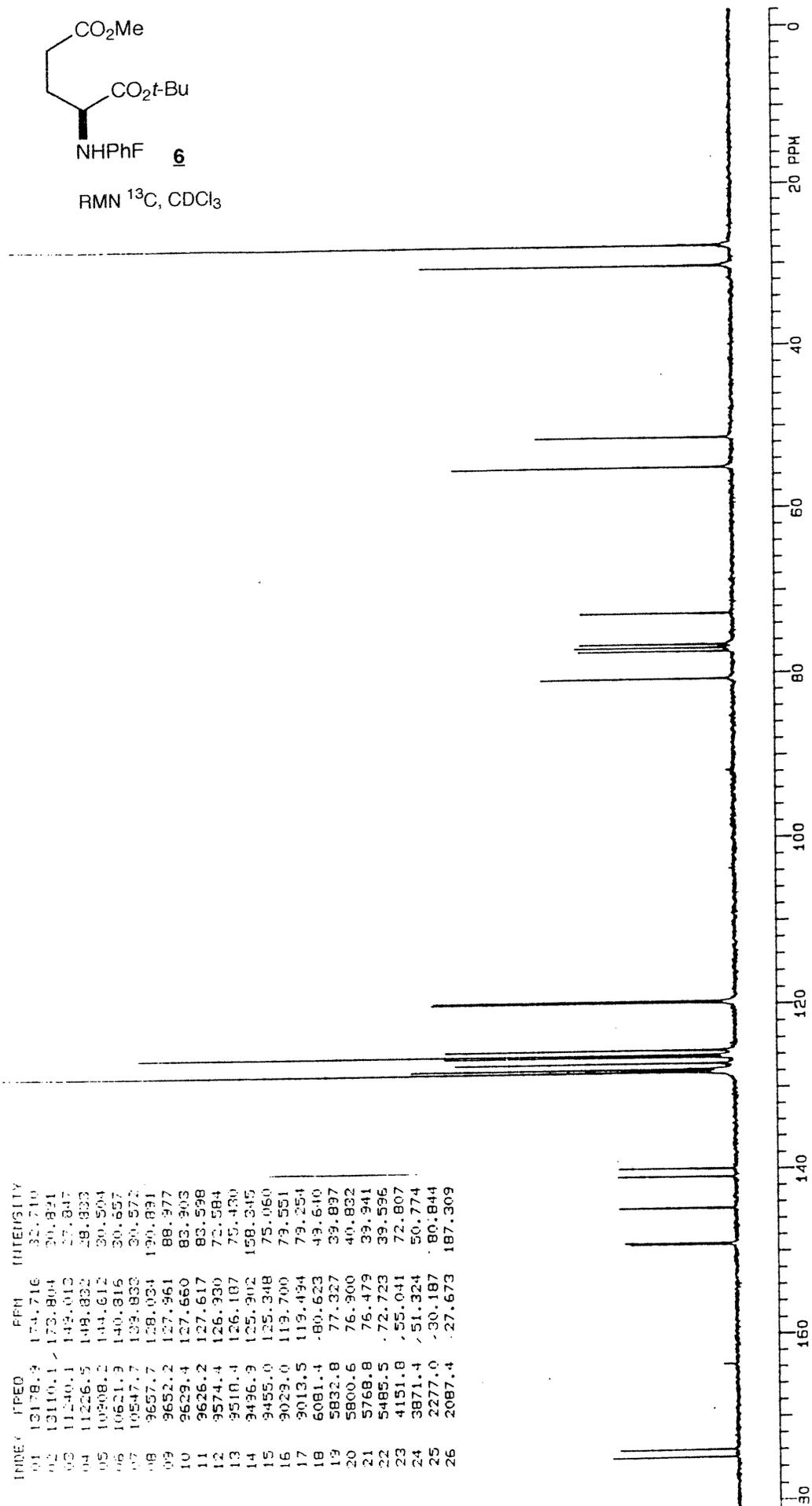


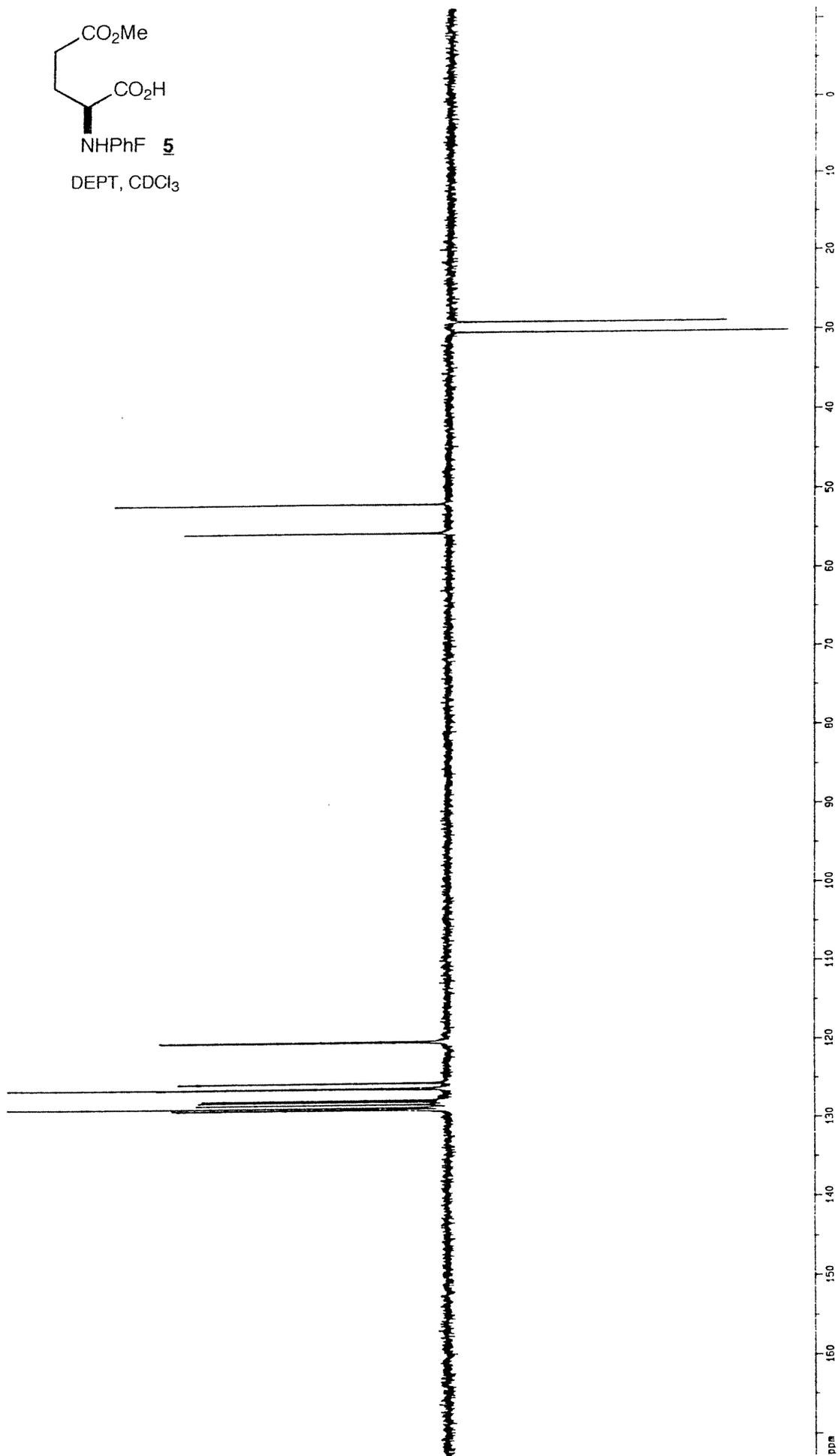
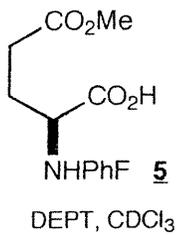


RMN ¹³C, CDCl₃

SPECTRE DE C-13 DE FOUTINE
SPECTRAL LINES FOR THE 35.000
SFL# 6352.3 SFF# 5900.6

INDEX	FREQ	PPM	INTENSITY
01	13178.9	179.716	32.210
02	13110.1	173.804	30.821
03	11340.1	143.013	27.847
04	11226.5	148.832	28.833
05	10308.2	134.612	30.504
06	10621.9	140.816	30.657
07	10547.7	138.832	30.572
08	9657.7	128.034	190.891
09	9652.2	127.961	88.977
10	9629.4	127.650	83.303
11	9626.2	127.617	83.598
12	9574.4	126.930	73.584
13	9518.4	126.187	75.430
14	9496.9	125.902	158.345
15	9455.0	125.348	75.060
16	9023.0	119.700	73.551
17	9013.5	119.494	79.254
18	6081.4	-80.623	49.640
19	5832.8	77.327	39.897
20	5800.6	76.900	40.832
21	5768.8	76.479	39.941
22	5485.5	72.723	39.596
23	4151.8	55.041	72.807
24	3871.4	51.324	50.774
25	2277.0	-30.187	80.844
26	2087.4	-27.673	187.309



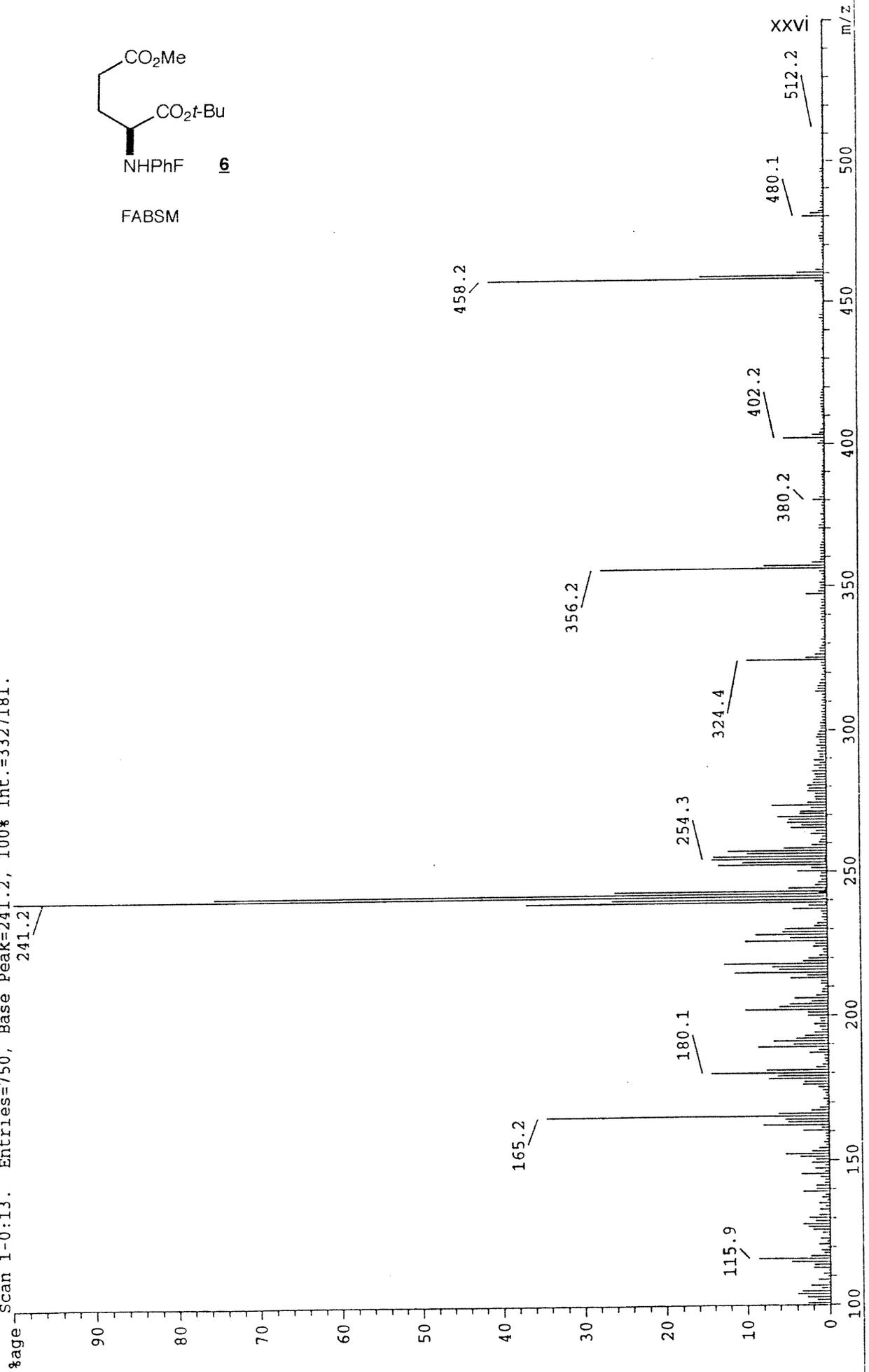
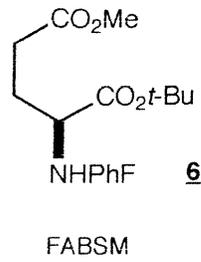


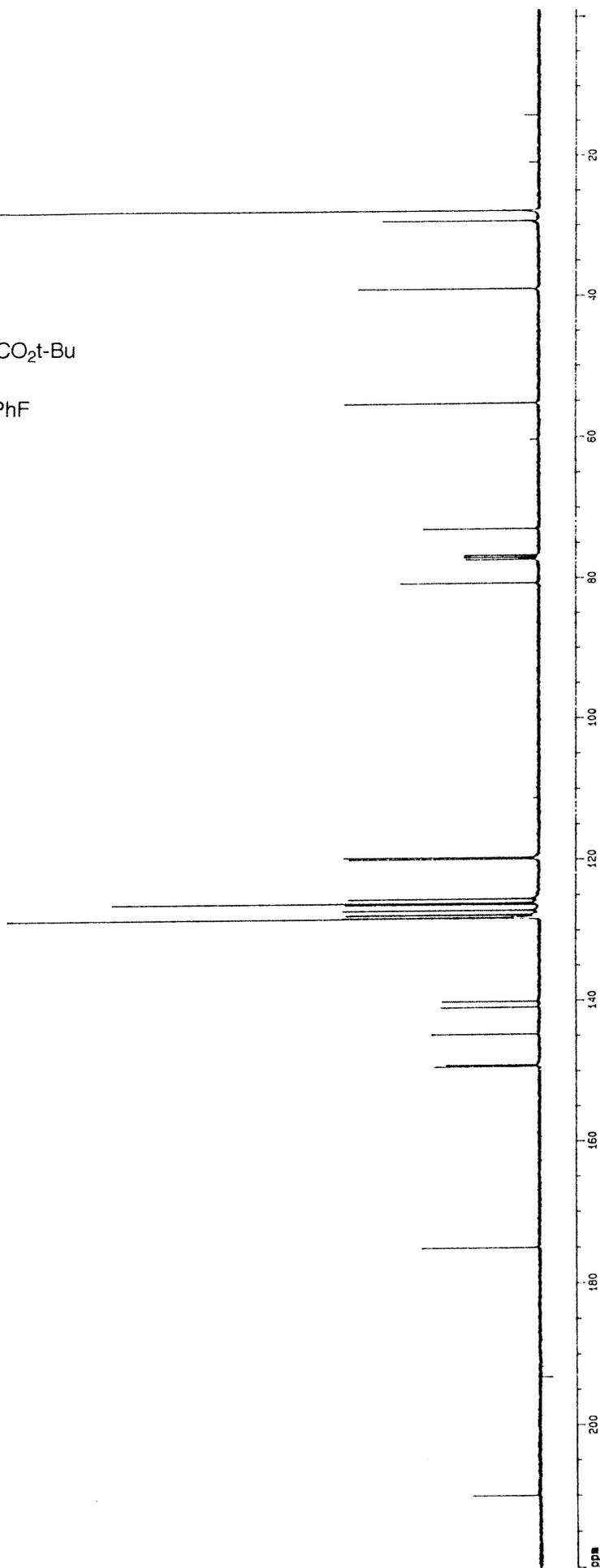
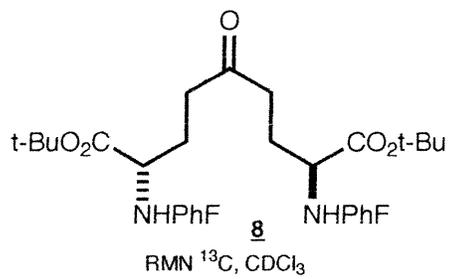
File: al 113. Creation Date: 95-01-19. Time: 13:49:28. : Lo-Res Mass Converted Data
Title: LOMH-123 THIO
Desc: Res=2000, Sam/Pk=20, Thresh=100, PeakWidth=10, MultWidth=7
Delay=2.00, Int.Start, Scan Rate=10.0 (100%)
Local Start, Sol.Delay=0.00, Fil.Delay=0.00, Manual Stop

Scan Plot.

Filter: none. Base Peak=auto.

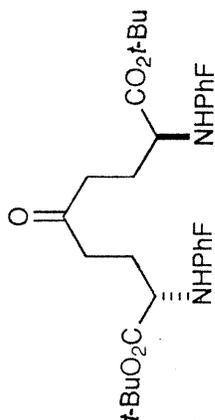
Scan 1-0:13. Entries=750, Base Peak=241.2, 100% Int.=3327181.
241.2

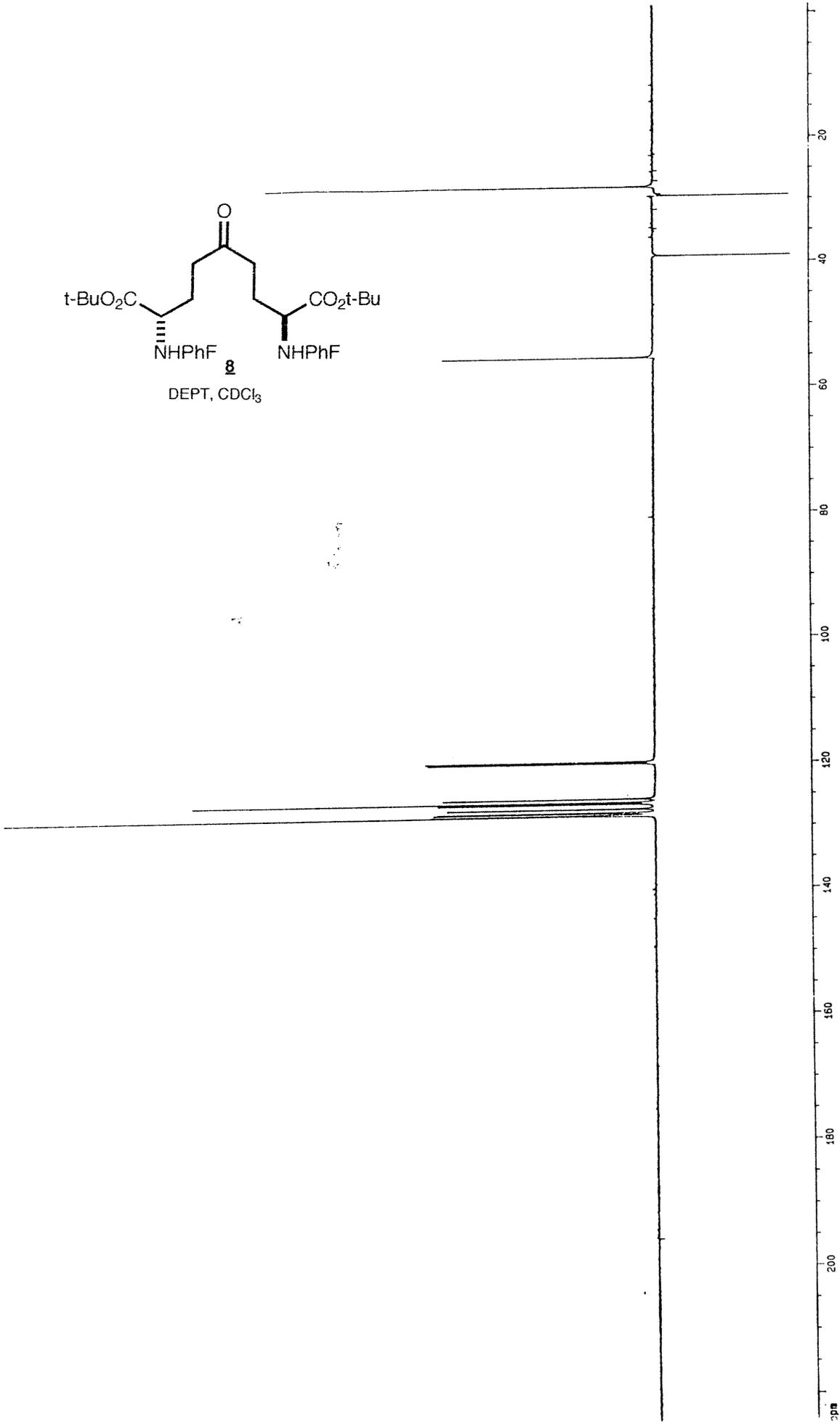
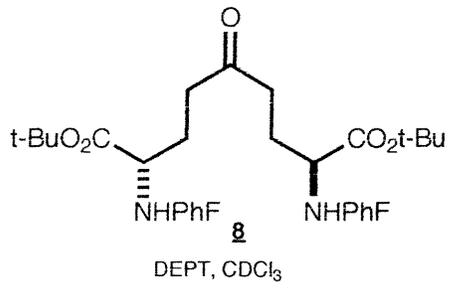




UJ=u. USER=chimie. NAME=hal-6. EXPNO=2731. PROCNO=1
 F1=220.000ppm. F2=-1.000ppm. MI=1.70cm. MAXI=10000.00cm. PC=1.000

#	ADDRESS	FREQUENCY		INTENSITY
		[Hz]	[PPM]	
1	6538.2	21123.789	209.9491	1.73
2	15757.3	17607.004	174.9958	3.06
3	22542.1	15018.813	149.2718	2.69
4	22602.6	14995.729	149.0423	2.44
5	23739.1	14562.192	144.7334	2.76
6	24747.6	14177.464	140.9096	2.58
7	24966.6	14093.946	140.0795	2.57
8	28099.4	12898.876	128.2018	13.77
9	28134.8	12885.358	128.0674	5.06
10	28213.2	12855.458	127.7702	4.97
11	28239.2	12845.526	127.6715	4.87
12	28395.9	12785.737	127.0773	5.03
13	28608.6	12704.604	126.2709	5.04
14	28670.5	12681.016	126.0364	11.22
15	28817.6	12624.879	125.4785	4.97
16	30288.6	12063.744	119.9014	4.96
17	30355.5	12038.245	119.6480	5.13
18	40639.8	8115.455	80.6594	3.57
19	41520.5	7779.107	77.3164	1.90
20	41604.3	7747.140	76.9987	1.93
21	41688.1	7715.172	76.6810	1.91
22	42678.3	7337.446	72.9268	3.03
23	47352.8	5554.288	55.2040	5.02
24	51643.3	3917.571	38.9367	4.69
25	54179.5	2950.100	29.3210	4.09
26	54570.1	2801.099	27.8401	18.86

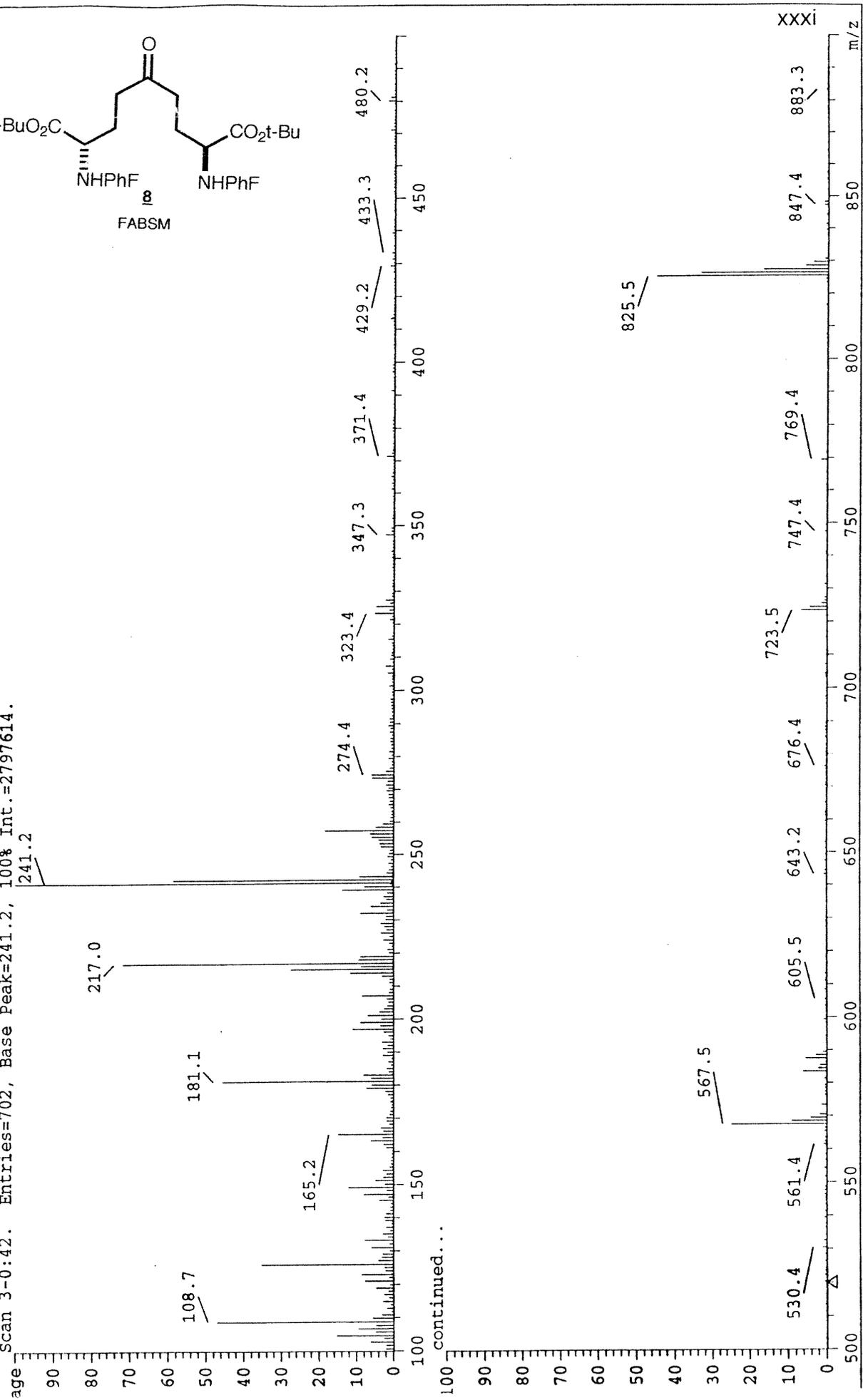
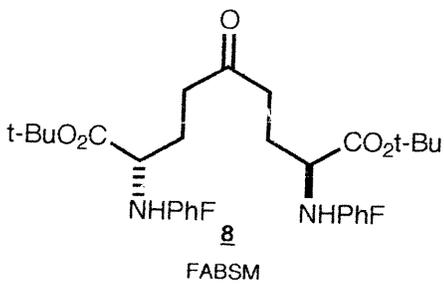




