

Université de Montréal

**Étude de tour bêta actif dans les modulateurs allostériques du récepteur de la
prostaglandine F2alpha**

par

Meriem Karima Boukanoun
Département de chimie
Faculté des arts et des sciences

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

Décembre, 2014

© Meriem Karima Boukanoun, 2014

Résumé

La naissance avant terme constitue un important problème de santé périnatale partout dans le monde. Chaque année près de 15 millions de bébés naissent prématurément. Notre laboratoire s'intéresse depuis une décennie à la conception et le développement de nouvelles classes thérapeutiques (appelés agents tocolytiques) capables d'inhiber les contractions utérines et prolonger le temps de gestation. Due à son implication directe dans le déclenchement des contractions utérines, la prostaglandine $F2\alpha$ (FP) est devenue notre cible de choix. Le PDC 113.824 et aza-glyciny-proline sont apparus comme des inhibiteurs allostériques puissants du récepteur de la prostaglandine $F2\alpha$, capables de prolonger la durée de gestation chez les souris.

Le travail réalisé au cours de ce mémoire a pour objectif d'étudier le tour β nécessaire pour la reconnaissance sur le récepteur de la prostaglandine $F2\alpha$. Dans la conception de mimes peptidique sélectif efficace et puissant, le repliement β est un élément structural essentiel pour le maintien ou l'amélioration de l'activité du mimes peptidique. Les études conformationnelles du PDC113.824 et l'aza-glyciny-proline montrent que les squelettes centraux de ces mimes peptidiques pourraient adopter essentiellement un tour β de type I ou II', ce qui suggère l'implication des deux types de tours dans l'activité biologique. La synthèse de mimes peptidiques adoptant le tour β de type I et II' est devenue une stratégie logique dans la recherche de nouveaux agents tocolytiques. Au cours de ces études quatre analogues du PDC113.824 ont été synthétisés, un azabicyclo[5.3.0]alkanone et un dipeptide macrocyclique (mimes du tours β de type I) pour étudier l'implication du tour β type I. Par la suite la

synthèse de glycinyl-proline et le D-alaninyl-proline (des mimes du tour β du type II') a été réalisée afin de valider l'implication du tour β type II' dans la reconnaissance sur le récepteur.

Nous avons utilisé une stratégie de synthèse efficace pour obtenir les deux analogues (azabicyclo [5.3.0]alkanone et dipeptides macrocycles) à partir d'un intermédiaire commun, en procédant par une cyclisation transannulaire diastéréosélective du tétra-peptide.

Mots-clés : Accouchements prématurés, prostaglandine F2 α , tocolytique, peptidomimétisme, PDC113.824.

Abstract

Preterm birth is a major perinatal health problem. Worldwide each year, more than one baby on ten is born premature, accounting for approximately 15 million babies per year. Pursuing molecules that can delay labour, so called tocolytics, we have targeted the prostaglandin F₂ α receptor (FP), because of its intimate involvement with the stimulation of uterine contractions leading to birth and preterm birth. Our laboratory has previously demonstrated that PDC-113.824 and azapeptide can modulate FP function by an allosteric mechanism featuring biased signalling, and can delay labour in a mouse model.

The objective of the present work is to study the active turn geometry responsible for the modulatory effects of our lead tocolytic agents on the prostaglandin F₂ α receptor. Crystal structure and computational analyses of indolizidin-2-one amino acid and aza-glycinyl-proline components have shown them to adopt geometry that mimic ideal type I and II' β -turns suggesting the potential involvement of such turns in the biological activity. To study the relevance of a type I β -turn on activity, we have prepared analogs possessing macrocyclic and pyrroloazepinone dipeptide mimics, because of their reported propensities to mimic type I β -turns. The syntheses of analogs possessing glycinyl-proline and D-alaninyl-proline were conducted to validate the involvement of a type II' β -turn in receptor recognition.

In addition, we reported an efficient strategy for preparing the macrocyclic and pyrroloazepinone dipeptide mimics from a common intermediate using a diastereoselective transannular cyclization on a tetrapeptide precursor.

Keywords: Premature delivery, prostaglandin F₂ α , tocolytic, peptidomimetic, PDC113.824.

Table des matières

Chapitre 1. Introduction.....	1
1.1 La naissance prématurée.....	1
1.1.1 Accouchement prématuré dans le monde	1
1.1.2 La prostaglandine F2 α	2
1.1.3 Le récepteur de la prostaglandine F2 α	3
1.1.4 Prostaglandine F2 α et son implication dans le travail pré-terme.....	4
1.2 Développement d'agents tocolytiques, des peptidiques inhibiteurs du travail prématuré.....	5
1.2.1 Agents tocolytiques.....	5
1.2.2 Conception de petits peptides modulateurs du récepteurs PGF2 α	6
1.2.3 PDC113.824 inhibiteur allostérique puissant du récepteur de la prostaglandine F2 α	10
1.2.3.1 Effet du PDC113.824 sur les différentes voies de signalisation intracellulaire du récepteur FP	11
1.2.3.2 Structure tridimensionnelle de l'indolizidin-2-one.....	12
1.2.4 Le (3 <i>R</i> , 6 <i>R</i> , 9 <i>R</i>)-indolizin-2-one, le quinolizidinone et l'indolizidin-9-one comme mimes.....	13
1.2.5 Les aza acides aminés comme mimes	14
1.2.5.1 Structure tridimensionnelle des dérivés aza.....	15
1.2.6 Étude des sequelletes centrales utilisées dans le développement de nouveaux mimes peptidiques.....	16
1.2.6.1 Synthèse de la macrocyclique lactame insaturée, mime du tour β de type I et structure rayon X.....	16
1.2.6.2 Synthèse d'azabicyclo [5.3.0] alkan-2-one acide aminé et structure rayon X.....	18
1.2.6.3 Synthèse du D-alanyl et glycy l proline et structure rayon X.....	18
1.3 Rappel sur le peptidomimétisme et les repliements β	19
1.3.1 Peptidomimétisme	19