File: a1938... Creation Date: 95-01-19. Time: 14:42:44. Type: Lo-Res Mass Converted Data
 Title: LOMH-188 THIO
 Asc: Res=2000, Sam/Pk=20, Thresh=100, PeakWidth=10, MultWidth=7
 Delay=2.00, Int.Start, Scan Rate=10.0 (100%)
 Local Start, Sol.Delay=0.00, Fil.Delay=0.00, Manual Stop

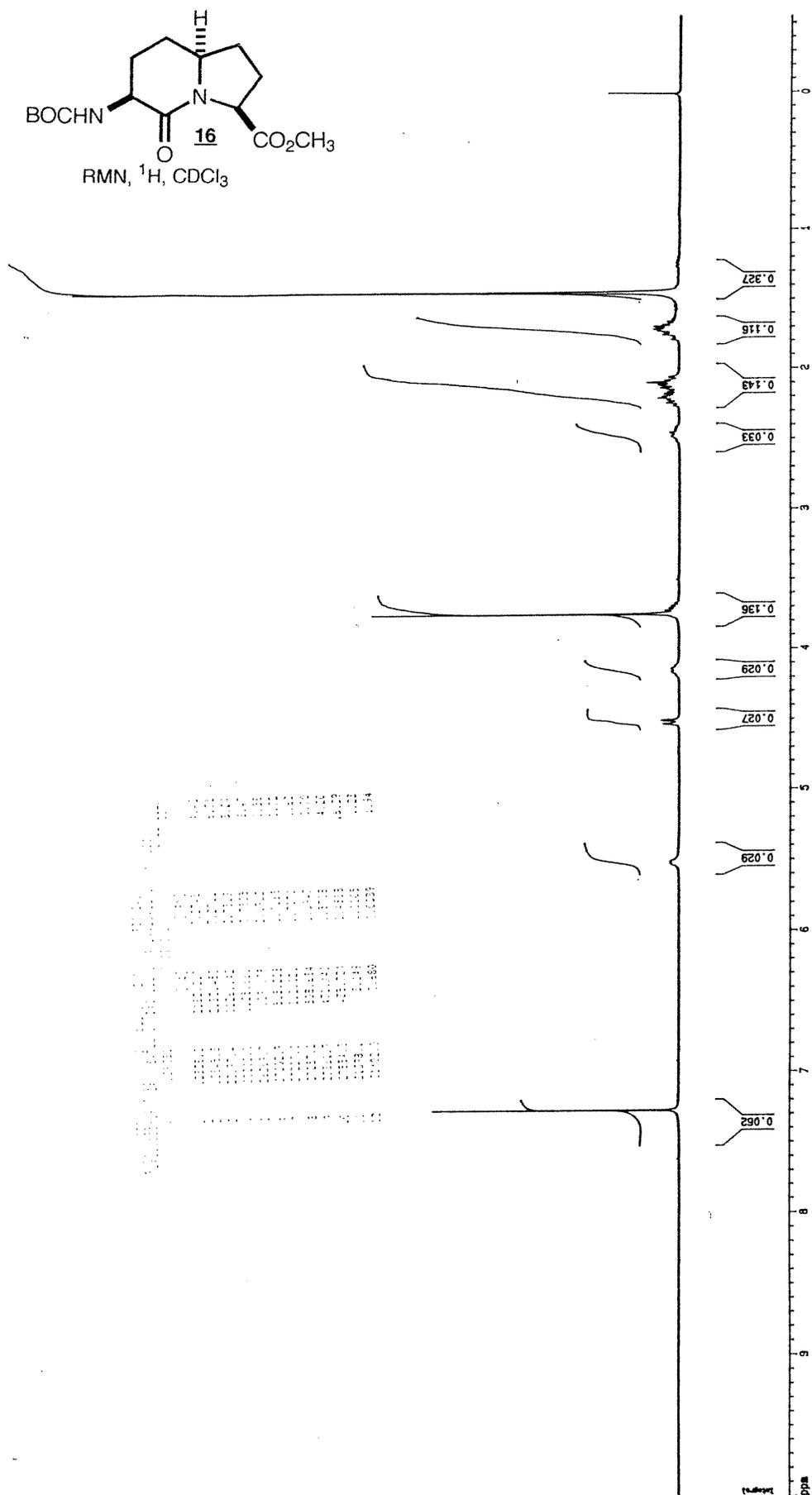
Scan Plot. On-Axis Mult:- 520(*5).
 Filter: none. Base Peak=auto.

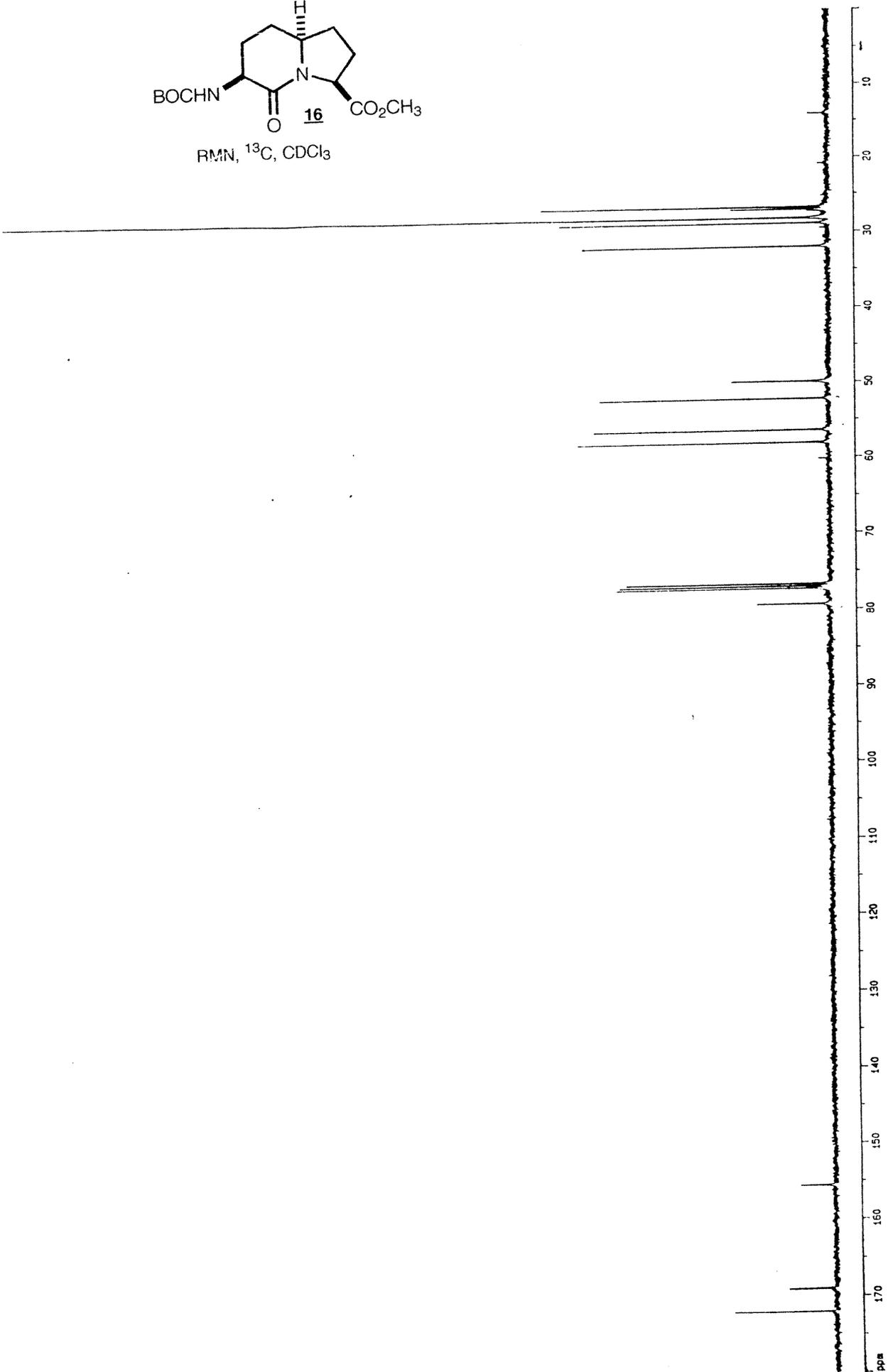
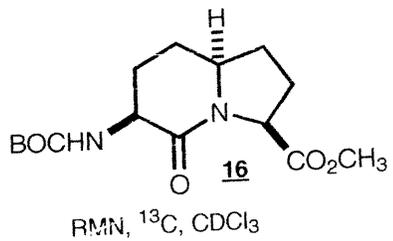
Scan 3-0:42. Entries=702, Base Peak=241.2, 100% Int.=2797614.

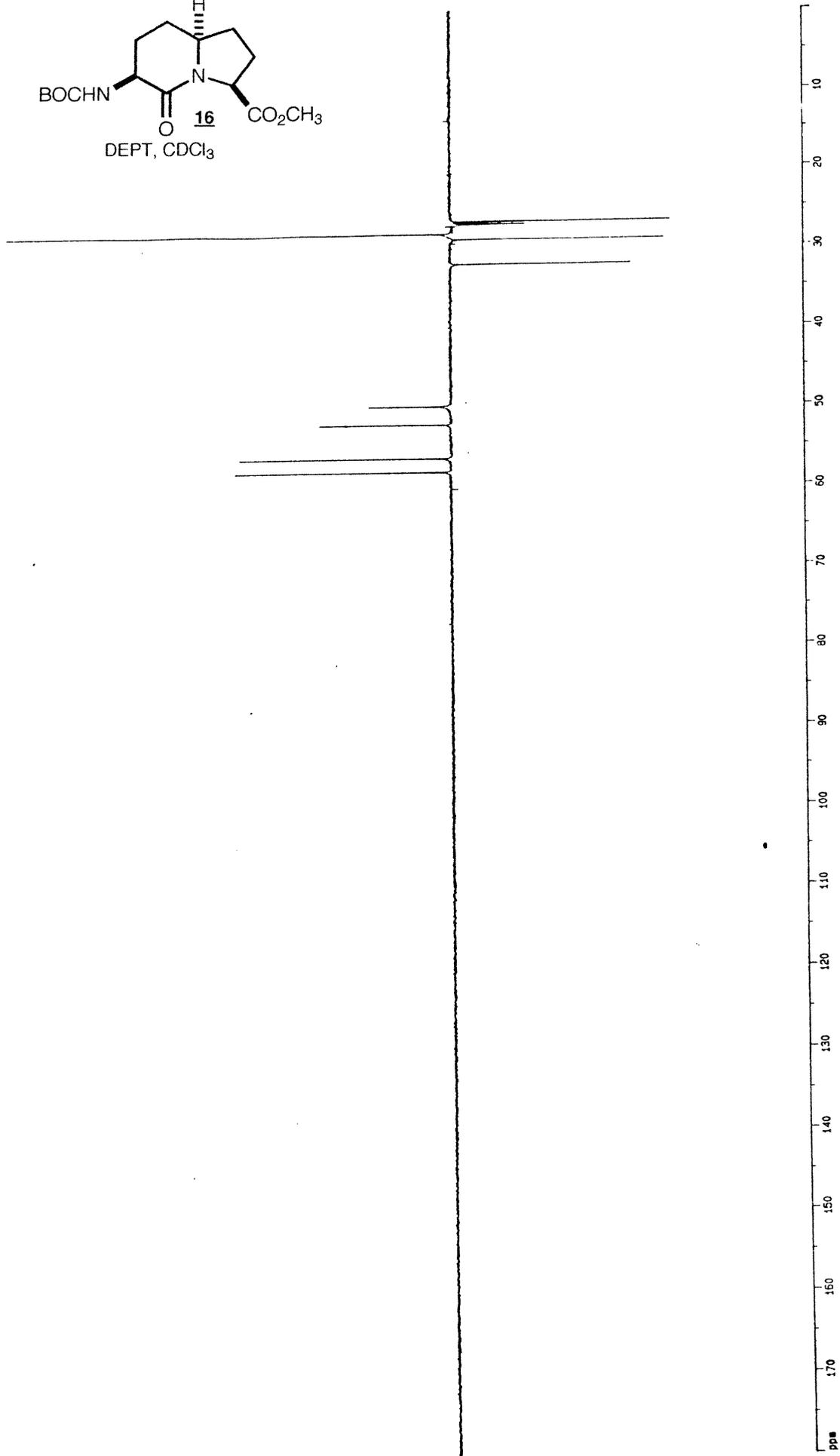
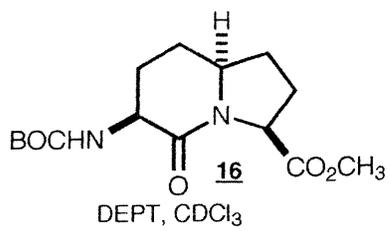


continued...

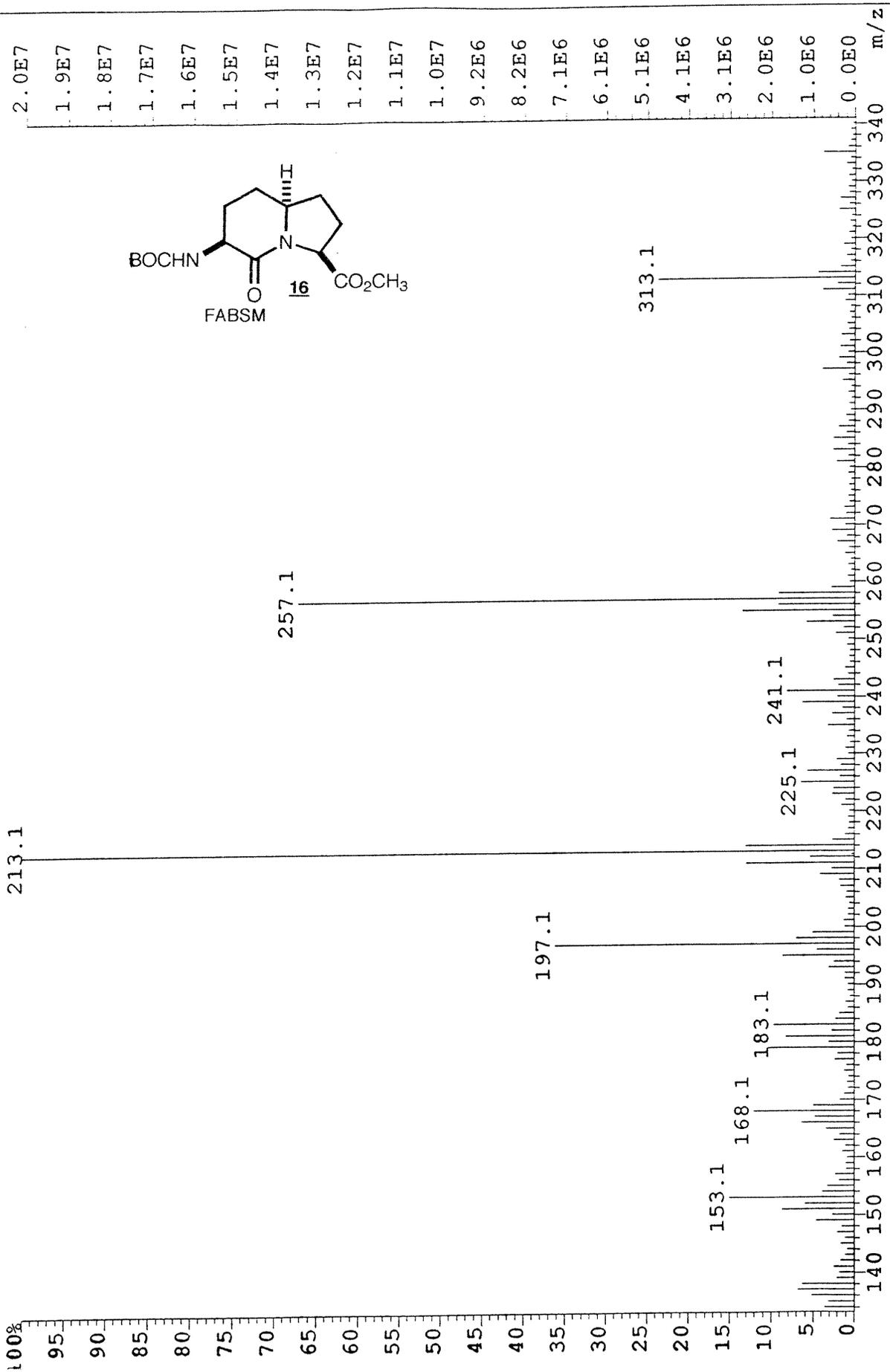
XXXI

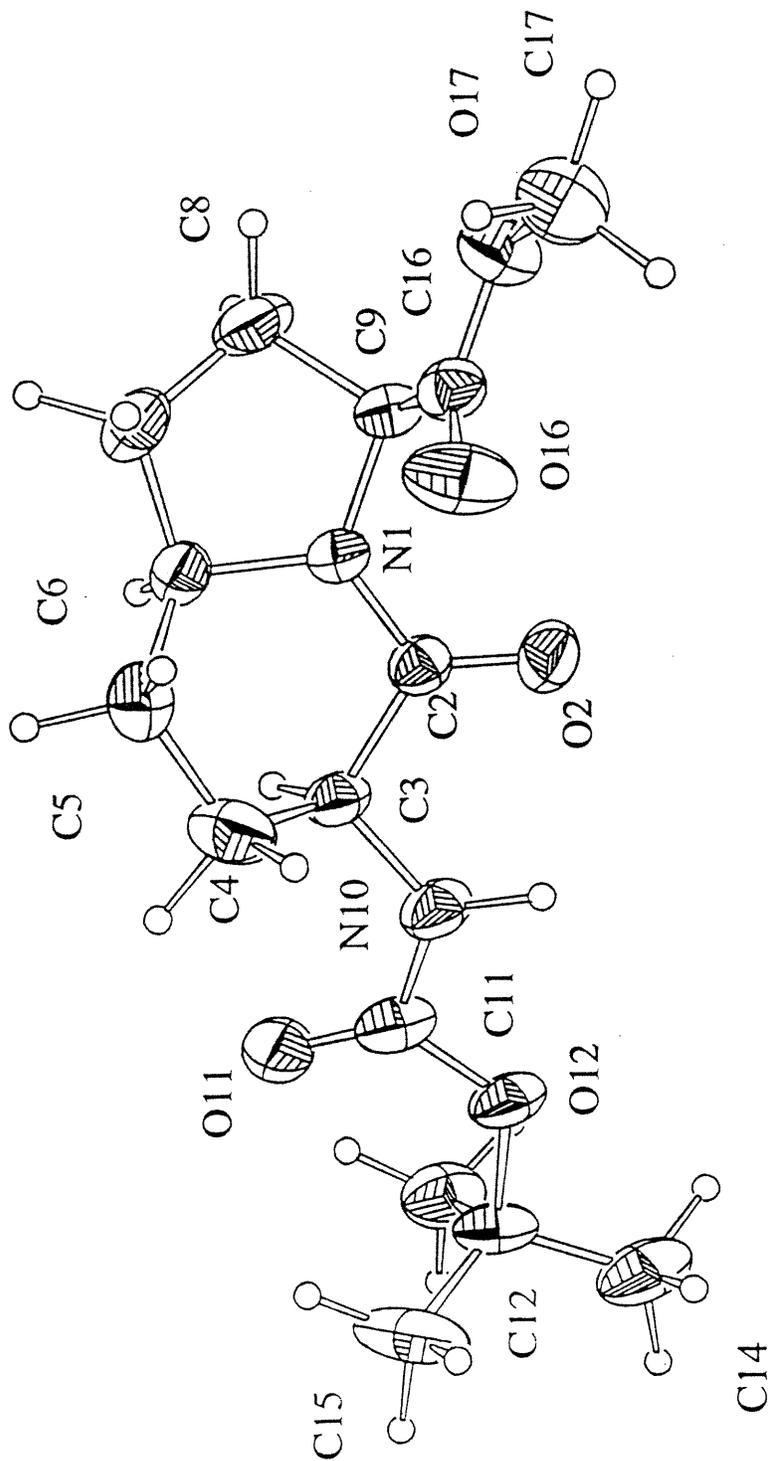
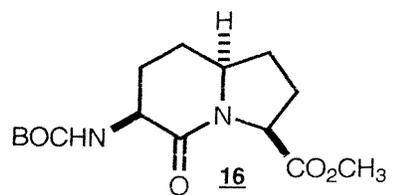


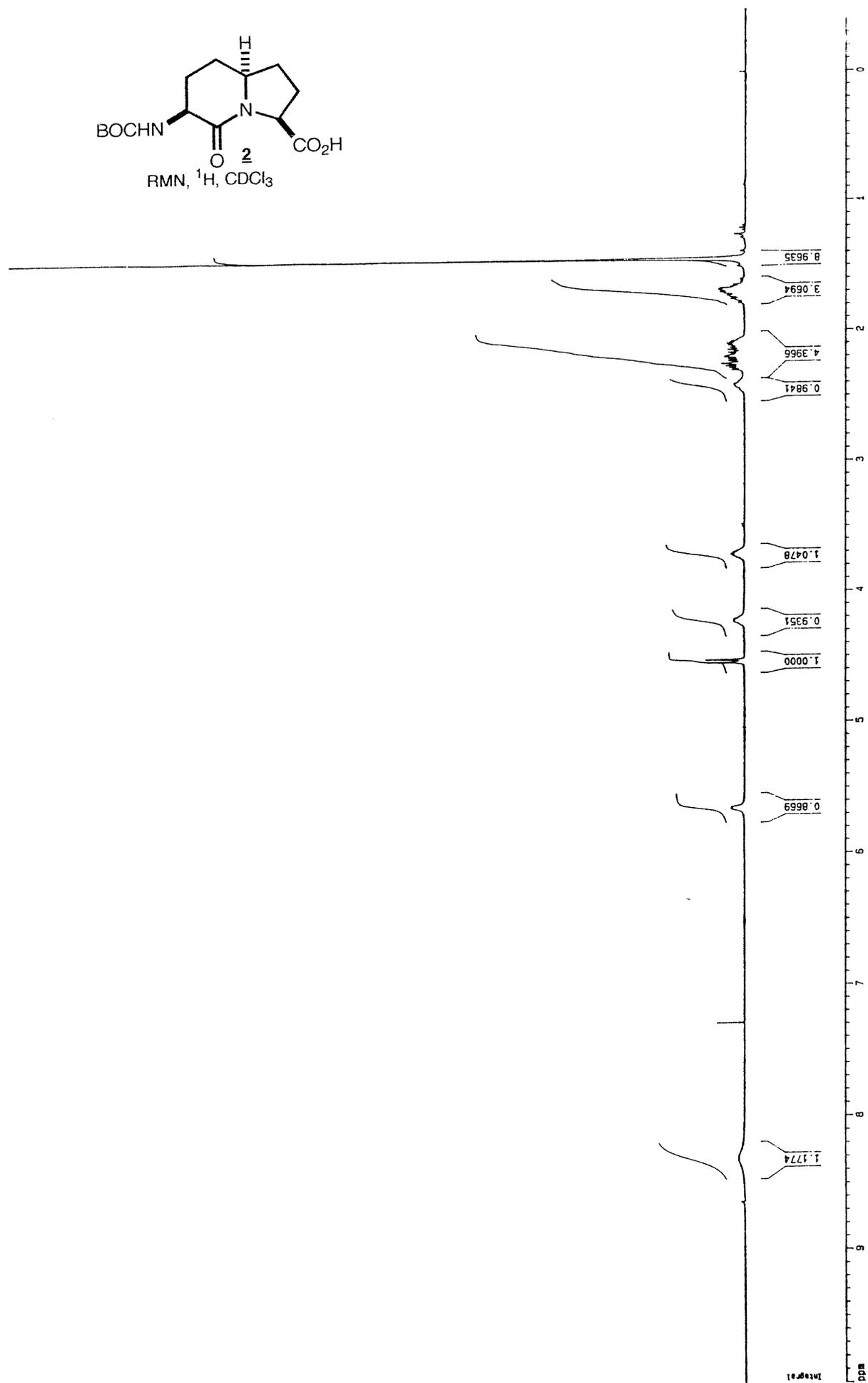




File: V95A2331FAZ13 Ident: 2 Acq: 23-JAN-1995 15:08:01 +0:17 Cal: GO_1
AutoSpecQ FAB+ Magnet BpI: 20407124 TIC: 195350112 Flags: HALL
File Text: LOMH-207-THIO





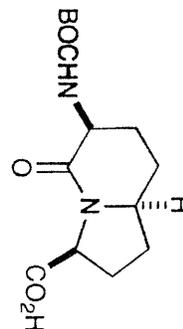


/u/data/chemie/nmr/hgl-10/1/pdata/1/screen

Wed Oct 18 08:20:37 1995

DU=u, USER=chemie, NAME=hgl-10, EXPNO=1, PROCNO=1
 F1=5.602ppm, F2=3.633ppm, M1=1.00cm, MAX1=10000.00cm, PC=0.500

#	ADDRESS	FREQUENCY [Hz]	[PPM]	INTENSITY
1	14558.9	2262.900	5.6554	3.33
2	14592.6	2258.357	5.6440	3.26
3	17843.6	1519.361	4.5469	3.54
4	17903.0	1510.659	4.5251	3.36
5	15715.2	1701.669	4.2527	1.09
6	18776.2	1693.433	4.2322	2.71
7	13780.3	1692.874	4.2308	2.68
8	19805.8	1689.428	4.2222	2.48
9	13820.2	1687.214	4.2166	2.68
10	16529.5	1686.235	4.2142	2.72
11	18881.0	1679.274	4.1968	1.38
12	20241.5	1495.569	3.7377	2.01
13	20283.4	1489.911	3.7235	2.66
14	20319.0	1485.091	3.7115	3.43
15	20356.8	1479.994	3.6987	2.85
16	20391.1	1475.364	3.6872	1.90
17	20419.5	1471.533	3.6776	1.12



/u/data/chemie/nmr/hgl-10/1/pdata/1/screen

Wed Oct 18 08:21:35 1995

DU=u, USER=chemie, NAME=hgl-10, EXPNO=1, PROCNO=1
 F1=8.410ppm, F2=8.193ppm, M1=1.00cm, MAX1=10000.00cm, PC=1.000

#	ADDRESS	FREQUENCY [Hz]	[PPM]	INTENSITY
1	6631.7	3333.340	8.3305	1.55
2	6685.8	3326.039	8.3123	1.41

/u/data/chemie/nmr/hgl-10/1/pdata/1/screen

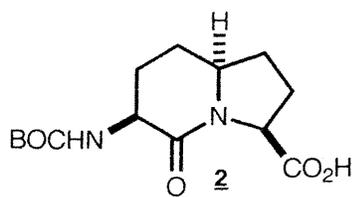
Wed Oct 18 08:21:53 1995

DU=u, USER=chemie, NAME=hgl-10, EXPNO=1, PROCNO=1
 F1=2.489ppm, F2=1.624ppm, M1=1.00cm, MAX1=10000.00cm, PC=1.000

#	ADDRESS	FREQUENCY [Hz]	[PPM]	INTENSITY
1	24140.2	969.110	2.4220	2.39
2	24179.1	963.858	2.4088	2.70
3	24510.9	919.052	2.2969	3.37
4	24556.1	912.949	2.2816	3.59
5	24600.8	906.911	2.2655	4.76
6	24654.4	899.677	2.2484	5.91
7	24720.1	890.800	2.2263	4.12
8	24765.9	884.618	2.2105	4.13
9	24808.0	878.929	2.1966	5.13
10	24882.4	869.950	2.1715	3.23
11	24908.0	865.433	2.1629	4.11
12	24956.9	858.831	2.1464	3.05
13	24973.3	856.605	2.1438	4.25
14	25003.7	852.510	2.1336	2.96
15	25020.6	850.225	2.1245	3.74
16	25050.0	846.257	2.1145	2.79
17	25072.5	843.212	2.1073	4.17
18	25113.9	837.625	2.0933	4.56
19	25163.0	830.924	2.0766	3.39
20	25204.1	825.452	2.0629	1.97
21	26030.4	713.859	1.7841	1.64
22	26125.0	701.039	1.7522	3.59
23	26175.0	694.339	1.7353	3.68
24	26195.2	691.669	1.7271	4.51
25	26255.1	683.523	1.7052	5.21
26	26286.0	679.350	1.6978	6.26
27	26338.8	672.219	1.6800	6.55
28	26358.6	669.792	1.6739	6.56
29	26406.0	663.151	1.6573	3.46
30	26449.0	657.342	1.6428	2.54

DU=u, USER=chemie, NAME=hgl-10, EXPNO=1, PROCNO=1
 F1=1.415ppm, F2=1.422ppm, M1=10.00cm, MAX1=10000.00cm, PC=1.000

#	ADDRESS	FREQUENCY [Hz]	[PPM]	INTENSITY
1	27036.9	577.952	1.4444	219.48

RMN, ¹³C, CDCl₃

26.529
27.004
28.287
28.571
32.005

49.908

57.087
58.788

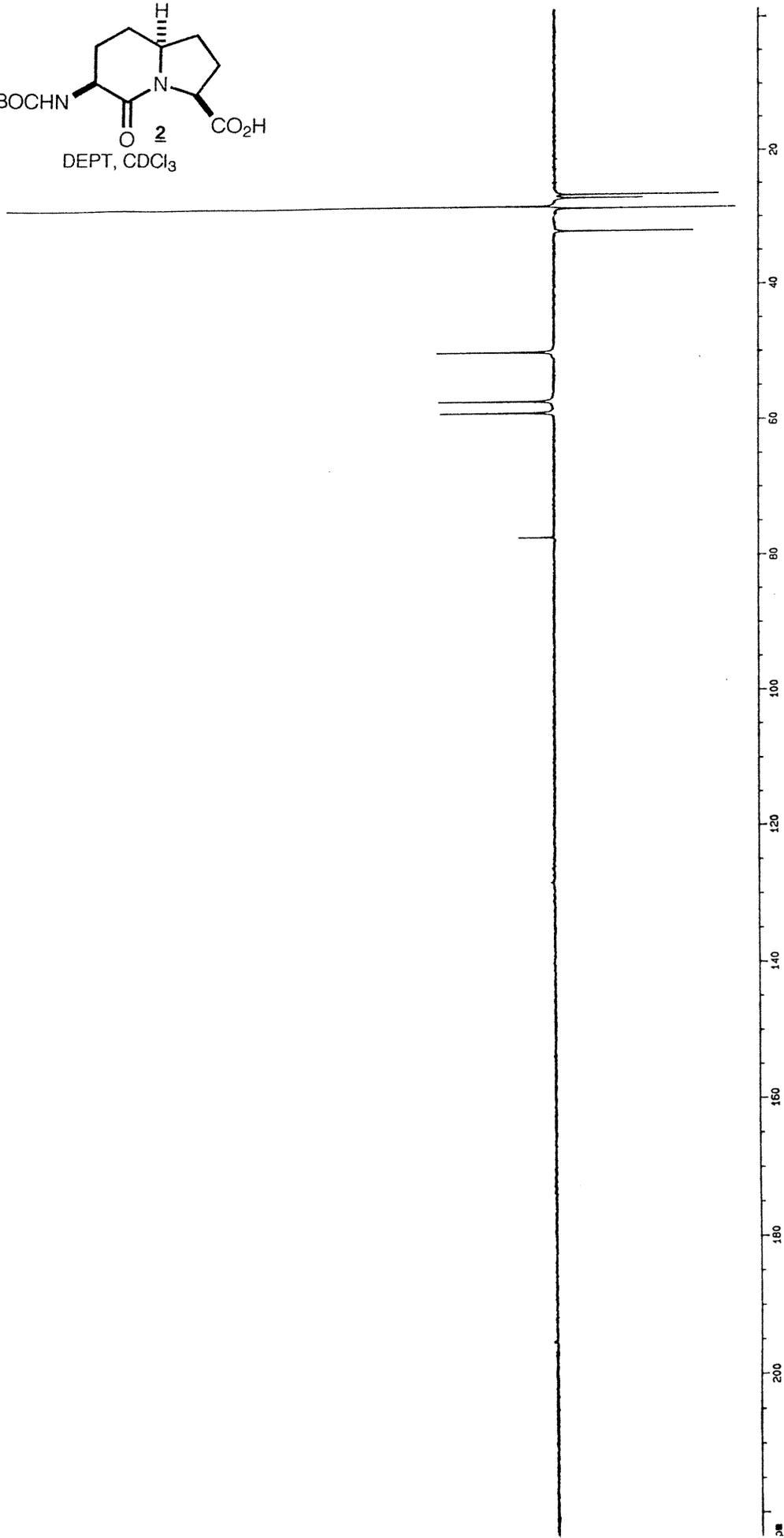
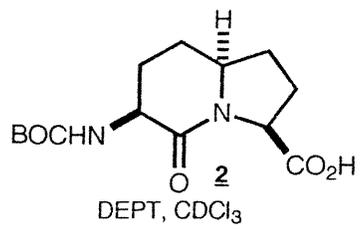
76.687
77.005
77.207
77.322
79.754

155.794

170.568
173.529

ppm

ppm



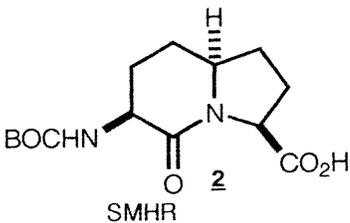
ATOMIC COMPOSITION REPORT (MANUAL)

Selected Isotopes:

Symbol	Min	Max	Wt %	Name
C	0	auto	4	Carbon-12
O	0	auto	2	Oxygen-16
H	0	auto	1	Hydrogen-1
N	0	2	3	Nitrogen-14

Allowable error = minimum of 15.0 ppm, 7.0 mmu.
 Ring/Double Bond limits = [0.0 : 10.0]

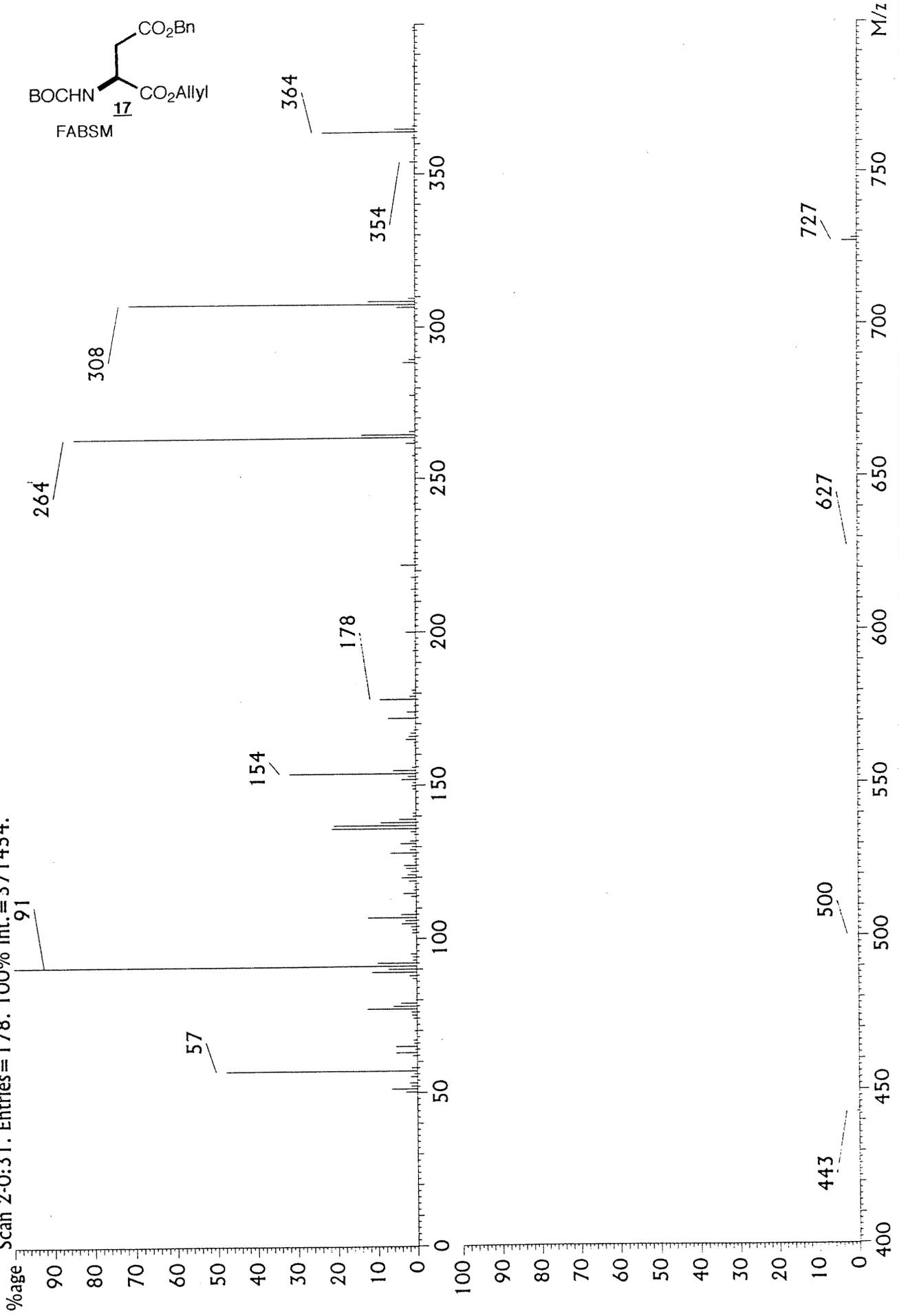
Mass Calculated	ppm	mmu	R/D/B	Formula
299.15960	299.16071	3.7	1.1	C ₁₄ O ₅ H ₂₃ N ₂
299.15803	-5.3	-1.6	0.0	C ₁₁ O ₈ H ₂₅ N

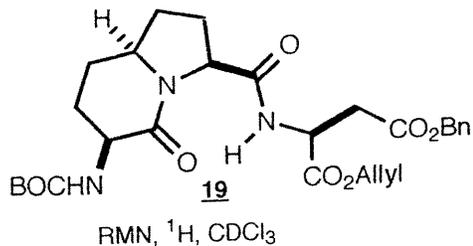


***** End of Atomic Composition Report *****

File: C:\3106. Creation Date: 7/10/96. Time: 13:54:53. Type: Res Mass Data (Centroid)
Title: ASP-PROT .NBA
Desc: Res = 2300, Sam/Pk = 20, Thresh = 200, PeakWidth = 10, MultWidth = 7
Delay = 1.00, Scan Rate = 10.0 (100%)
Local Start, Sol. Delay = 0.00, Fil. Delay = 0.00

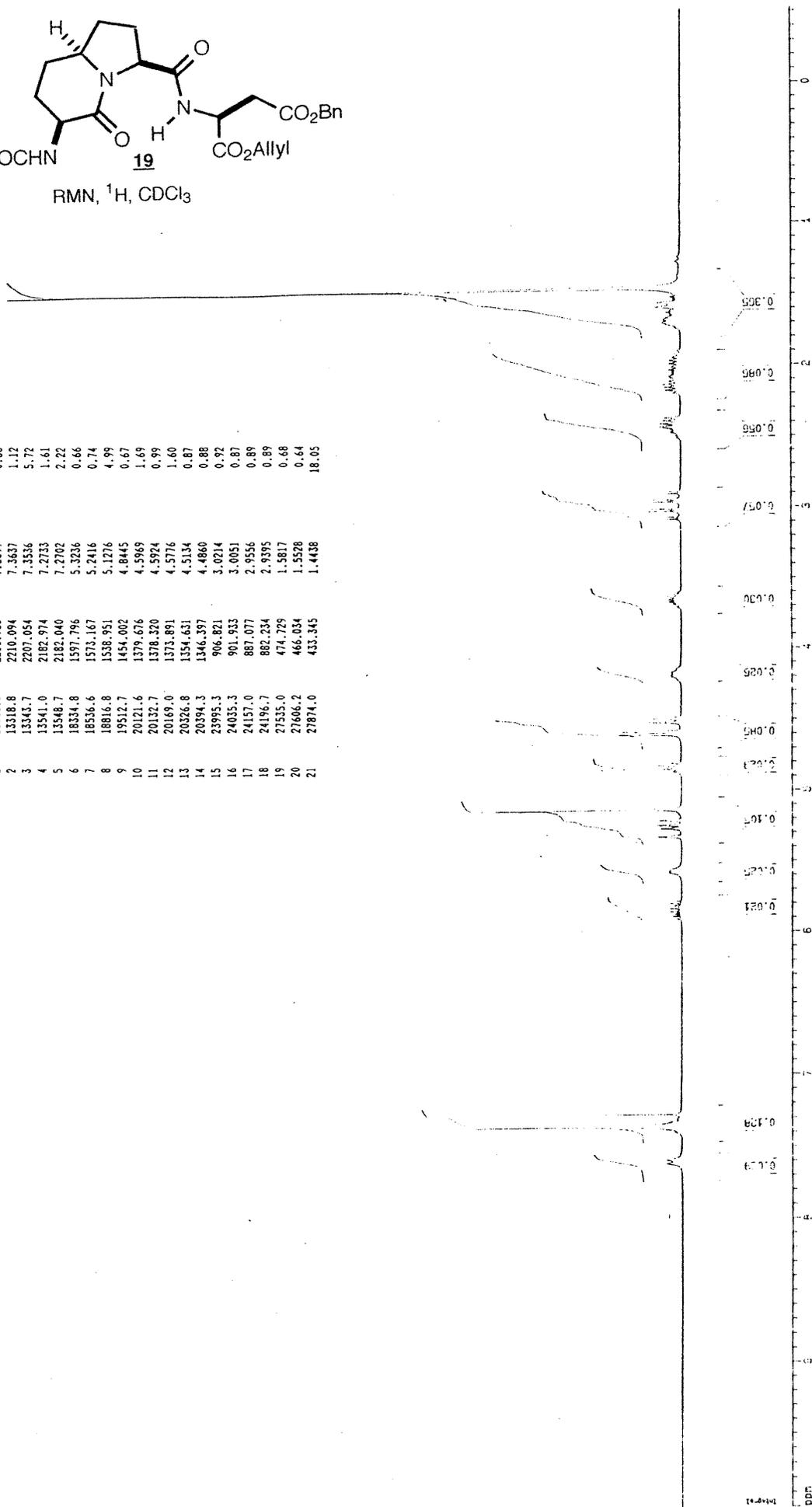
Scan 2-0:31. Entries = 178. 100% Int. = 371454.



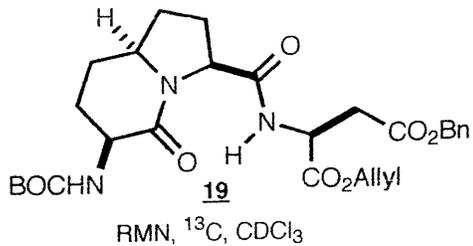


DU=0, USER=chimie, NAME=thoumer, EXPNO=1, PROCNO=1
 F1=10.000ppm, F2=-0.522ppm, M1=0.64cm, MAXI=41.75cm, PC=0.500

ADDRESS	FREQUENCY [Hz]	PPM	INTENSITY
1	13303.5	2211.965	7.3699
2	13318.8	2210.094	7.3637
3	13343.7	2207.054	7.3536
4	13541.0	2182.974	7.2733
5	13548.7	2182.040	7.2702
6	18334.8	1597.796	5.3236
7	18536.6	1573.167	5.2416
8	18816.8	1538.951	5.1276
9	19512.7	1454.002	4.8445
10	20121.6	1378.676	4.5969
11	20132.7	1378.320	4.5924
12	20169.0	1373.891	4.5776
13	20326.8	1354.631	4.5134
14	20394.3	1346.397	4.4860
15	23995.3	906.821	3.0214
16	24035.3	901.933	3.0051
17	24157.0	887.077	2.9556
18	24196.7	882.234	2.9395
19	27535.0	474.729	1.5817
20	27606.2	466.034	1.5528
21	27874.0	433.345	1.4438

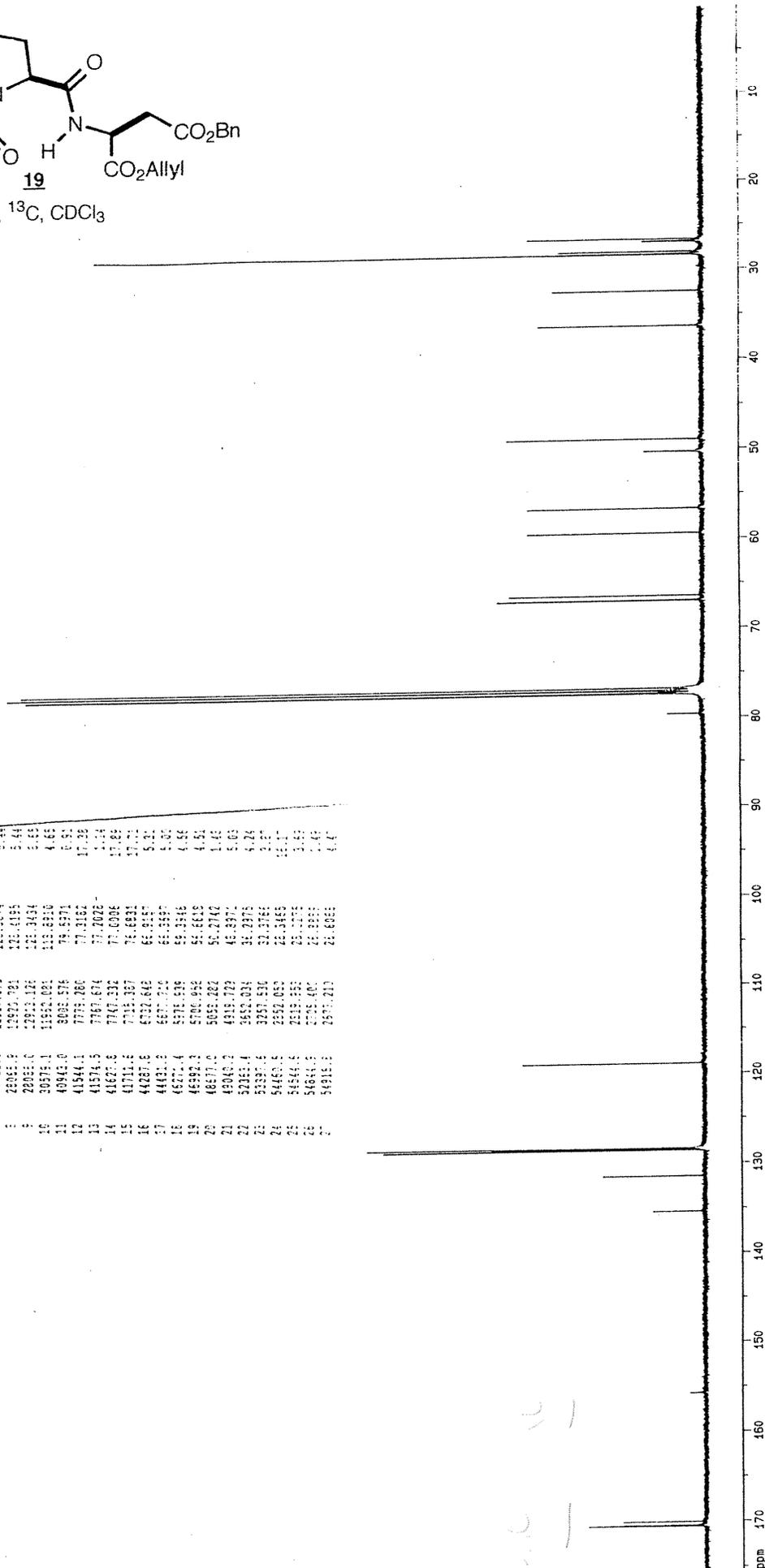


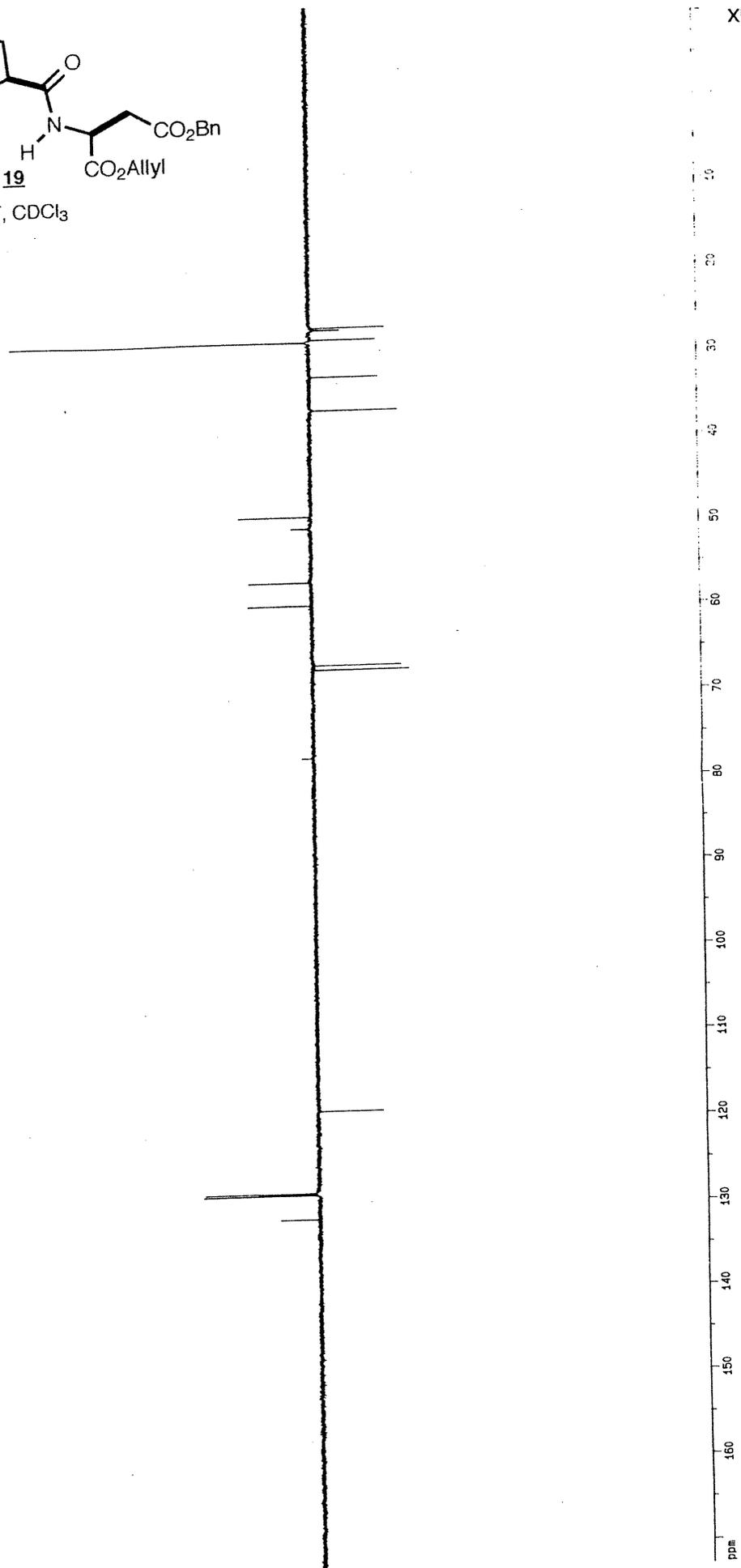
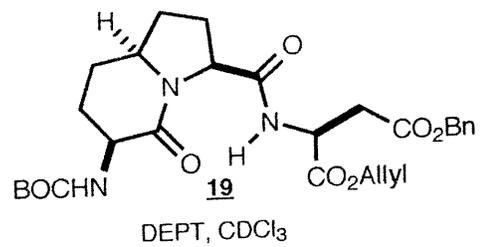
10.000
 9.000
 8.000
 7.000
 6.000
 5.000
 4.000
 3.000
 2.000
 1.000
 0.000



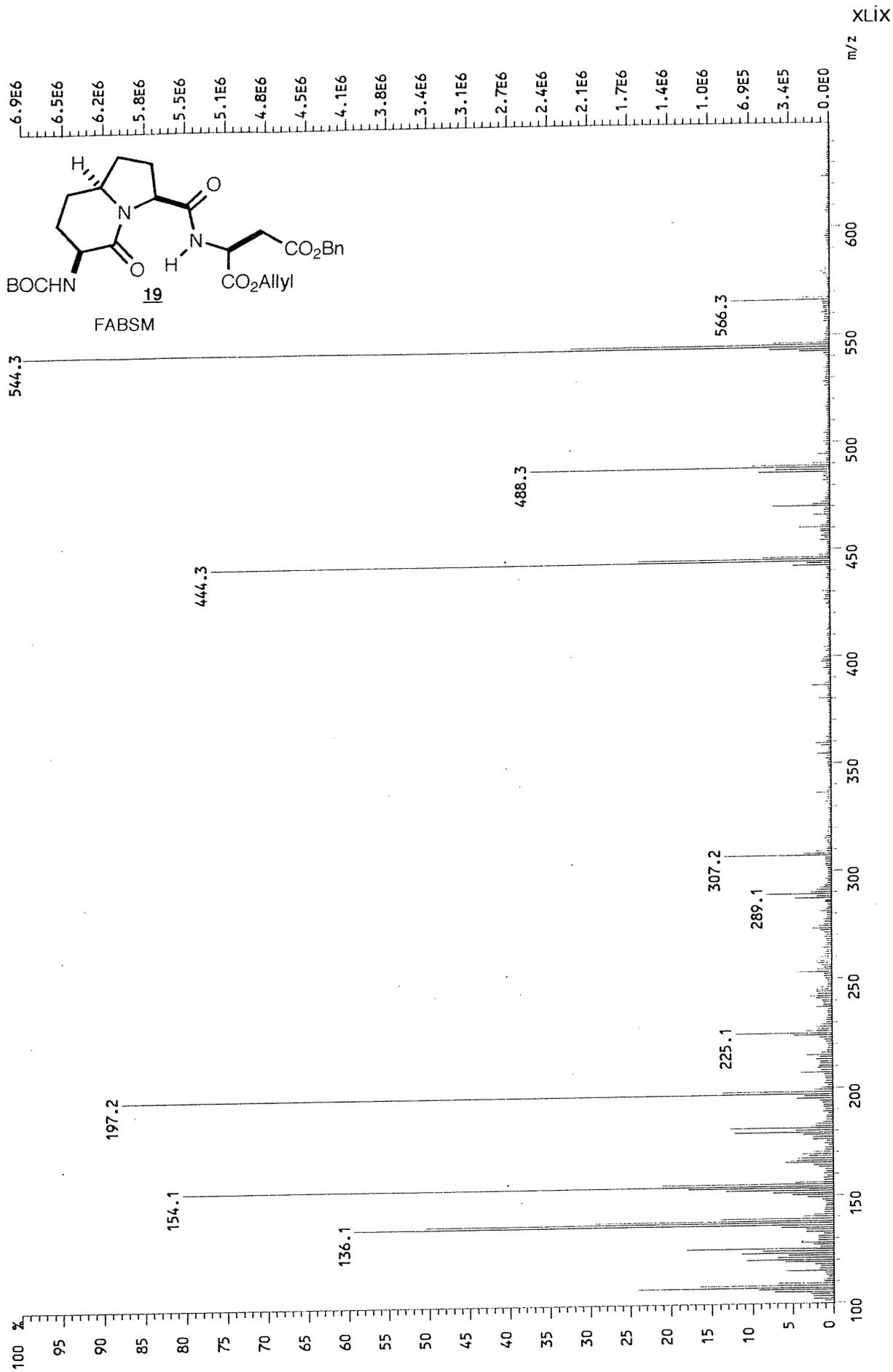
Exp: 0512-Charlie, NMR-thoulier, EPRD-2, PROTON-1
 1475.45ppm, f2=0.09ppm, M=0.00cm, MFI=10000, ABCM,
 f ADDRESS FREQUENCY INTENSI
 (ppm) (MHz)

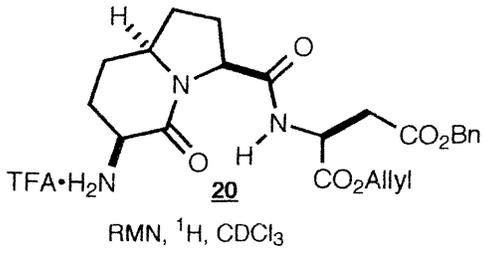
ADDRESS	FREQUENCY (MHz)	INTENSITY
1	15965.7	47457.080
2	16377.2	47150.783
3	17030.2	47037.701
4	20864.3	45695.001
5	25242.3	43811.807
6	27271.0	43201.041
7	28224.8	42911.875
8	28951.9	42877.781
9	29053.0	42811.132
10	30375.1	41951.021
11	40942.0	39051.576
12	41544.1	37751.280
13	41574.5	37631.634
14	41627.0	37471.332
15	43711.8	37151.387
16	44251.8	36721.642
17	44401.8	36571.312
18	45211.4	35711.539
19	45351.3	35661.932
20	48371.0	30651.282
21	49041.2	29151.722
22	52451.4	26521.034
23	53331.6	25831.530
24	54161.8	25321.053
25	54541.5	25151.352
26	54651.3	25081.401
27	54915.3	24911.210





File:V95G1173FAZ13 Ident:2 Acq:11-JUL-1995 17:00:02 +0:29 Cal:GO_1
AutoSpecq FAB+ Magnet BpI:6856232 TIC:104336320 Flags:HALL
File Text:IAA-ASP-NBA

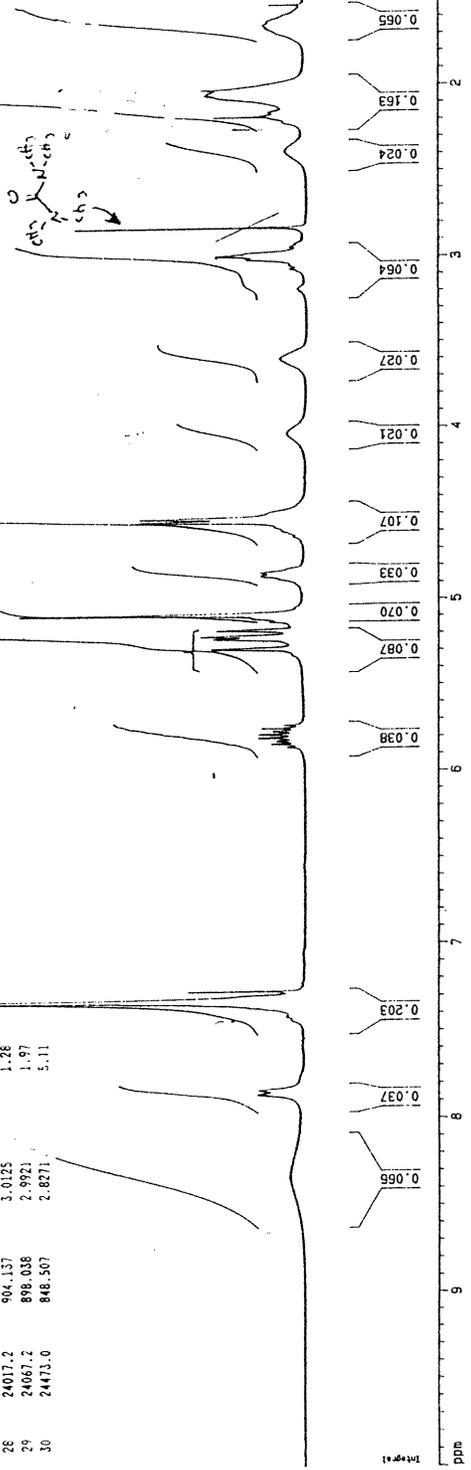


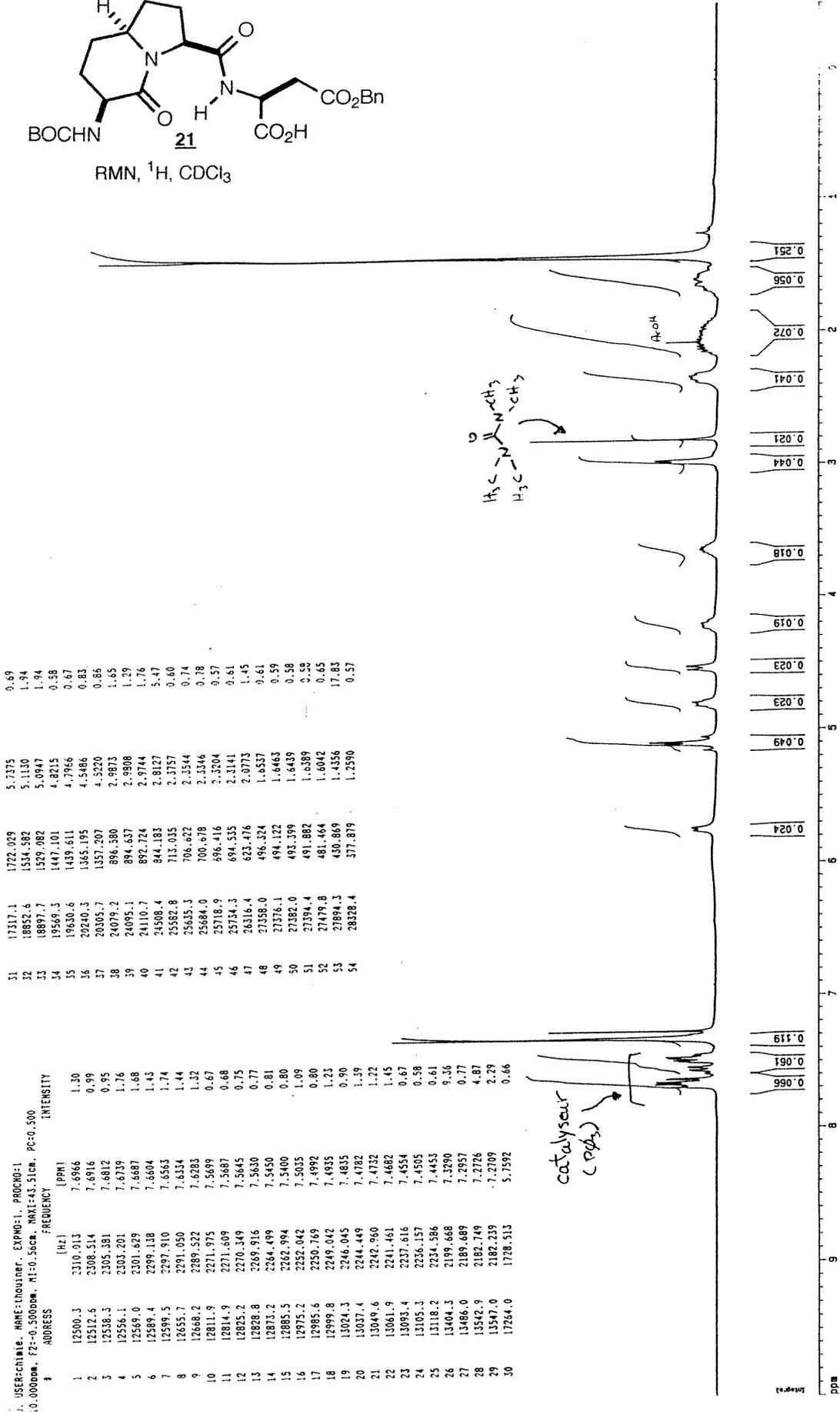
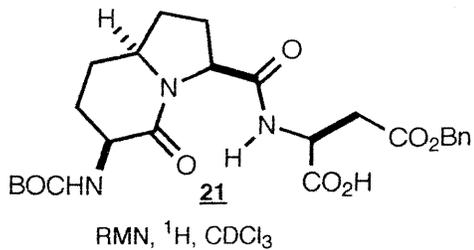


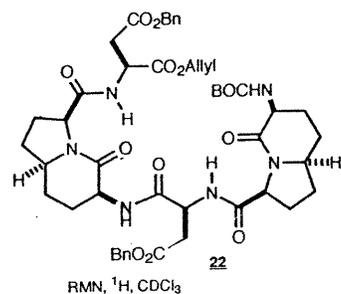
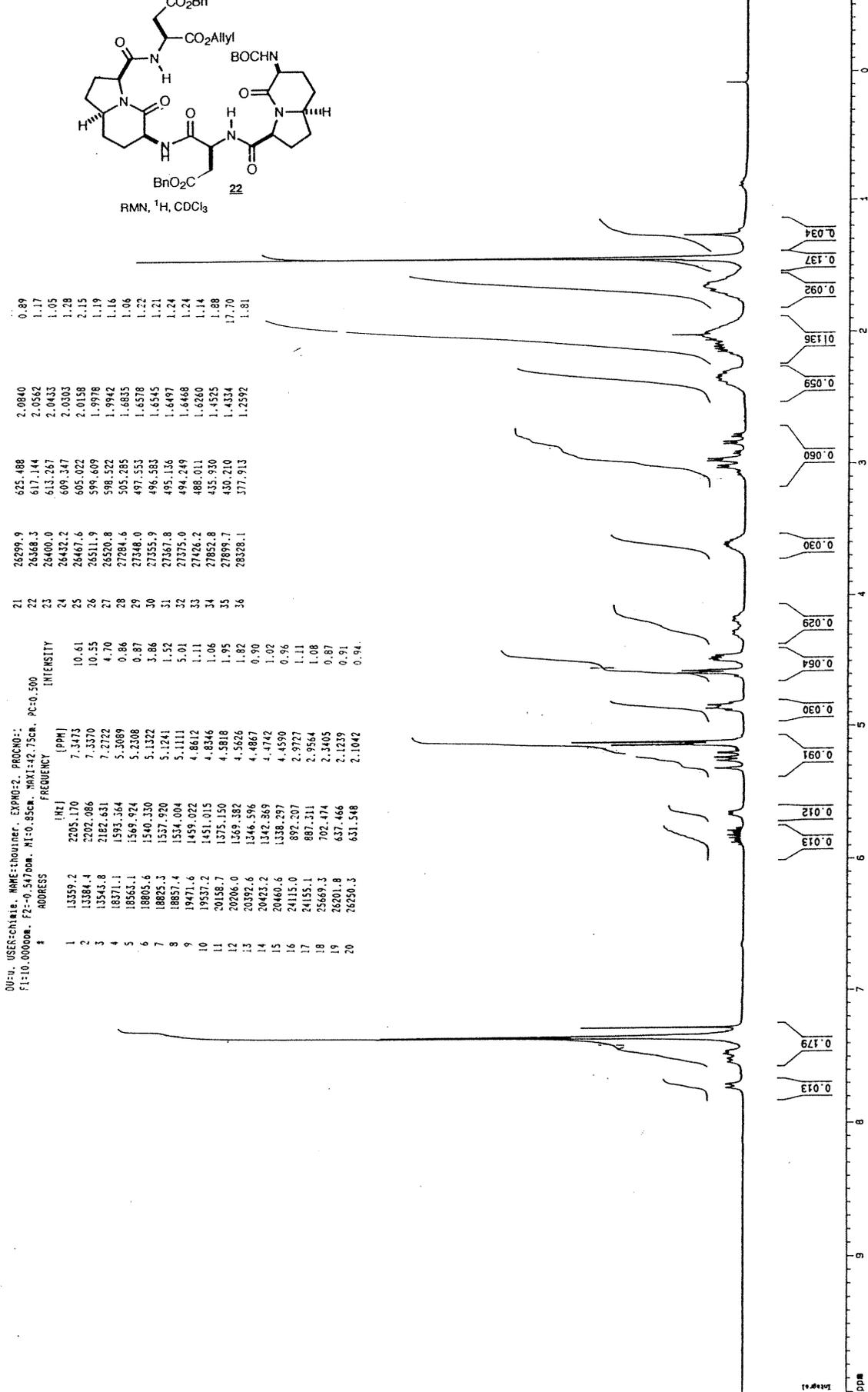
31	24476.4	848.087	2.8257	4.71
32	26061.5	654.590	2.1810	2.03
33	26065.5	654.104	2.1794	2.08
34	26125.4	646.789	2.1550	0.79
35	26374.1	616.433	2.0339	2.22
36	26396.9	613.655	2.0446	2.18
37	26455.3	606.319	2.0208	2.28
38	27313.1	501.615	1.6720	0.80
39	27345.1	497.908	1.6590	0.87
40	27358.2	496.307	1.6536	0.88
41	27377.3	493.975	1.6459	0.91
42	27382.3	493.364	1.6438	0.91
43	27415.1	489.361	1.6305	0.83
44	27431.4	487.374	1.6219	0.83
45	27437.7	486.601	1.6213	0.83
46	27670.2	458.221	1.5267	0.78
47	27673.7	457.798	1.5253	0.74
48	28321.4	378.728	1.2619	0.96

DU=0, USER=chiste, NAME=thoumer, EXPNO=1, PROCNO=1
 F1=10.000ppm, F2=-0.532ppm, M1=0.61cm, MAX1=33.67cm, PC=0.500
 ADDRESS, FREQ, INTENSITY

1	12089.9	2160.113	7.8635	1.04
2	12153.2	2352.390	7.8378	1.01
3	13310.7	2211.894	7.3670	1.24
4	13412.9	2198.618	7.3255	17.86
5	13541.3	2182.935	7.2732	2.62
6	13545.7	2182.398	7.2714	2.54
7	17058.8	1753.562	5.8426	0.72
8	17144.8	1743.862	5.8076	1.00
9	17198.5	1736.502	5.7858	1.01
10	17288.9	1731.574	5.7694	0.70
11	17284.2	1728.046	5.7509	0.93
12	18415.4	1587.958	5.2908	2.04
13	18423.6	1586.955	5.2875	2.06
14	18556.1	1570.780	5.2336	1.92
15	18565.0	1569.699	5.2300	2.01
16	18595.3	1565.513	5.2161	2.31
17	18684.8	1555.070	5.1813	1.96
18	18608.2	1540.009	5.1311	0.77
19	18854.1	1534.403	5.1124	1.16
20	18916.4	1526.795	5.0871	6.36
21	19474.2	1458.706	4.8602	0.96
22	19525.8	1452.405	4.8392	0.96
23	20174.9	1373.171	4.5752	0.65
24	20178.0	1372.792	4.5739	0.66
25	20181.7	1372.101	4.5716	0.66
26	20257.0	1363.150	4.5416	3.77
27	20303.9	1357.425	4.5227	3.68
28	24017.2	904.137	3.0125	1.28
29	24067.2	898.038	2.9921	1.97
30	24473.0	848.507	2.8271	5.11

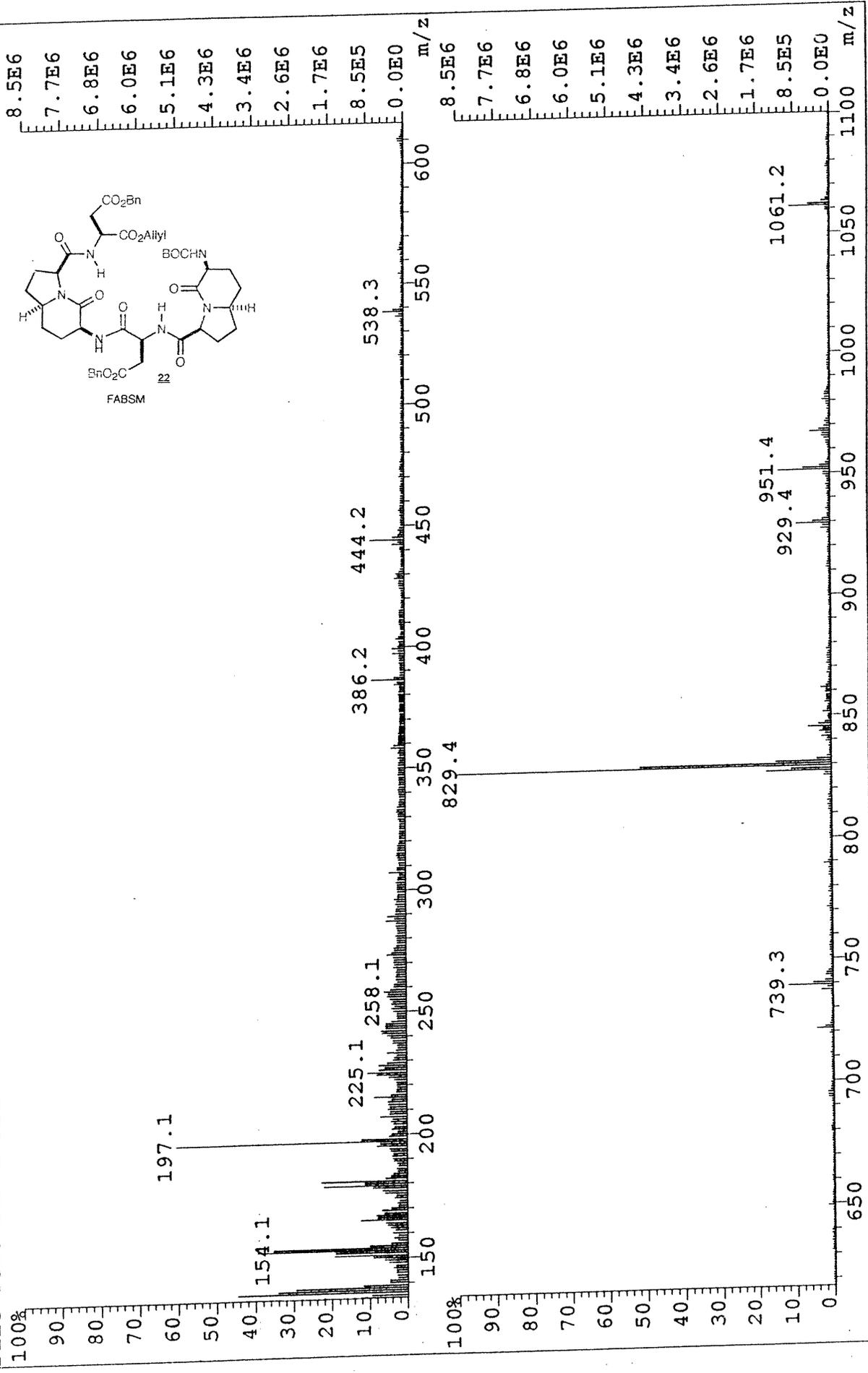






22
 RMN, ¹H, CDCl₃

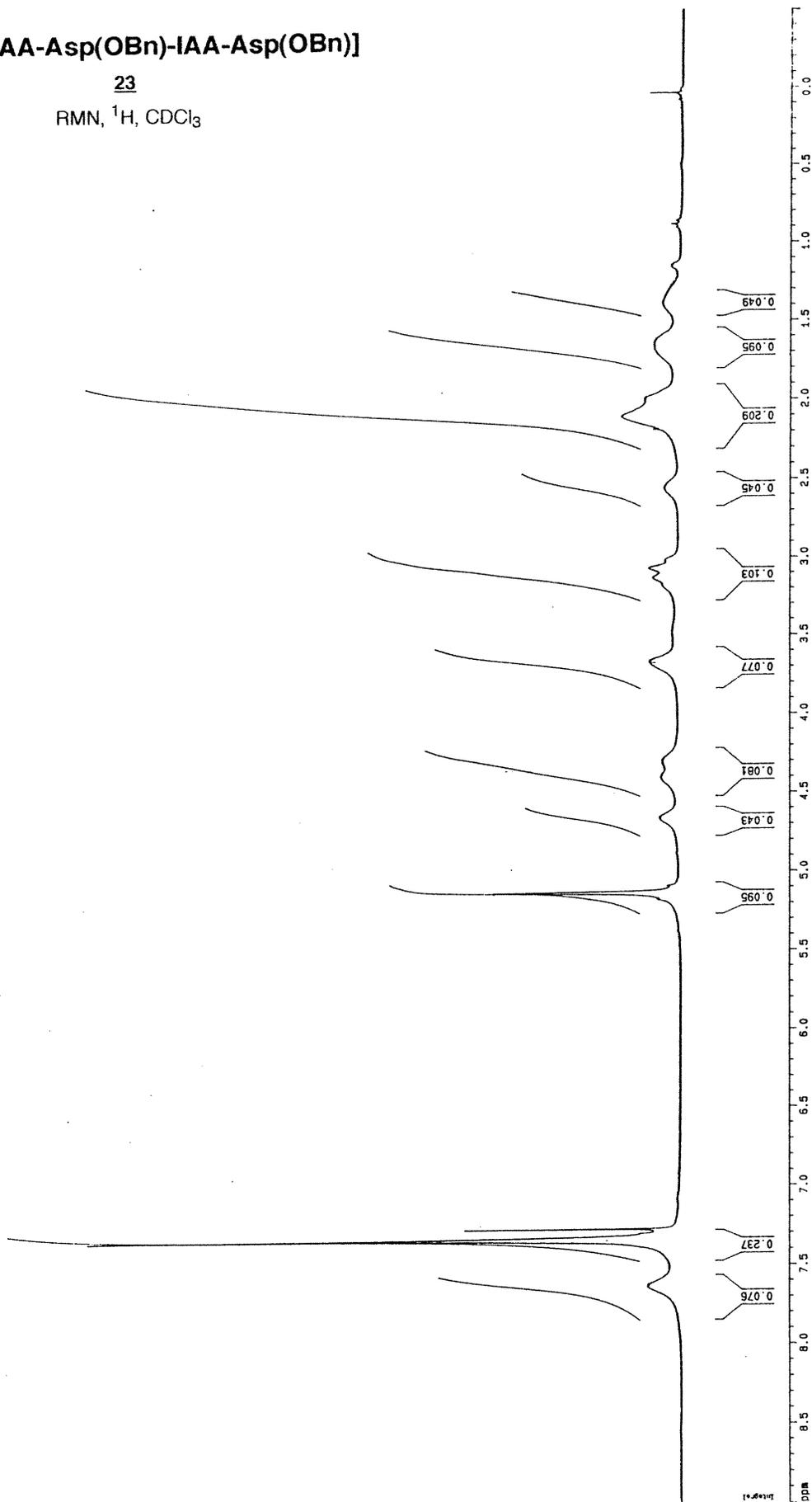
File: V95H0858FAZ13 Ident: 4 Acq: 8-AUG-1995 16:22:47 +0:37 Cal:GO_1
 AutoSpecQ FAB+ Magnet BpI:8517492 TIC:211707824 Flags:HALL
 File Text: DIM-2-NBA



cyclo[IAA-Asp(OBn)-IAA-Asp(OBn)]

23

RMN, ^1H , CDCl_3



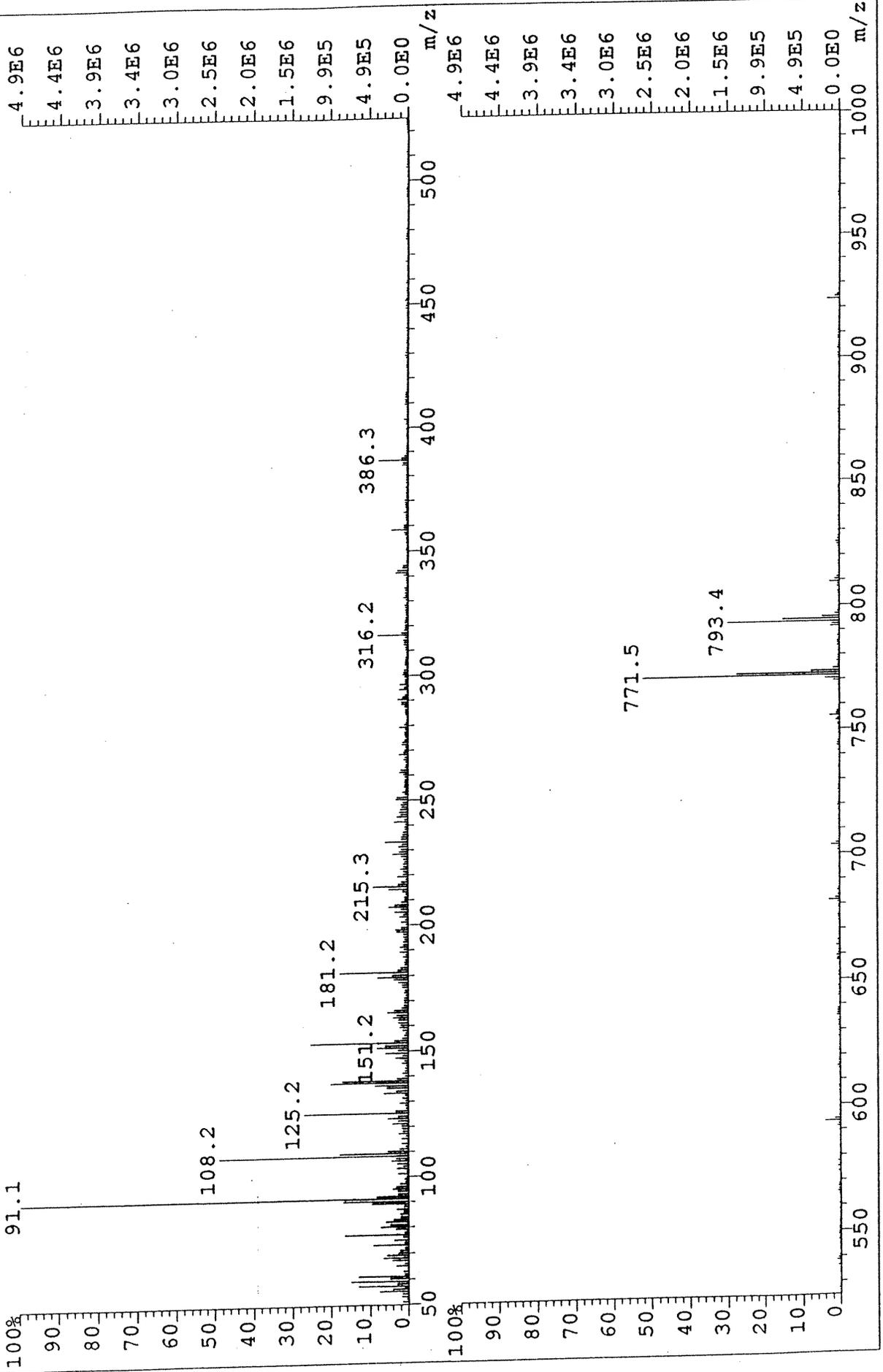
cyclo[IAA-Asp(OBn)-IAA-Asp(OBn)]

23

FABSM

Lv

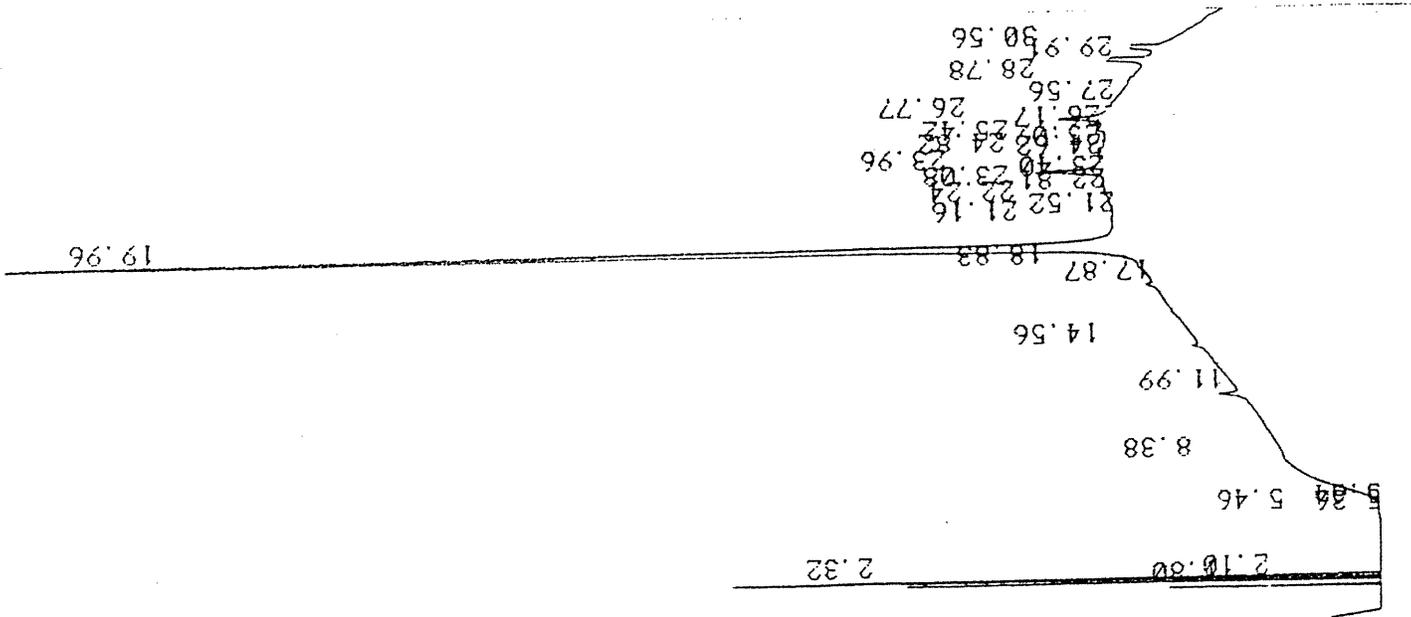
File:V95I1260FAZ01 Ident:3 Acq:12-SEP-1995 16:20:51 +0:28 Cal:GO_1
AutoSpecQ FAB+ Magnet BpI:4926602 TIC:71053696 Flags:HALL
File Text:CYCLE-2-THIO



cyclo[IAA-Asp(OBn)-IAA-Asp(OBn)]

23

Chromatogramme HPLC phase inversée (C-18)
10-100 % CH₃CN/H₂O + 0,1 % TFA, 30 min; 1,5 ml/min

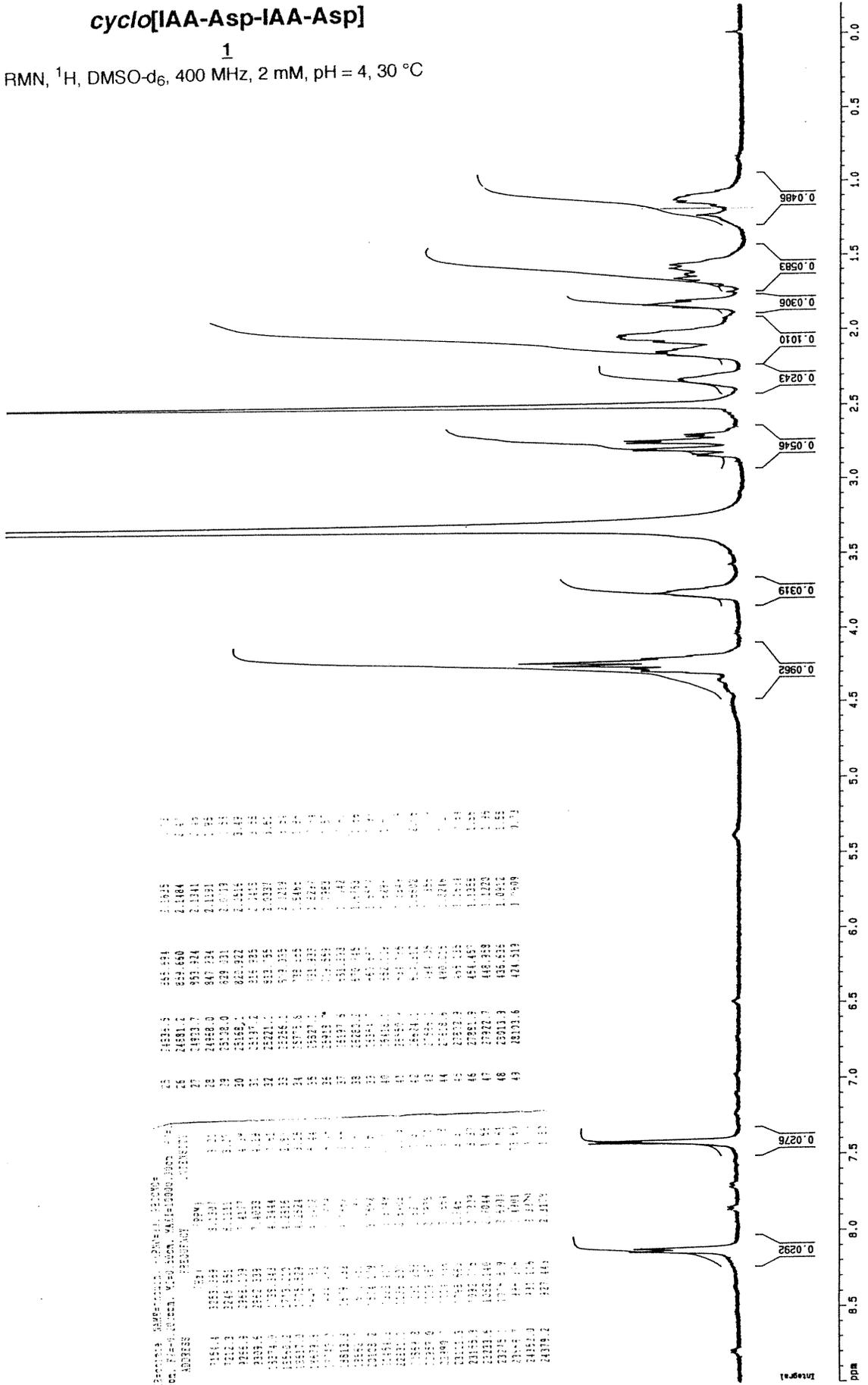


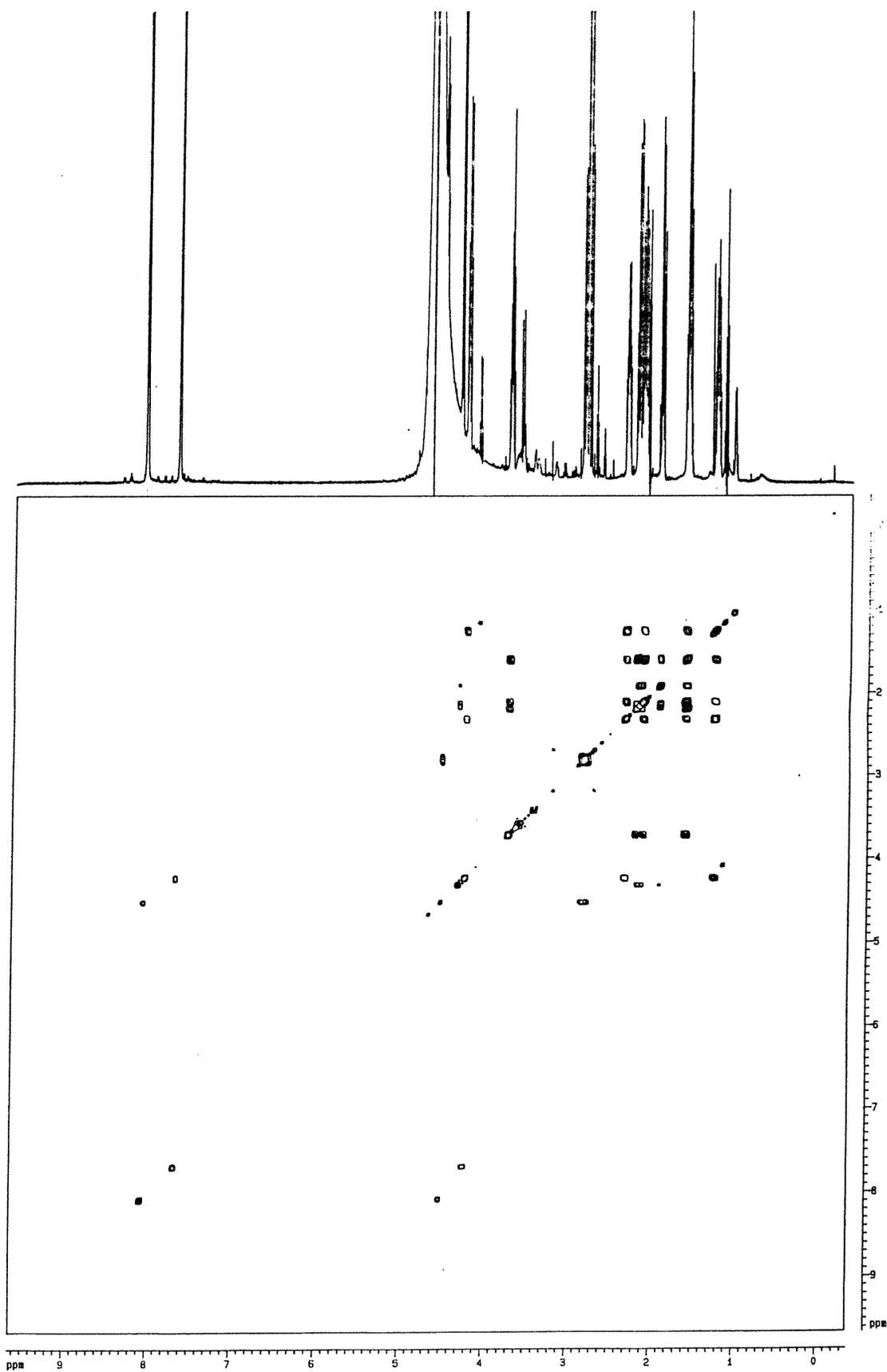
CHANNEL A INJECT 09/13/95 15:19:42 STORED TO BIN # 3

cyclo[IAA-Asp-IAA-Asp]

1

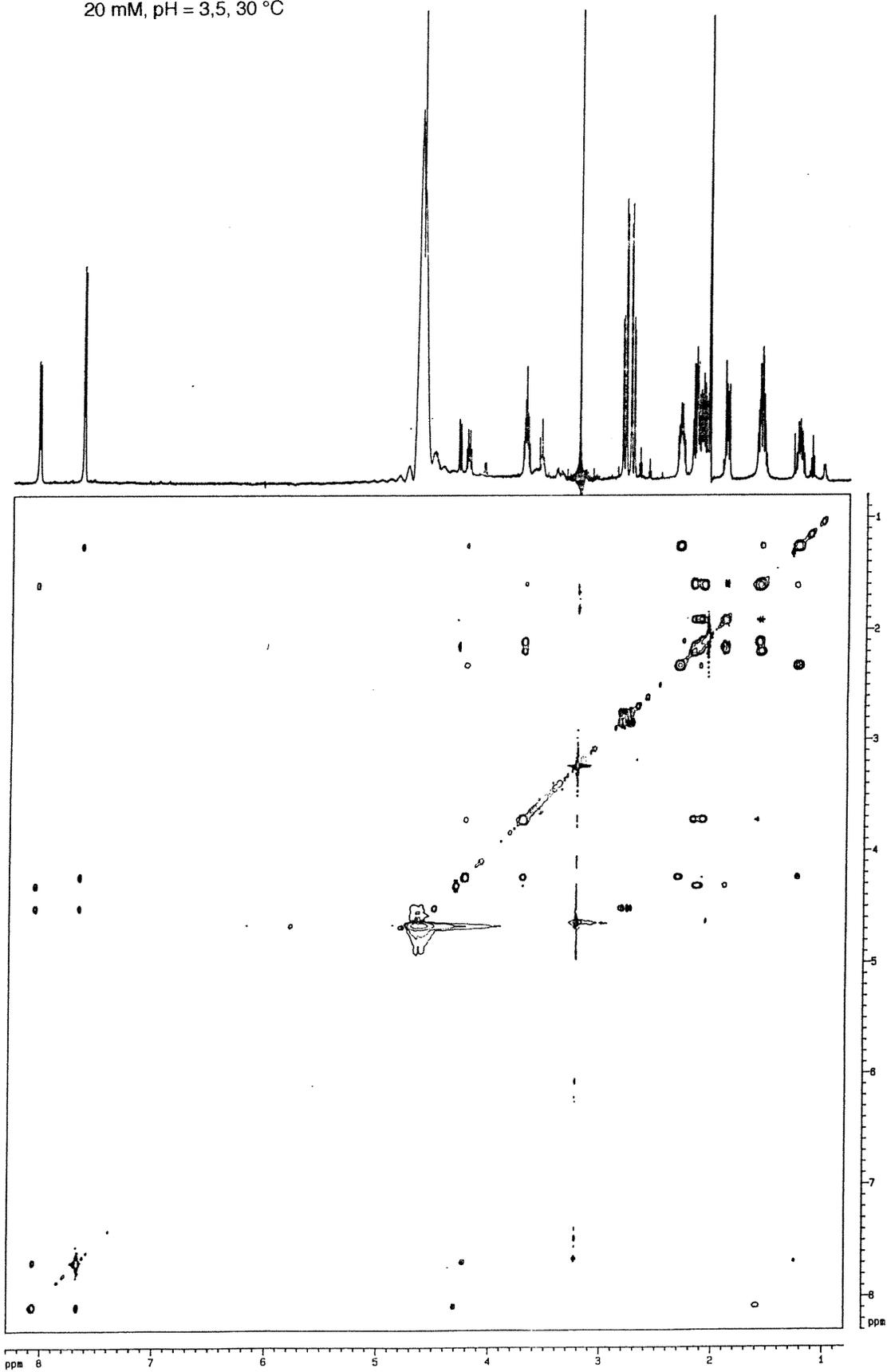
RMN, ¹H, DMSO-d₆, 400 MHz, 2 mM, pH = 4, 30 °C



cyclo[IAA-Asp-IAA-Asp]**1** ^1H - ^1H COSY, $\text{H}_2\text{O}:\text{OC}(\text{CD}_3)_2$ 9:1, 600 MHz,
20 mM, pH = 3,5, 30 °C

cyclo[IAA-Asp-IAA-Asp]**1**

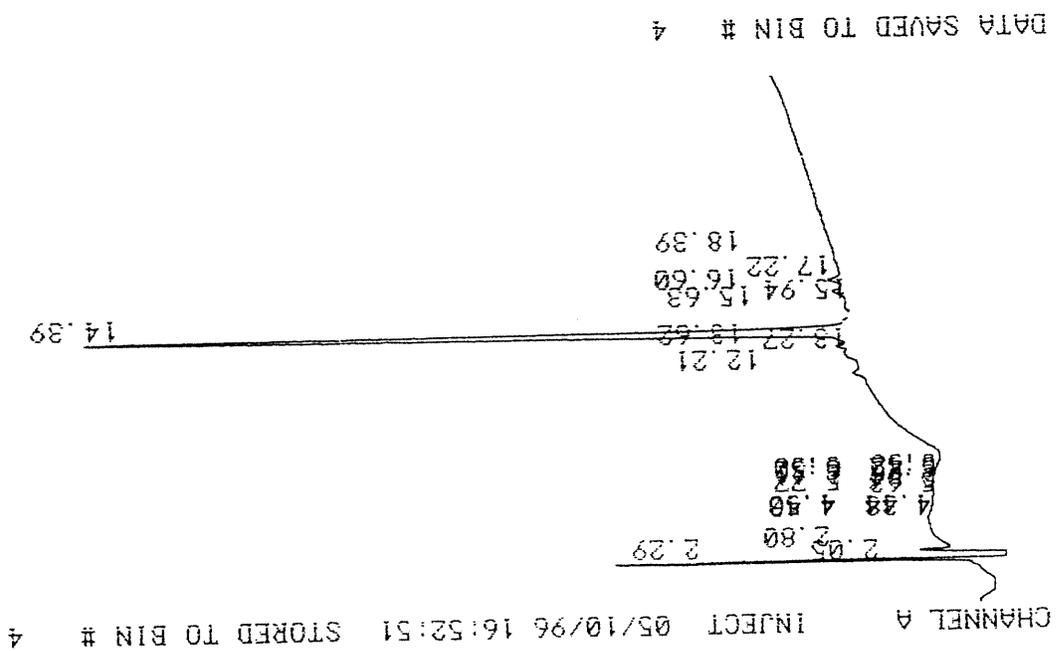
^1H - ^1H NOESY, $\text{H}_2\text{O}:\text{OC}(\text{CD}_3)_2$ 9:1, 600 MHz,
20 mM, pH = 3,5, 30 °C



cyclo[IAA-Asp-IAA-Asp]

1

Chromatogramme HPLC phase inversée (C-18)
0-50 % CH₃CN/H₂O + 0,1 % TFA, 25 min; 1,5 ml/min



Selected Isotopes:

Symbol	Min	Max	Vcy	Name
C	0	60	4	Carbon-12
H	0	90	1	Hydrogen-1
O	0	20	2	Oxygen-16
N	0	8	3	Nitrogen-14

cyclo[IAA-Asp-IAA-Asp]

1
SMHR

Allowable error = minimum of 10.0 ppm, 5.0 mmu.
Ring/Double Bond limits = [-0.5 : 100.0]

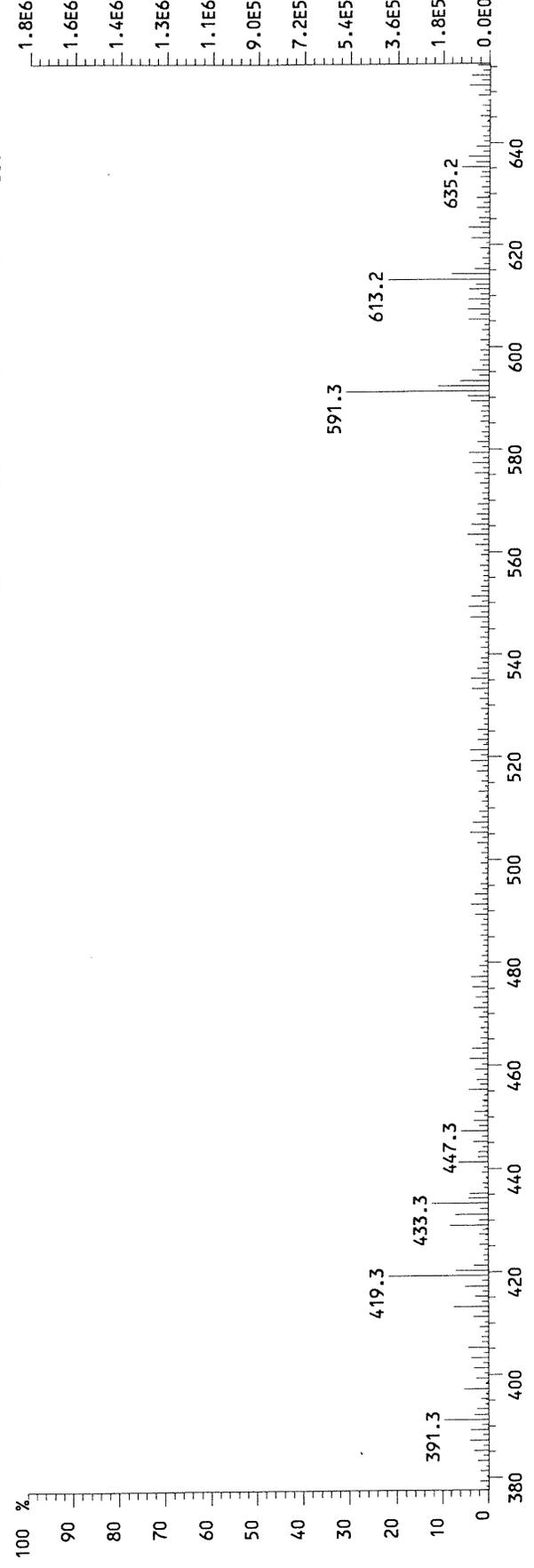
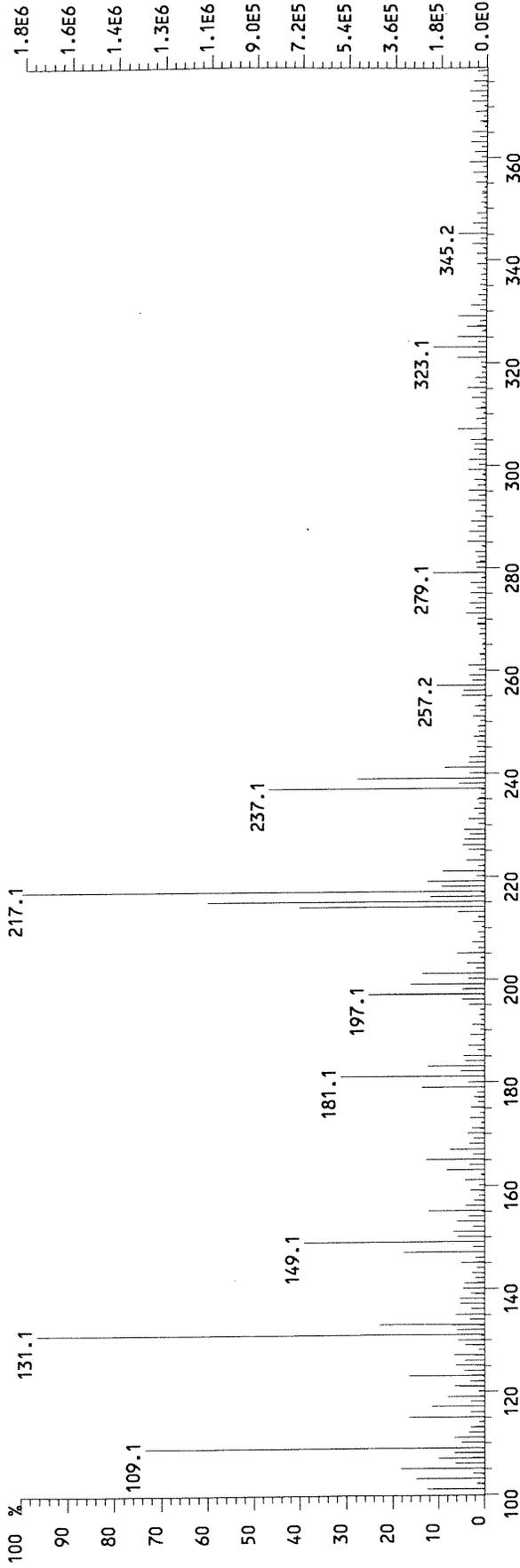
Mass	Calculated	ppm	mmu	R/DB	Formula
591.24000	591.24011	0.2	0.1	7.5	C ₂₅ H ₃₉ O ₁₄ N ₂
	591.23962	-0.6	-0.4	25.5	C ₃₈ H ₃₁ O ₃ N ₄
	591.24097	1.6	1.0	25.0	C ₄₀ H ₃₃ O ₄ N
	591.23877	-2.1	-1.2	8.0	C ₂₃ H ₃₇ O ₁₃ N ₅
	591.24146	2.5	1.5	12.5	C ₂₆ H ₃₅ O ₁₀ N ₆ ←
	591.23828	-2.9	-1.7	26.0	C ₃₆ H ₂₉ O ₂ N ₇
	591.23828	-2.9	-1.7	20.5	C ₃₇ H ₃₅ O ₇
	591.24231	3.9	2.3	30.0	C ₄₁ H ₂₉ N ₅
	591.23743	-4.4	-2.6	3.0	C ₂₂ H ₄₁ O ₁₇ N
	591.23743	-4.4	-2.6	8.5	C ₂₁ H ₃₅ O ₁₂ N ₈
	591.24280	4.7	2.8	12.0	C ₂₈ H ₃₇ O ₁₁ N ₃
	591.23694	-5.2	-3.1	21.0	C ₃₅ H ₃₃ O ₆ N ₃
	591.24335	5.7	3.3	-0.5	C ₁₄ H ₃₉ O ₁₇ N ₈
	591.24365	6.2	3.7	29.5	C ₄₃ H ₃₁ O _N ₂
	591.23608	-6.6	-3.9	3.5	C ₂₀ H ₃₉ O ₁₆ N ₄
	591.24414	7.0	4.1	17.0	C ₂₉ H ₃₃ O ₇ N ₇
	591.24414	7.0	4.1	11.5	C ₃₀ H ₃₉ O ₁₂
	591.23560	-7.4	-4.4	21.5	C ₃₃ H ₃₁ O ₅ N ₆

***** End of Atomic Composition Report *****

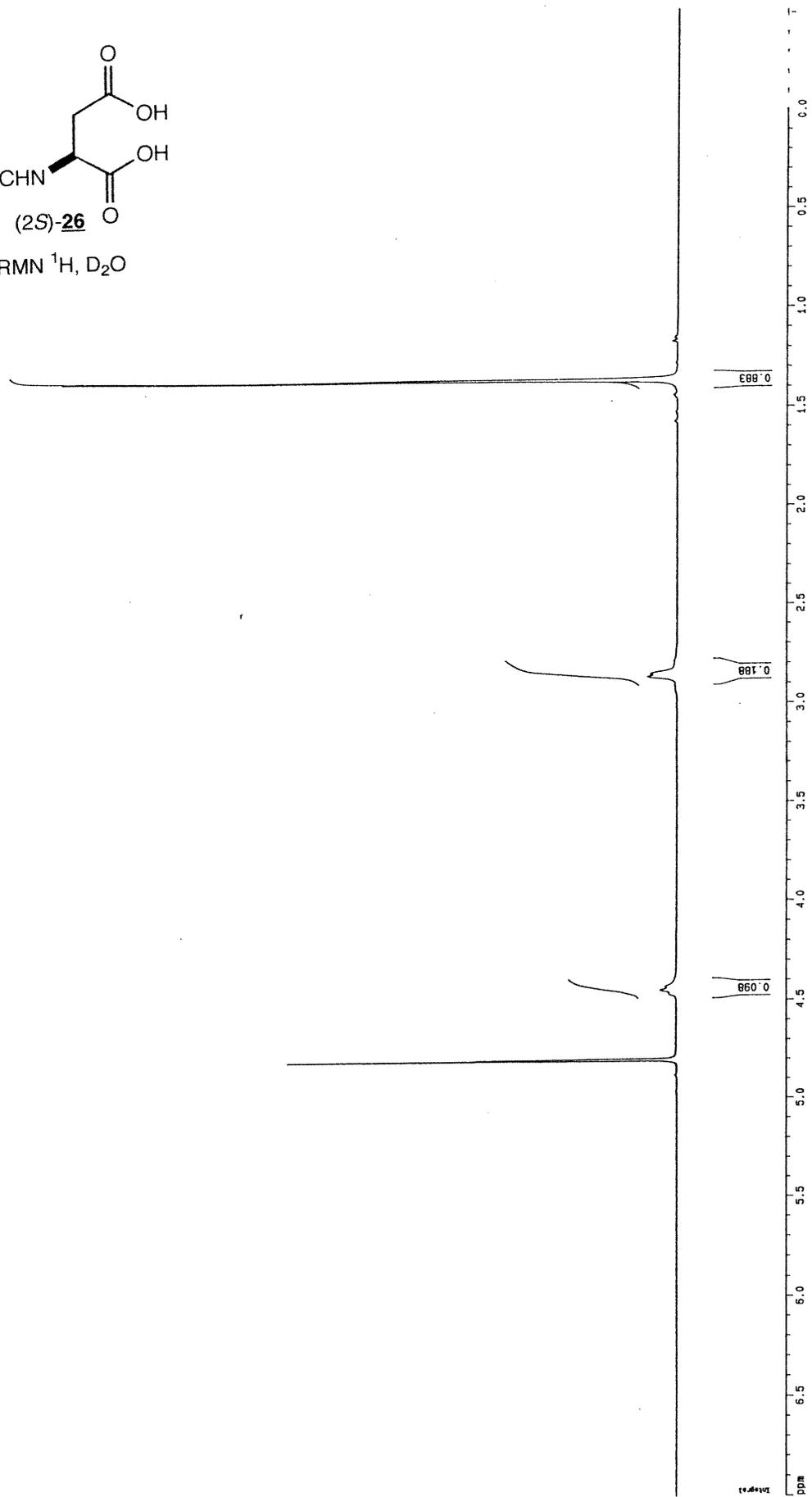
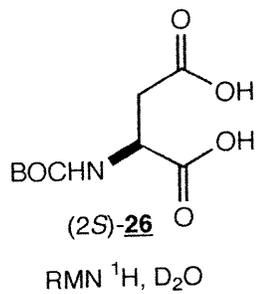
cyclo[IAA-Asp-IAA-Asp]

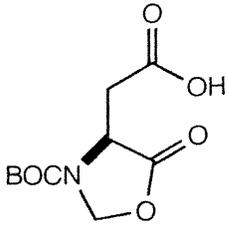
1

FABSM



File:V95I2507FAZ13 Ident:3 Acq:25-SEP-1995 10:55:47 +0:19 Cal:GO_1
AutoSpecQ FAB+ Magnet BpI:1792771 TIC:48620052 Flags:HALL
File Text:CYCL-OH-THIO



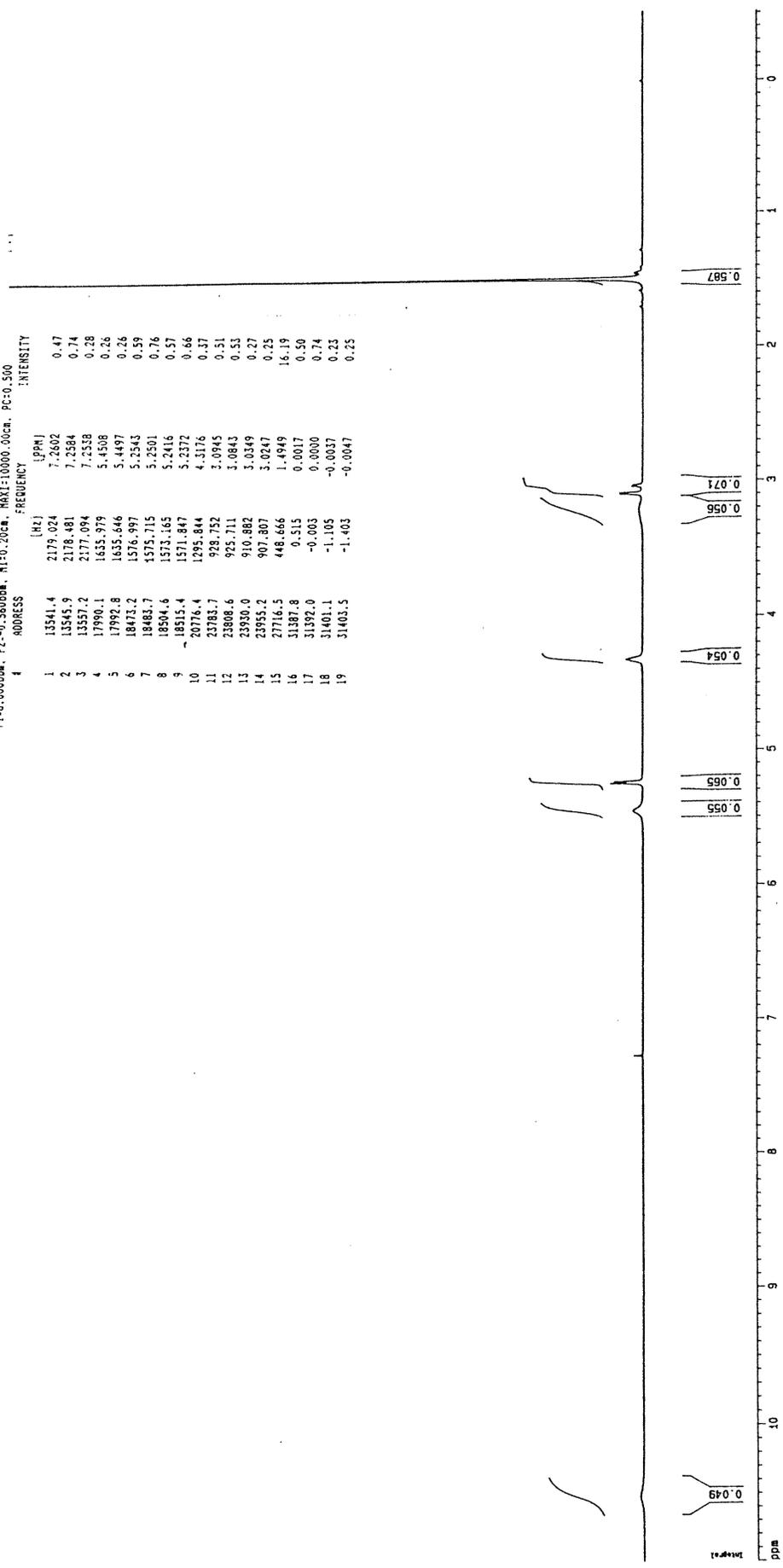


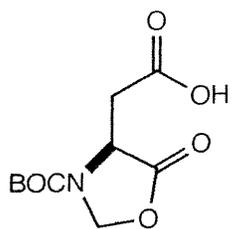
(4S)-25

RMN ¹H, CDCl₃

20cu, USER:chale, NAME:thouner, EXPNO:1, PROCNO:1
 F1:8.000000, F2:-0.560000, M1:0.2000, MAXI:10000.0000, PC:0.500

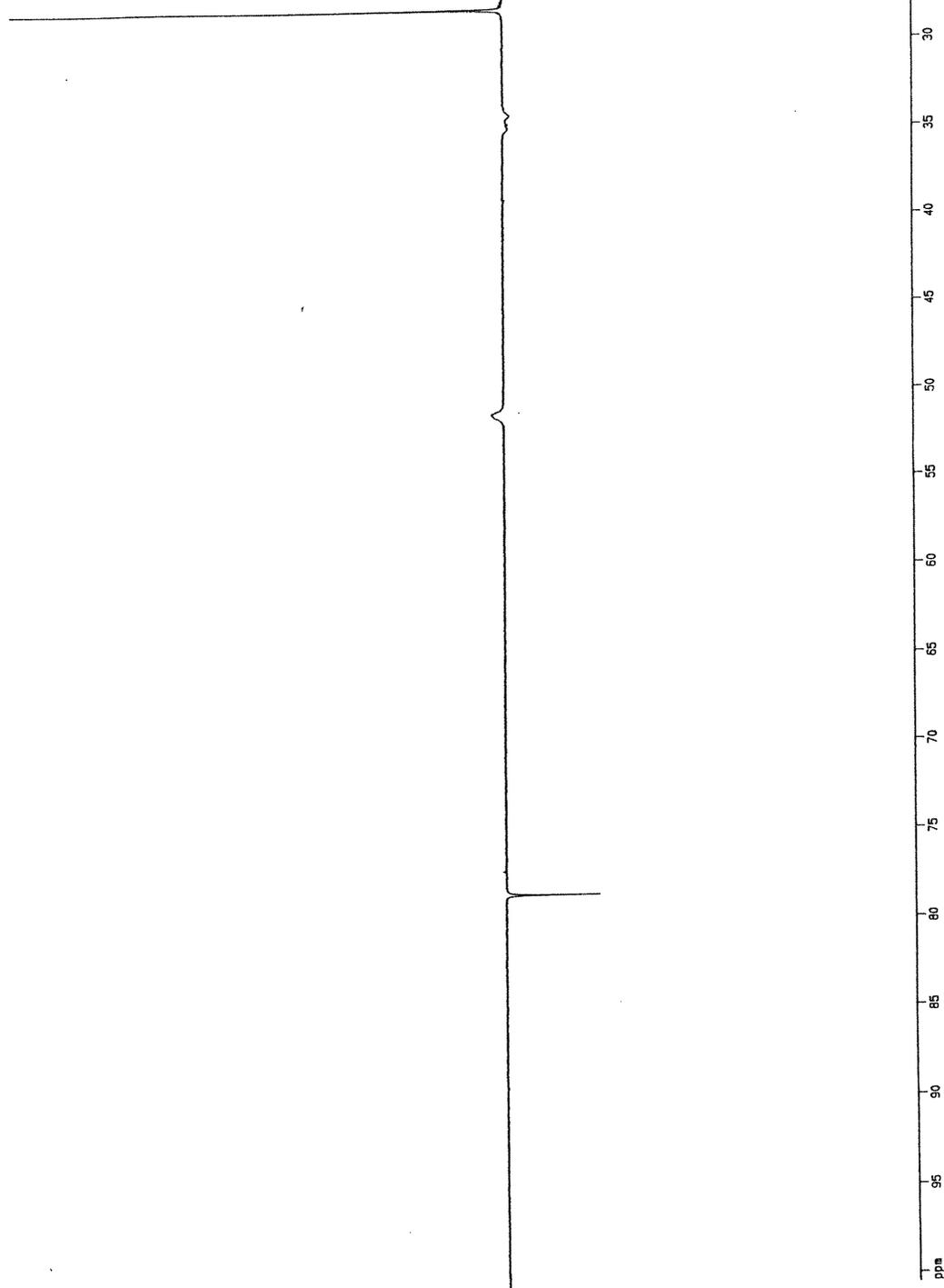
F4	F3	ADDRESS	FREQUENCY (Hz)	[PPM]	INTENSITY
1	1	13541.4	2179.024	7.2602	0.47
2	1	13545.9	2178.481	7.2584	0.74
3	1	13557.2	2177.094	7.2558	0.28
4	1	17990.1	1635.979	5.4508	0.26
5	1	17992.8	1635.646	5.4497	0.26
6	1	18473.2	1576.997	5.2543	0.59
7	1	18483.7	1575.715	5.2501	0.76
8	1	18504.6	1573.165	5.2416	0.57
9	1	18515.4	1571.847	5.2372	0.66
10	1	20076.4	1295.844	4.3176	0.37
11	1	23787.7	929.752	3.0945	0.51
12	1	23808.6	925.711	3.0843	0.53
13	1	23930.0	910.882	3.0349	0.27
14	1	23955.2	907.807	3.0247	0.25
15	1	27716.5	446.666	1.4949	16.19
16	1	31387.8	0.515	0.0017	0.50
17	1	31392.0	-0.003	0.0000	0.74
18	1	31401.1	-1.105	-0.0037	0.23
19	1	31403.5	-1.403	-0.0047	0.25



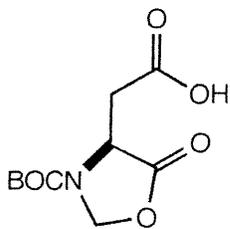


(4S)-25

DEPT, CDCl₃



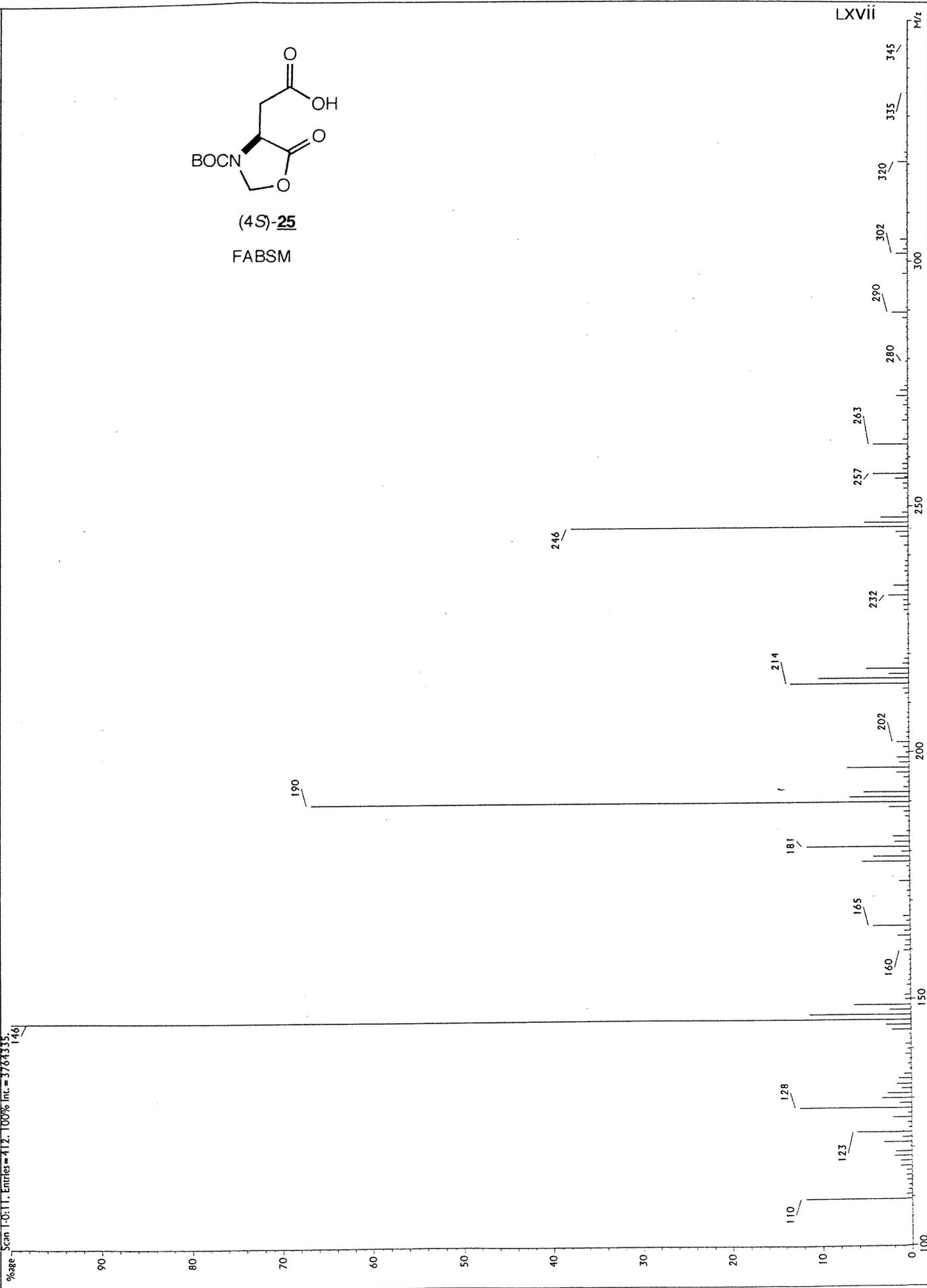
File: L1309L13
Title: OXA-ASP
Desc:
Ion Date: 12/13/95. Time: 11:20:19. Type: Lo-Res Mass Data (Centroid)
Res=2000, Scan/Pk=20, Thresh=200, PeakWidth=10, MultWidth=7
Delay=1.00, Scan Rate=10.0 (100%)
Local Start, Delay=0.00, File Delay=0.00
Scan 1-0:11. Entries=412. 100% Int.=3764335.

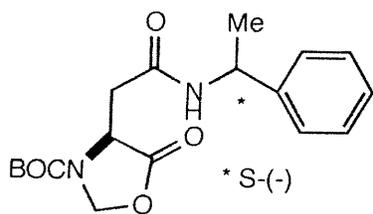


(4S)-25

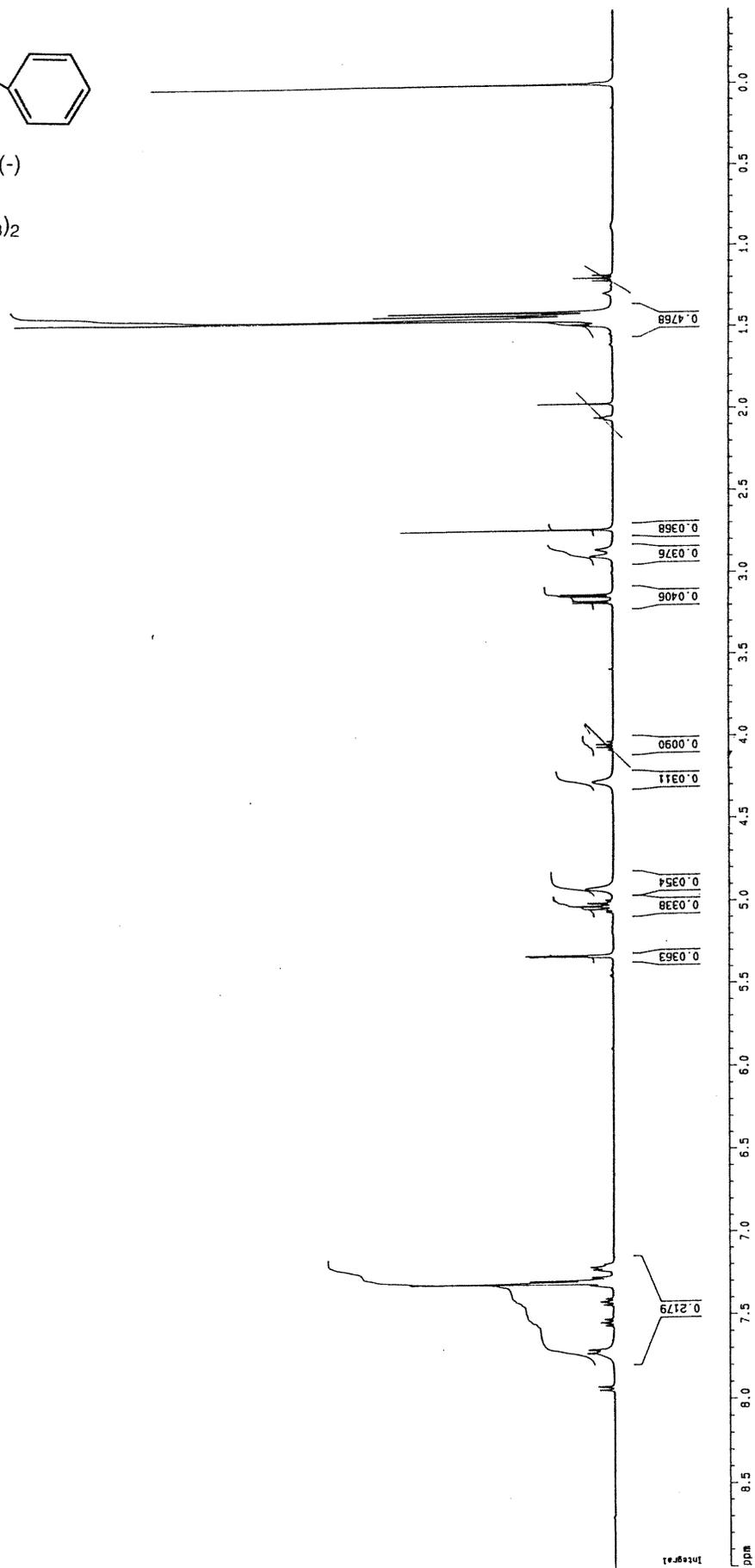
FABSM

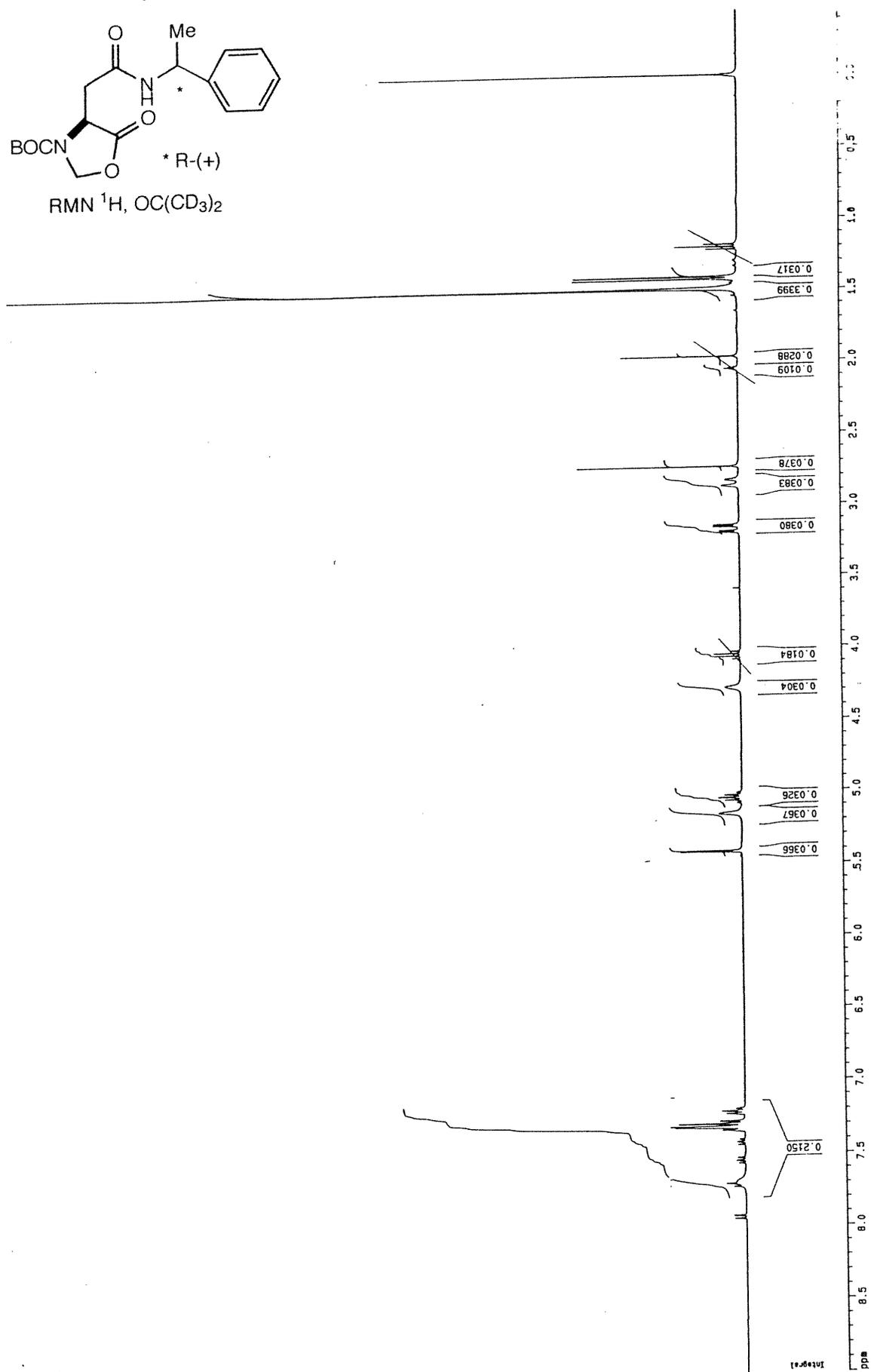
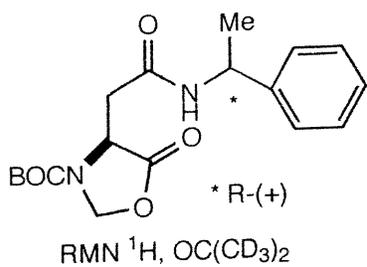
LXVII

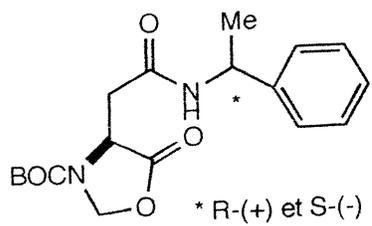




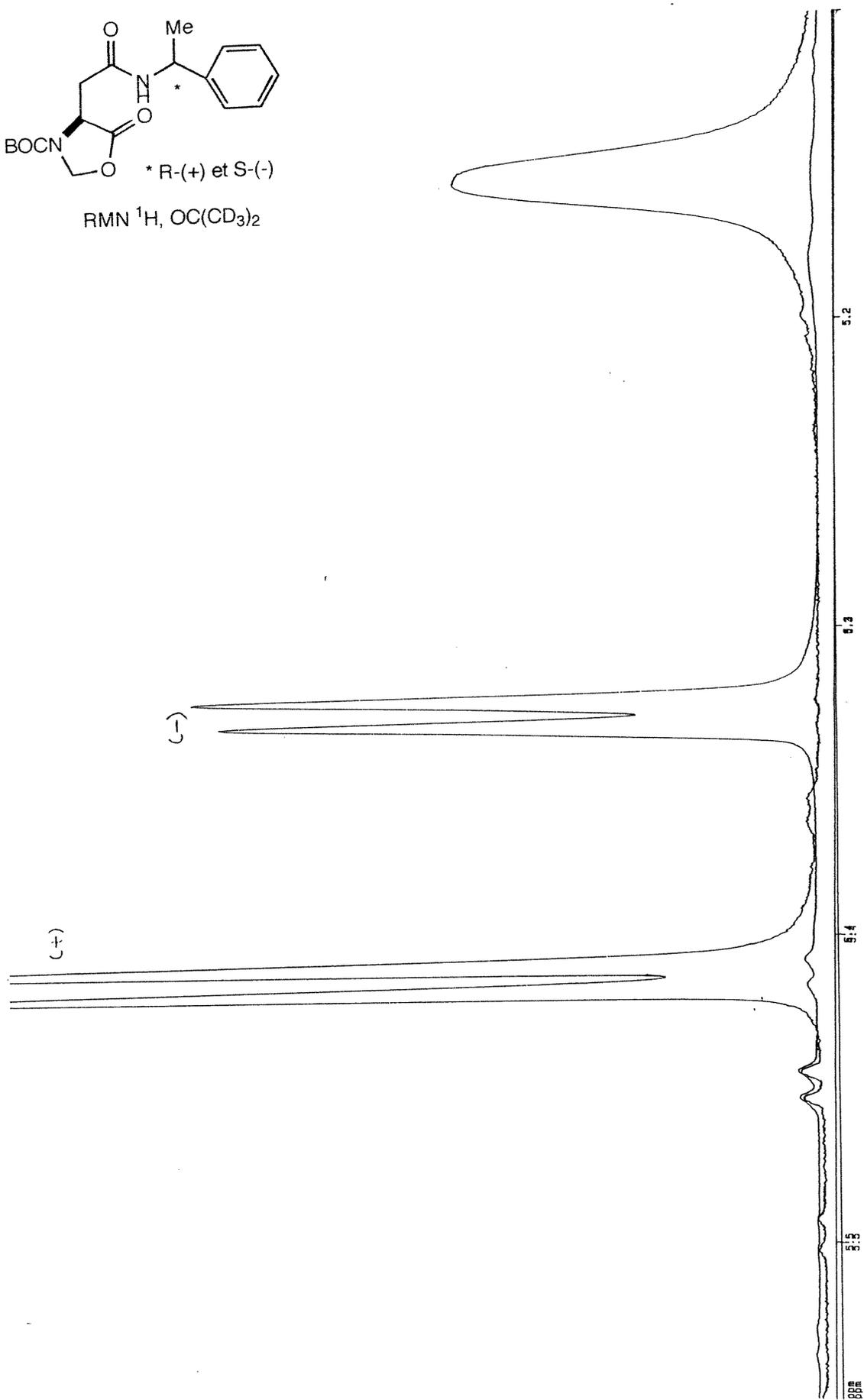
RMN ¹H, OC(CD₃)₂

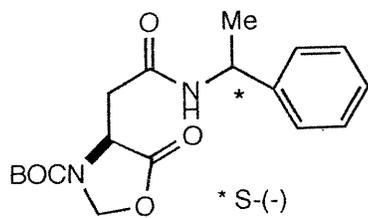




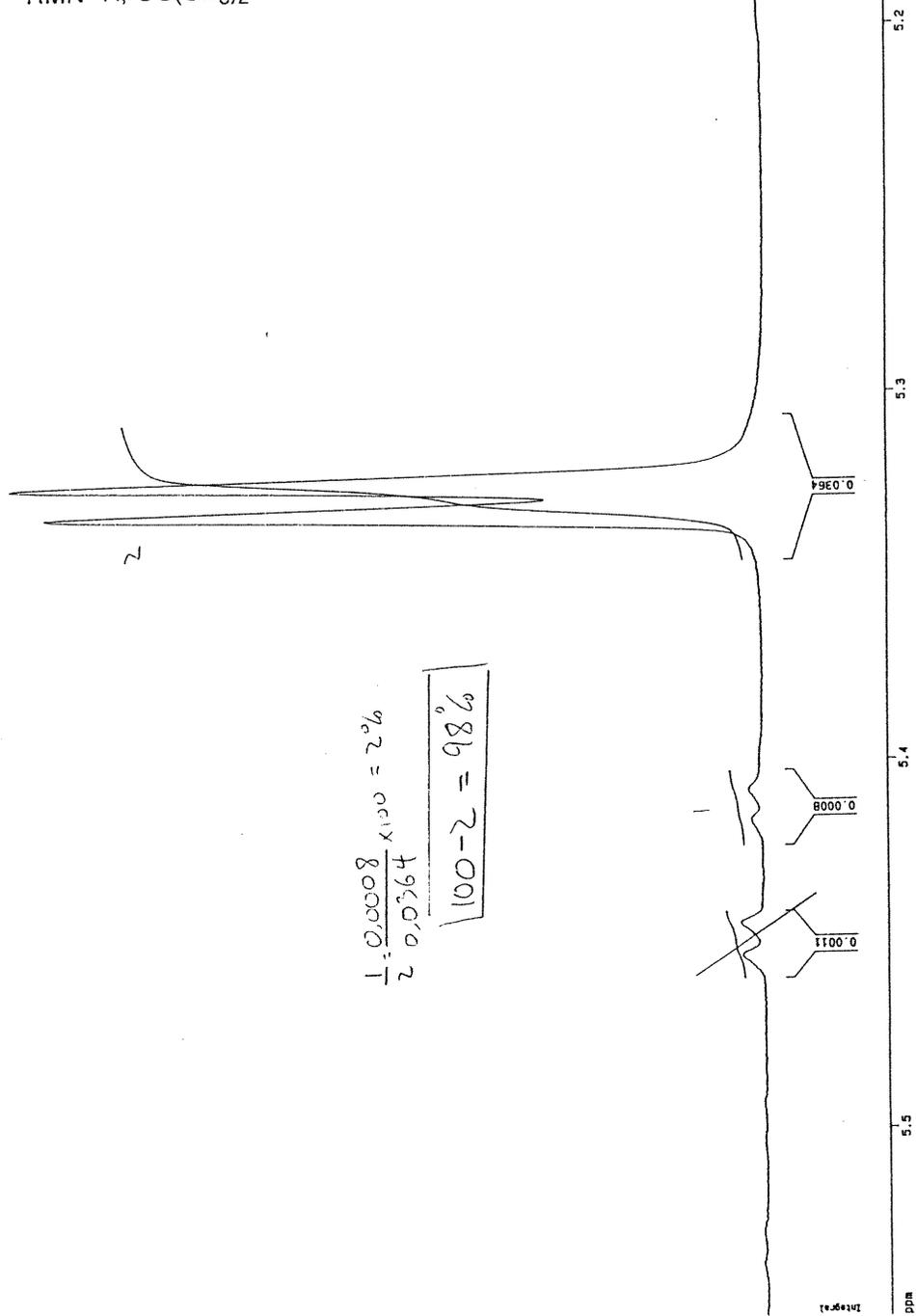


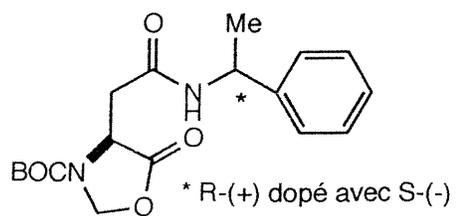
RMN ^1H , $\text{OC}(\text{CD}_3)_2$



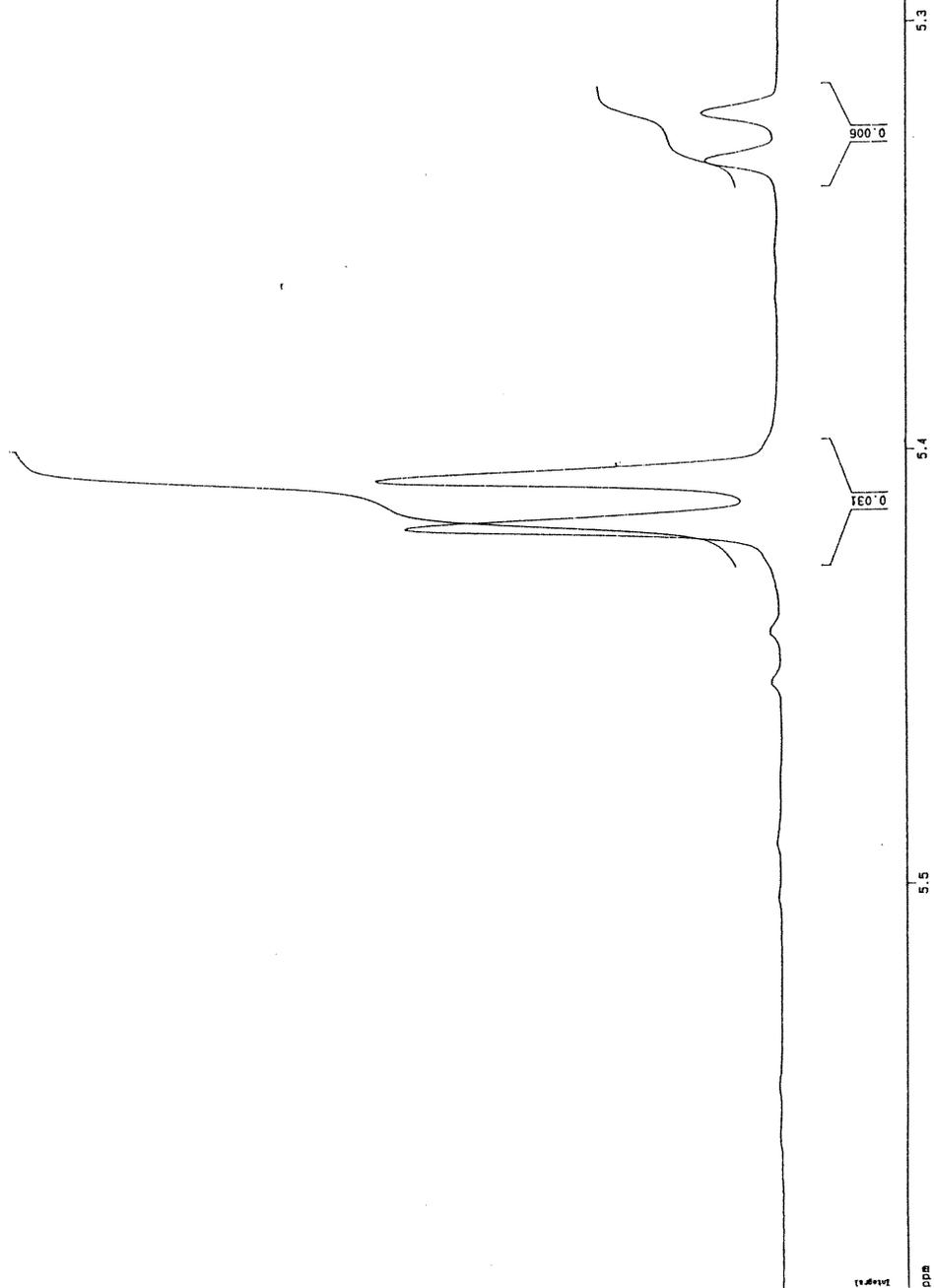


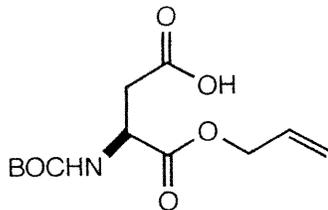
RMN ^1H , $\text{OC}(\text{CD}_3)_2$





RMN ^1H , $\text{OC}(\text{CD}_3)_2$



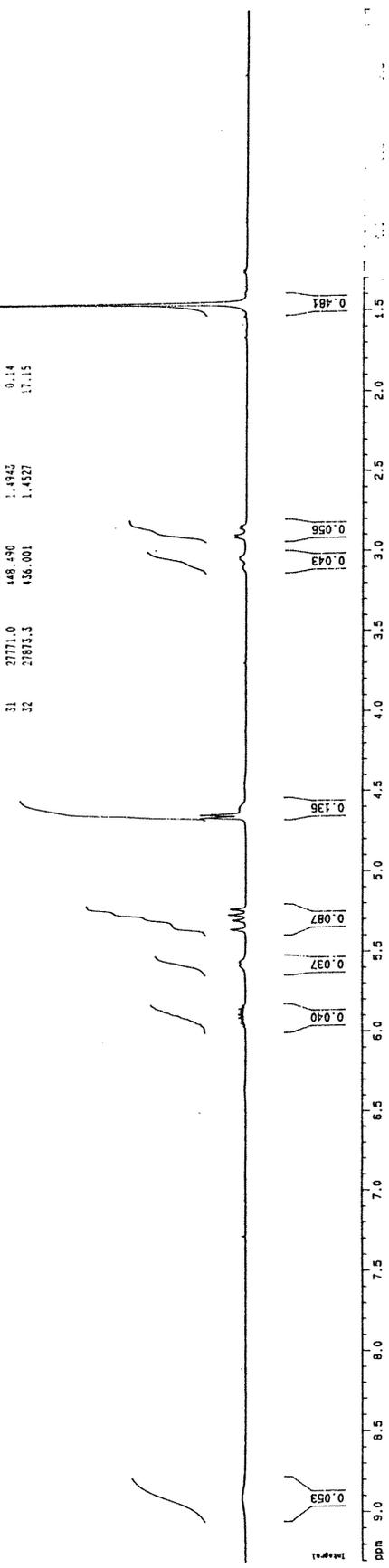


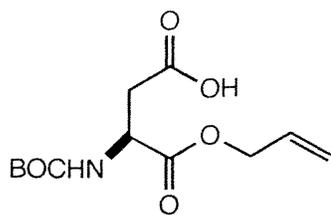
(2S)-24

RMN ¹H, CDCl₃

J000_255cmhale, MMH:thouner, EXPNO:1, PROCNO:1
 F1:9.3010cm, F2:-0.4050cm, MISO:1cm, MAXI:1000.00cm, POC:1.00
 ADDRESS FREQUENCY (Hz) F2 (ppm) INTENSITY

1	13546.2	2184.507	7.2728	0.10
2	16831.4	1763.555	5.2436	0.15
3	18835.0	1778.587	5.2687	0.11
4	16918.4	1775.566	5.2683	0.17
5	16971.4	1766.795	5.2667	0.19
6	17016.9	1761.215	5.2682	0.13
7	17057.8	1756.252	5.2616	0.17
8	17114.8	1676.047	5.5843	0.16
9	17781.9	1667.557	5.5371	0.16
10	18265.7	1608.208	5.3603	0.37
11	18278.1	1607.550	5.3561	0.40
12	18406.6	1591.692	5.3030	0.31
13	18417.1	1590.319	5.2987	0.34
14	18492.3	1581.140	5.2681	0.42
15	18501.4	1580.027	5.2644	0.45
16	18577.7	1570.719	5.2354	0.35
17	18586.9	1569.558	5.2297	0.40
18	19774.3	1400.236	4.5654	0.70
19	19984.7	1395.763	4.5311	1.19
20	20021.1	1394.514	4.5463	0.73
21	20031.7	1393.226	4.5420	1.18
22	20081.8	1387.108	4.5216	0.15
23	20117.1	1382.796	4.5073	0.16
24	20146.6	1378.196	4.5953	0.16
25	23984.2	313.187	5.2426	0.17
26	23993.5	309.598	5.0307	0.17
27	24294.3	372.583	5.2083	0.31
28	24330.8	366.431	5.2935	0.31
29	24436.0	355.593	5.2807	0.17
30	24472.8	351.102	5.2357	0.15
31	21771.0	448.490	1.4943	0.14
32	21873.3	456.001	1.4527	0.15



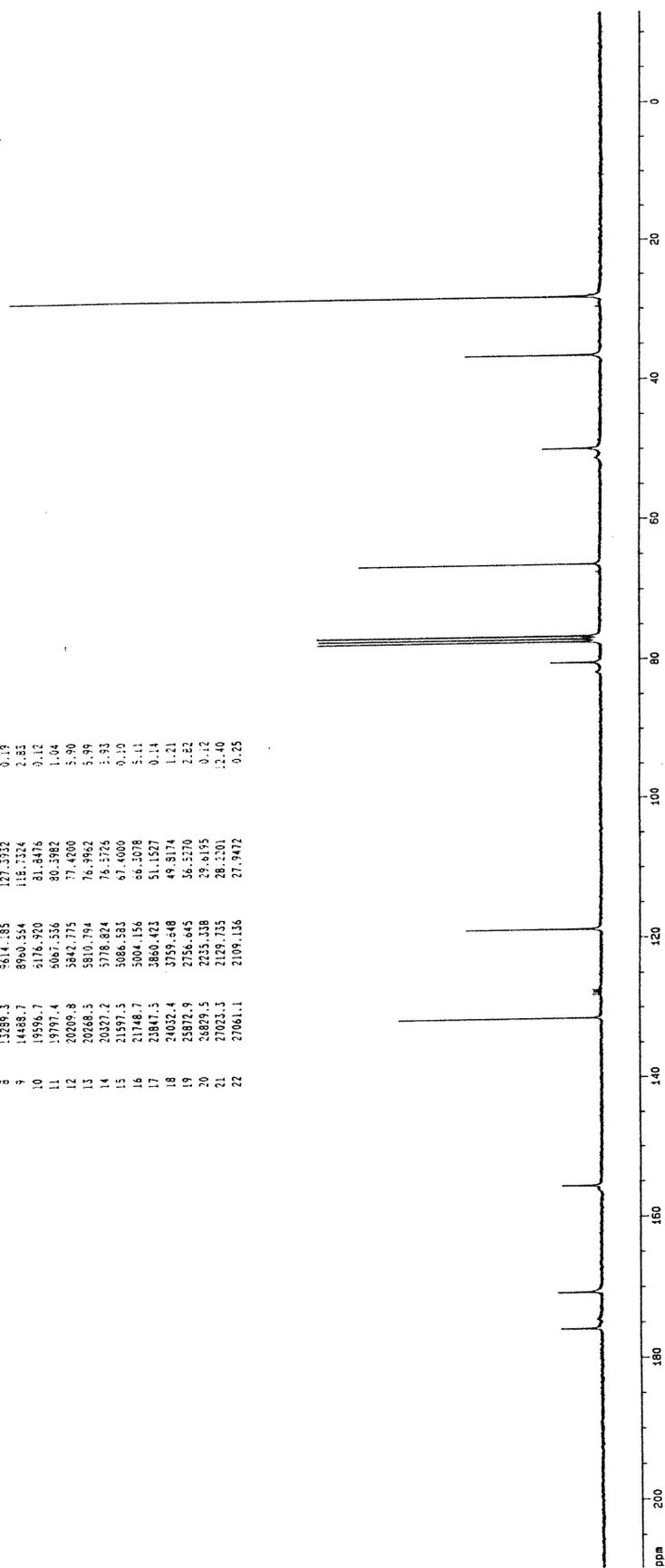


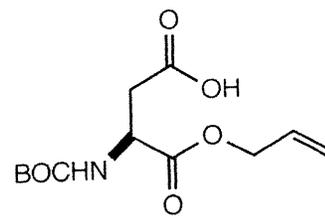
(2S)-24

RMN ^{13}C , CDCl_3

DUVU, USER:cmhale, NAME:tourner, EXPNO:2, PROCNO:1
 F1:160.000000, F2:15.262000, M1:0.000000, M2:1.000000, PC:1.400
 # ADDRESS FREQUENCY [Hz] (PPM) INTENSITY

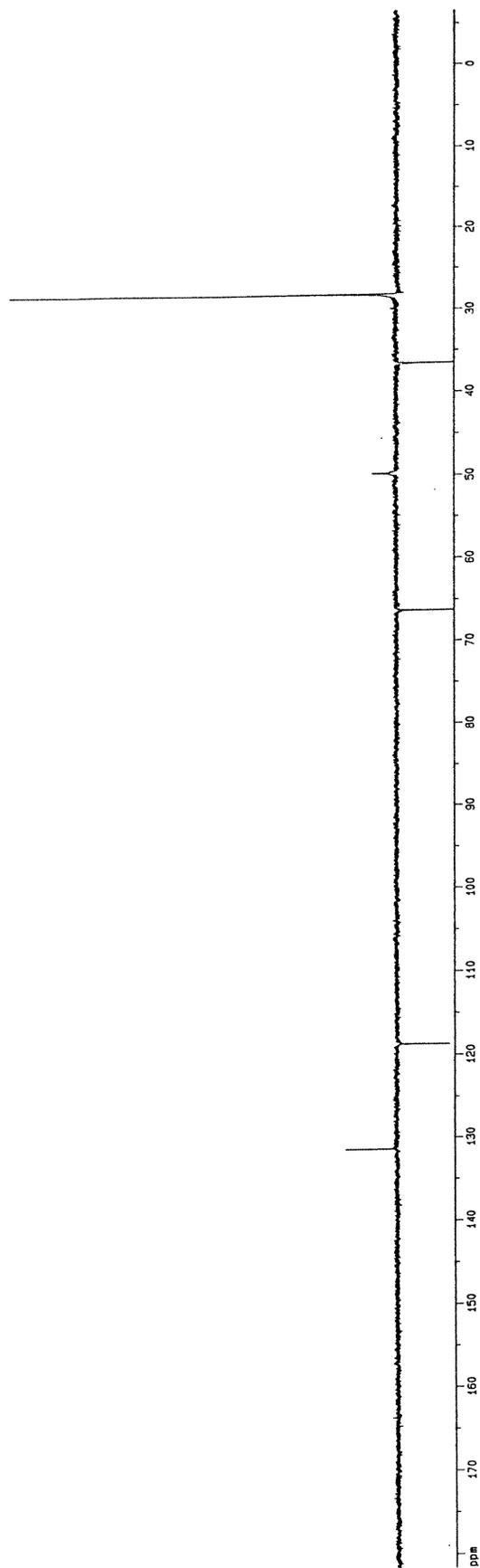
1	5888.0	13266.102	175.7851	0.85
2	5773.3	13165.127	174.4451	0.11
3	7298.7	13878.813	170.6513	0.91
4	8395.5	11716.088	155.5056	0.83
5	12733.5	9917.061	131.4034	4.44
6	13200.1	9652.794	128.0373	0.18
7	13244.1	9638.508	127.7194	0.16
8	13297.3	9614.235	127.3932	0.13
9	14489.7	8960.554	118.7324	2.83
10	19586.7	5176.920	81.8476	0.12
11	19787.4	5067.556	80.5982	1.04
12	20209.8	3842.775	71.4200	5.90
13	20268.5	5810.794	76.9862	5.99
14	20327.2	5778.824	76.5726	3.93
15	21597.5	5086.583	67.4000	0.10
16	21748.7	5004.156	66.3078	5.11
17	21947.5	3860.423	51.1527	0.14
18	24032.4	3759.648	49.8174	1.21
19	25872.9	2756.645	36.5270	2.52
20	26809.5	2255.138	29.6105	0.12
21	27023.3	2129.135	28.2301	12.40
22	27061.1	2109.136	27.9472	0.25

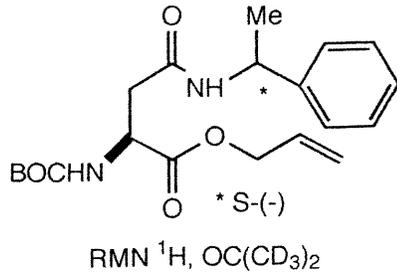




(2S)-**24**

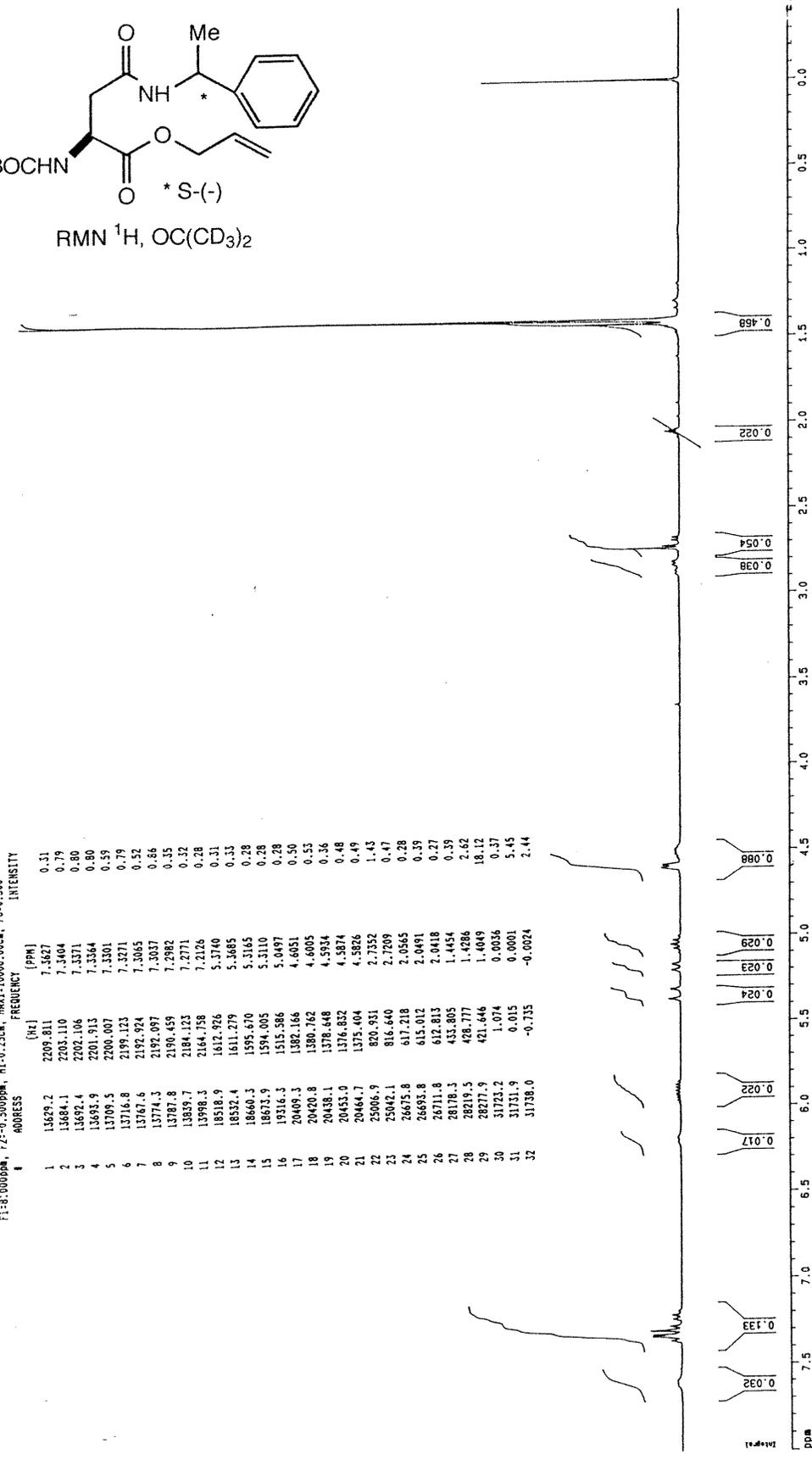
DEPT, CDCl₃



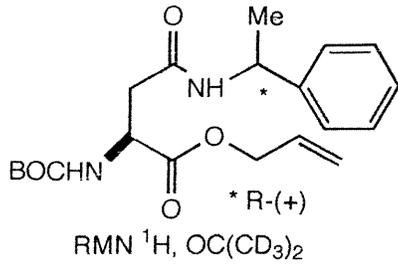


QUES: 00555001, NAME: 130107, EXPNO: 2, PROCNO: 1, PC: 0.500
 250, 300MHz, 130K, 256K, MARK: 130000000

ADDRESS	FREQUENCY (Hz)	PPM	INTENSITY
1	13629.2	2209.811	0.31
2	13684.1	2203.110	0.79
3	13692.4	2202.106	0.80
4	13693.9	2201.913	0.80
5	13709.5	2200.007	0.59
6	13716.8	2199.123	0.79
7	13767.6	2192.924	0.52
8	13774.3	2192.097	0.66
9	13787.8	2190.459	0.35
10	13839.7	2184.123	0.32
11	13998.3	2164.758	0.28
12	18518.9	1612.926	0.31
13	18532.4	1611.279	0.33
14	18660.3	1595.620	0.28
15	18673.9	1594.005	0.28
16	19316.3	1515.386	0.28
17	20409.3	1382.166	0.30
18	20420.8	1380.762	0.36
19	20438.1	1378.648	0.48
20	20453.0	1376.832	0.49
21	20464.7	1375.404	1.45
22	25006.9	820.931	0.47
23	25042.1	816.640	0.28
24	26695.8	617.218	0.39
25	26693.8	615.012	0.27
26	26711.8	612.813	2.0418
27	28178.3	433.805	1.4454
28	28219.5	428.777	2.62
29	28277.9	421.646	1.4049
30	31723.2	1.074	0.0036
31	31731.9	0.015	0.0001
32	31738.0	-0.735	2.44



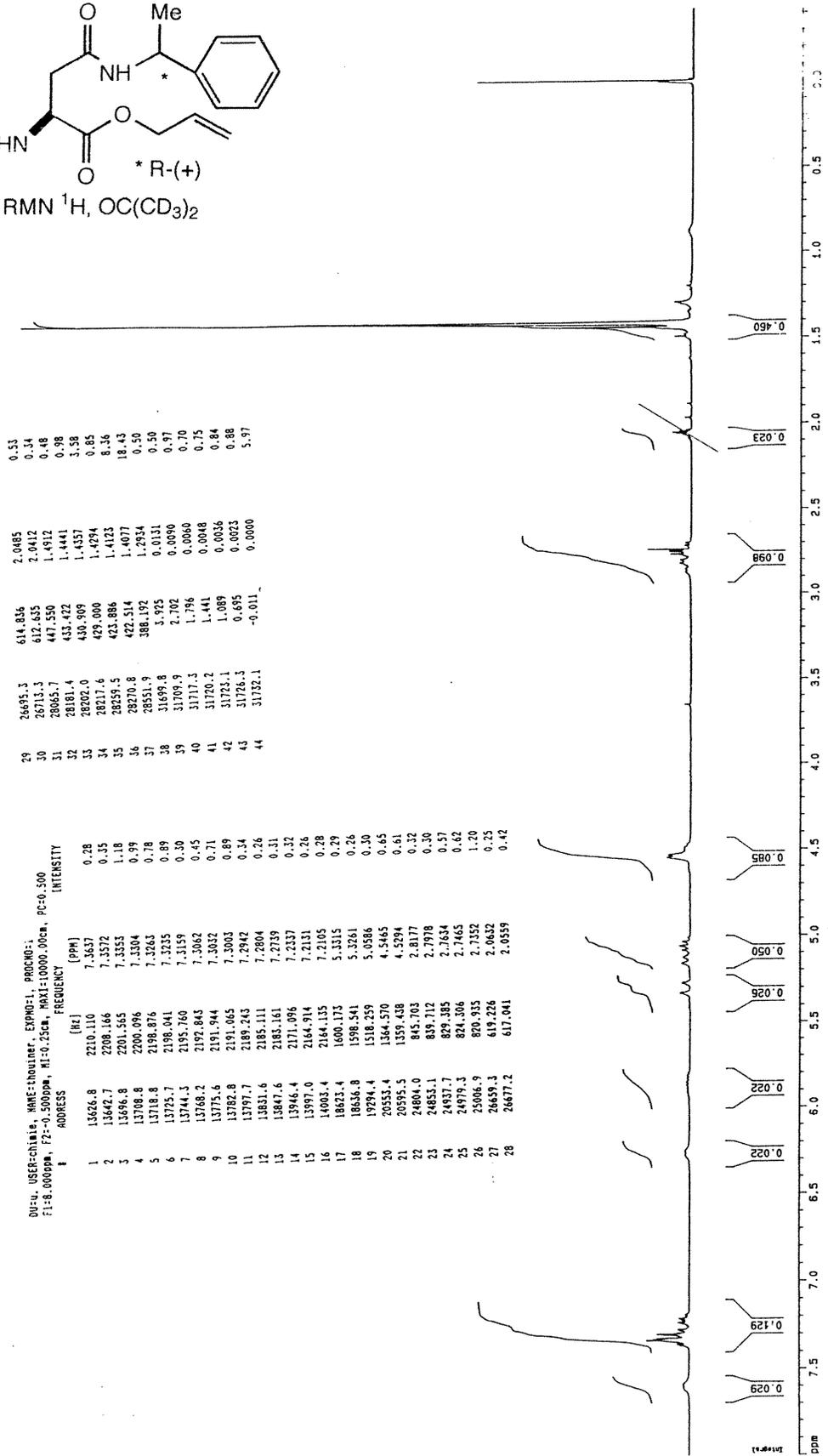
Integrat

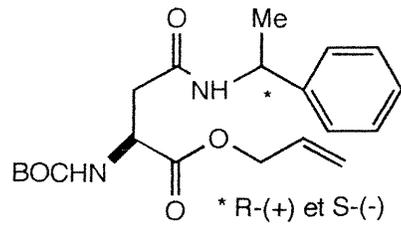


29	26695.3	614.836	2.0485	0.51
30	26713.3	612.855	2.0412	0.34
31	28665.7	447.550	1.9912	0.48
32	28181.4	433.422	1.4441	0.98
33	28202.0	436.909	1.4557	3.58
34	28217.6	429.000	1.4294	0.85
35	28259.5	423.886	1.4123	8.36
36	28270.8	422.514	1.4077	18.43
37	28551.9	388.192	1.2934	0.50
38	31699.8	3.925	0.0151	0.50
39	31709.9	2.702	0.0090	0.97
40	31717.3	1.796	0.0060	0.70
41	31720.2	1.441	0.0048	0.75
42	31723.1	1.089	0.0038	0.84
43	31726.3	0.695	0.0023	0.88
44	31732.1	-0.011	0.0000	5.97

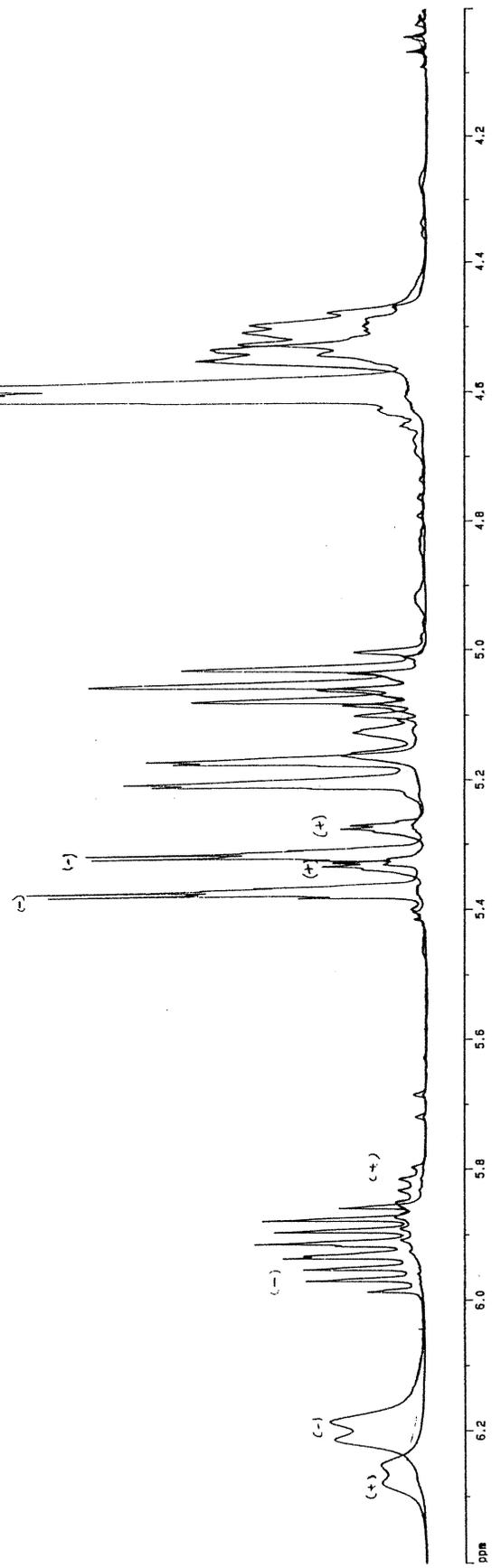
OU=U, USEF=chiale, NAME=thouner, EXPNO=1, PROCNO=1,
 F1=8.000ppm, F2=-0.500ppm, M1=0.25cm, MAX1=10000.00cm, PC=0.300

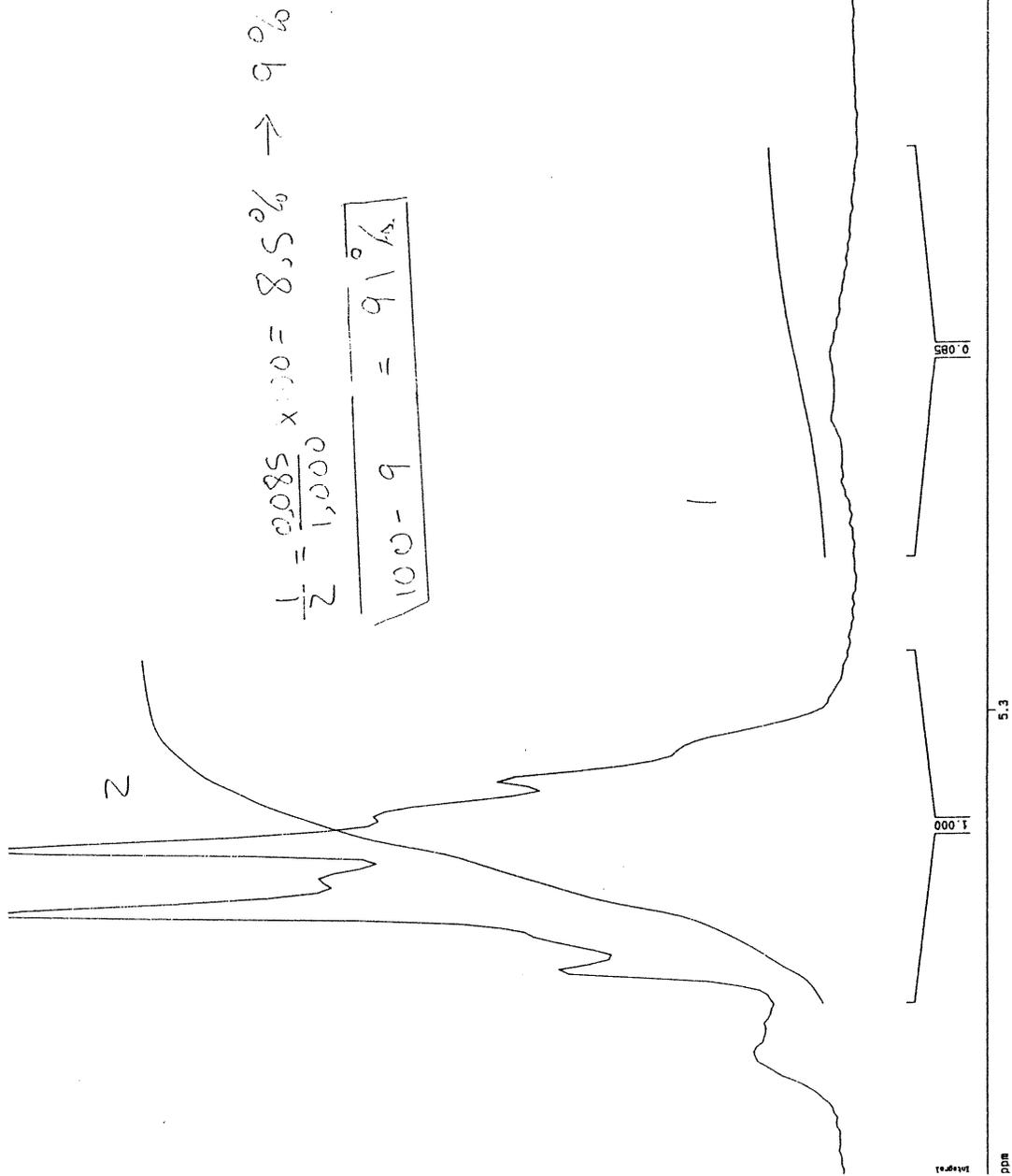
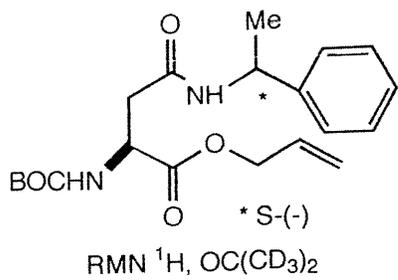
ADDRESS	FREQUENCY (Hz)	INTENSITY
1	13626.8	2210.110
2	13642.7	2208.166
3	13696.8	2201.565
4	13708.8	2200.096
5	13718.8	2198.876
6	13725.7	2198.041
7	13744.3	2195.760
8	13768.2	2192.843
9	13775.6	2191.944
10	13782.8	2191.065
11	13797.7	2189.243
12	13831.6	2185.111
13	13847.6	2183.161
14	13946.4	2171.896
15	13997.0	2164.914
16	14083.4	2164.135
17	18623.4	1600.173
18	18636.8	1598.541
19	19284.4	1518.259
20	20553.4	1364.570
21	20595.5	1359.418
22	24804.0	845.703
23	24853.1	839.712
24	24937.7	829.385
25	24979.3	824.306
26	25006.9	820.935
27	26459.3	619.226
28	26677.2	617.041

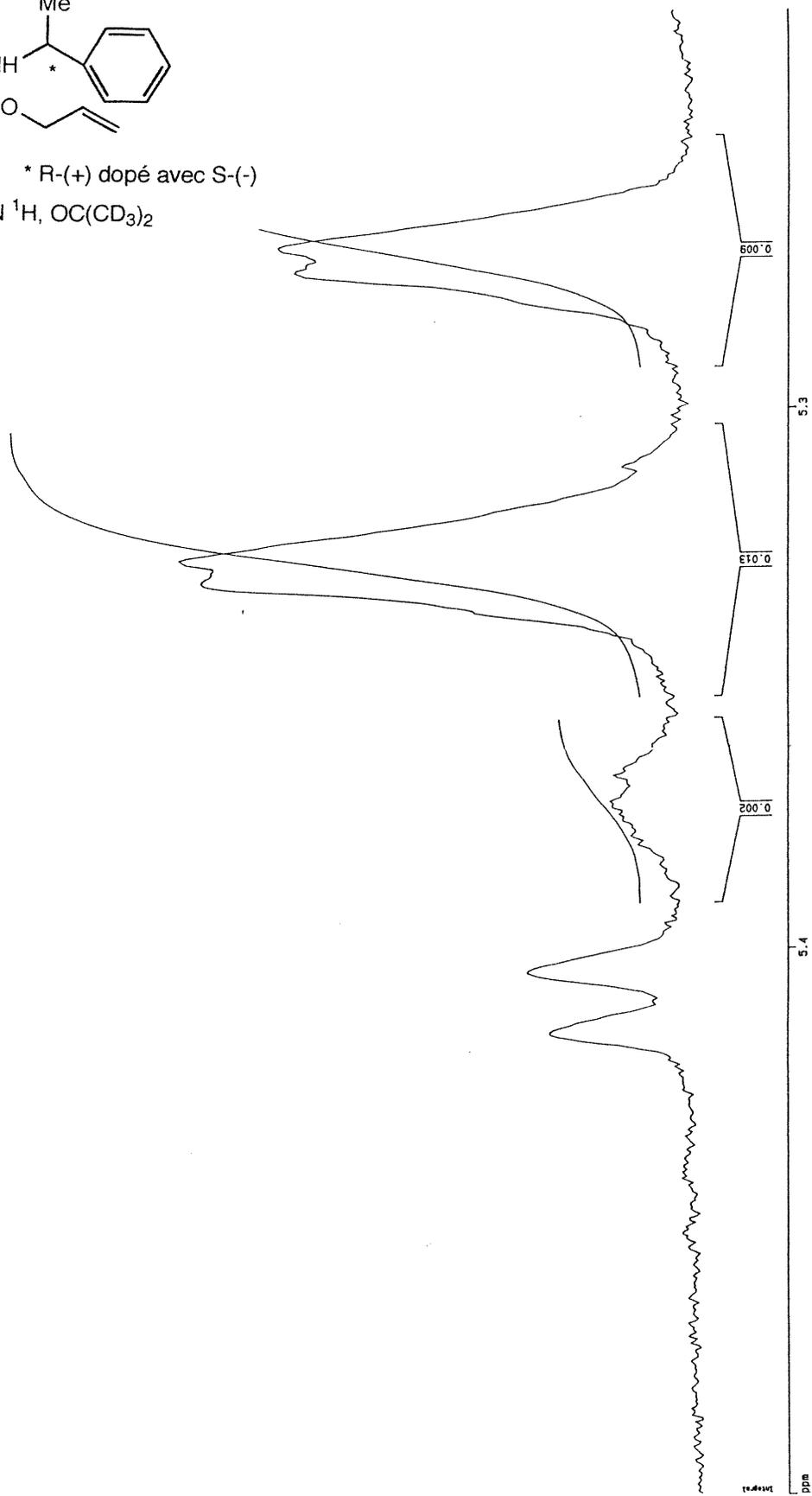
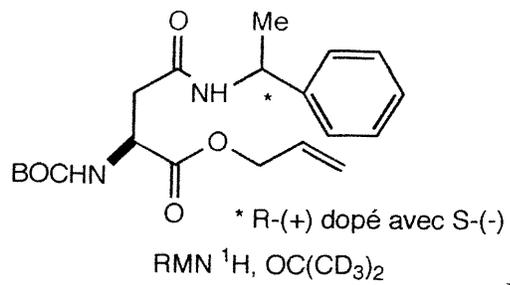




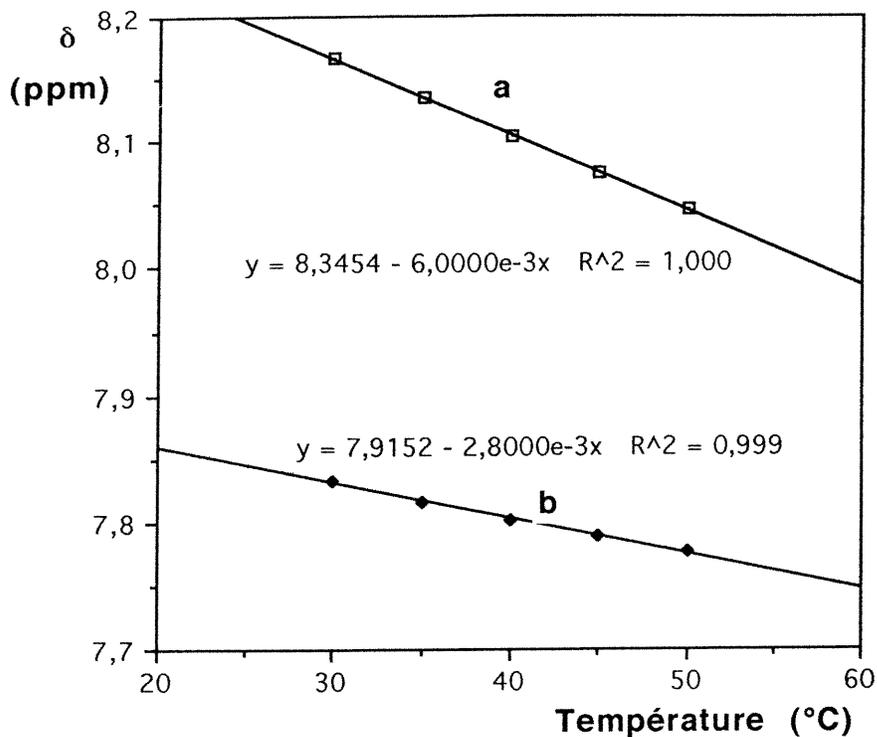
RMN ¹H, OC(CD₃)₂



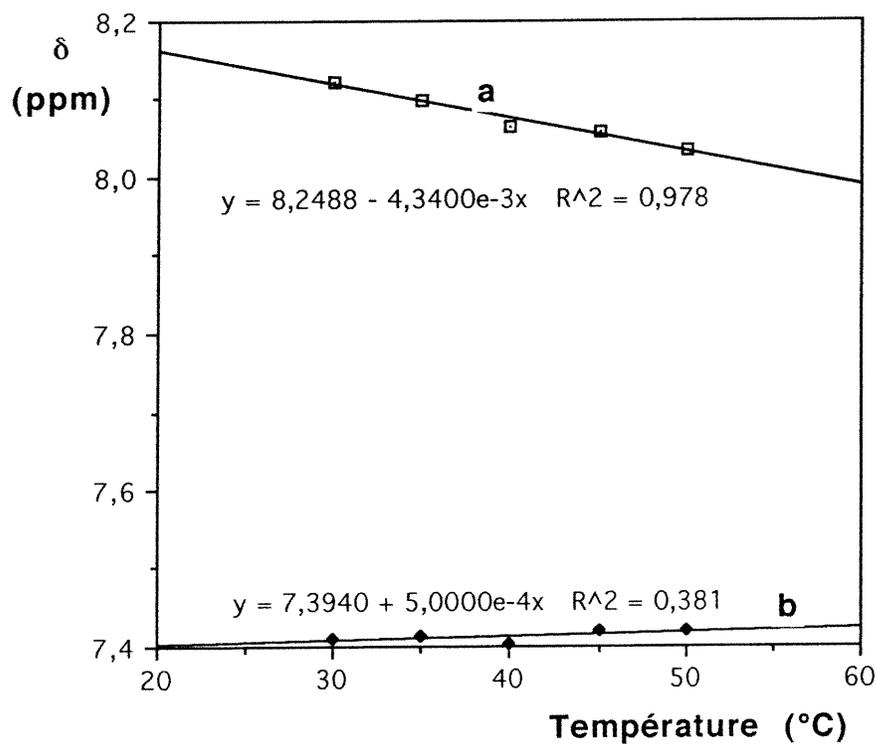




Gradients de température des protons amides (a, b) dans H₂O:acétone-d₆



Gradients de température des protons amides (a, b) dans DMSO



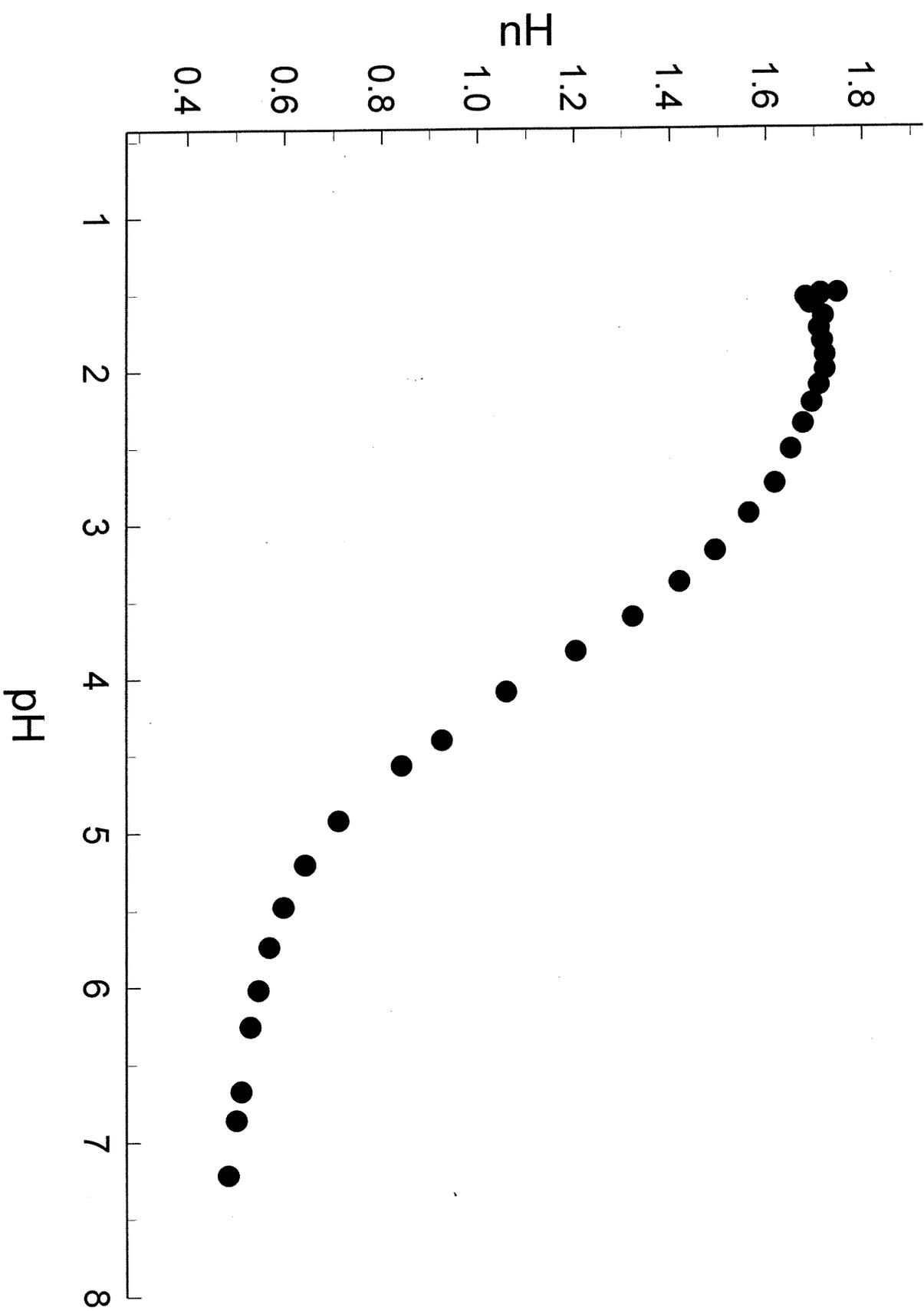
Volume	pH	nH
0	1.50395	1.747586
.05	1.50868	1.713237
.1	1.51821	1.71163
.2	1.53322	1.682035
.4	1.57335	1.690851
.8	1.65602	1.718436
1.2	1.73417	1.710081
1.6	1.81819	1.71688
2	1.90702	1.72248
2.4	2.0017	1.722152
2.8	2.10275	1.709533
3.2	2.21735	1.695061
3.6	2.35238	1.67692
4	2.51955	1.651195
4.3885	2.74136	1.618143
4.67	2.93648	1.563673
4.9365	3.17754	1.493401
5.136	3.38031	1.419205
5.3475	3.60424	1.322568
5.574	3.8272	1.203275
5.8305	4.09014	1.059133
6.063	4.40292	.9246299
6.2035	4.57022	.8406155
6.422	4.92574	.7090122
6.536	5.20831	.6398832
6.6075	5.48155	.5963783
6.655	5.7404	.5673748
6.6915	6.02	.5450239
6.719	6.25801	.5281258
6.7495	6.67218	.5093668
6.765	6.85911	.4998134
6.7925	7.21524	.4828705

pKa # 1 = 3.154902

pKa # 2 = 6.855459

Titration potentiométrique du *cycl*/dIAA-Asp-IAA-Asp] (1).

Average number of installed protons vs pH
(27.2 mM NaOH, 0.118 mmol HCl, 0.044 mmol organic acid)



Titration potentiométrique du *cyclo[Asp-Asp-IAA-Asp]* (1).