1.3.2 Les repliements β (coudes β).....	20
1.3.3 Introduction de contraintes cycliques	22
1.3.4 Modification de chaines latérales.....	24
1.3.5 Introduction d'isostère.....	25
1.4 Intérêt de recherche.....	26
Chapitre 2. Étude du tour bêta nécessaire pour la reconnaissance sur le récepteur de la prostaglandine F2α.....	30
2.0 Introduction.....	31
Article. Investigation of the Active Turn Geometry for the Labour Delaying Activity of Indolizidinone and Azapeptide Modulators of the Prostaglandin F2 α Receptor.....	33
2.1 Abstract.....	34
2.2 Introduction.....	35
2.3 Results and Discussion.....	39
2.4 Biological Activity.....	44
2.5 Conformational analysis of D-alaninyl proline mimic 35 using NMR spectroscopy.....	49
2.5 Conclusion.....	51
2.6 General Protocols.....	51
2.7 References.....	67
Chapitre 3. Conclusion.....	70
Bibliographie.....	74
Annexe : Données spectrales et profiles HPLC	i

Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Valeur des angles dièdres de différents tours β	21
Table 2.1. Ideal type I and II' β -turn dihedral angles and comparisons with turn mimics.	38

Liste des figures

Figure 1.1. Structure de PGF ₂ α.	3
Figure 1.2. Récepteur de la prostaglandine F ₂ α.	4
Figure 1.3. Cascade de signalisation du récepteur activé par PGF ₂ α	5
Figure 1.4. Les mimes développés à partir de la deuxième boucle extracellulaire et leurs activités biologiques	8
Figure 1.5. Rôle du PDC113.824 dans la cascade de signalisation de PGF ₂ α	11
Figure 1.6. Indolizidine-2-one.	12
Figure 1.7. Les azabicycloalcanes 2-4 utilisés comme mimes peptidiques.	13
Figure 1.8. Azapeptides analogues du PDC 113.824.....	15
Figure 1.10. Structure d'un tour β.	21
Figure 1.11. Structures des azabicycloalcanes et lactames macrocycliques développées par le Groupe Lubell	23
Figure 1.13. Structures des azabicyclo[5.3.0] et [4.3.0]alcanone inhibiteurs des caspases.	24
Figure 1.14. Analogues α-acides aminés.	25
Figure 1.15. Analogues de l'Antillatoxin.....	25
Figure 2.1. Indolizidinone PDC113.824, azapeptides 5 and 6 , as well as targets 32-35 , in which type I and II' β-turn mimics have been inserted.	36
Figure 2.2. Effects of indolizidinone PDC113.824, azapeptide 5 and analogs 32-35 on mean tension induced by PGF ₂ α.....	44
Figure 2.3. Effect of compounds 32-35 on PGF ₂ α-mediated ERK1/2 activation.	46
Figure 2.4. Effects of analogs 32-35 on cell ruffling.	47
Figure 2.5. ROESY correlations for D-alaninyl proline mimic 35	48
Figure 2.6. Variation of amide N–H chemical shift values versus the percentage of DMSO-d ₆ in DMSO-d ₆ /CDCl ₃	49
Figure 2.7. Variation of amide N–H chemical shift values versus temperature °C.....	49

Liste des schémas

Schéma 1.1. Synthèse du dipeptide macro lactame.....	17
Schéma 1.2. Synthèse modifiée du dipeptide macro lactame.....	17
Schéma 1.3. Cyclisation trans-annulaire.....	18
Schéma 1.4. Objectif de recherche.....	29
Scheme 2.1. Synthesis of 10-member macrocyclic mimic 32 and azabicyclo[5.3.0]alkan-2-one mimic 33	40
Schema 2.2. Synthesis of Gly-Pro and D-Ala-Pro analogs 34 and 35.....	43

Liste des abréviations

(Boc) ₂ O	Dicarbonate de di- <i>tert</i> -butyle
[α] _D	Rotation spécifique
°C	Degré Celsius
Ac	Acétyle
Atm	Atmosphère
Bn	Benzyle
Boc	<i>Tert</i> -butyloxycarbonyle
<i>C</i>	Concentration
Cbz	Benzyloxycarbonyle
d	Doublet
d t	Doublet de triplet
DCM	Dichlorométhane
d d	Doublet de doublet
DIEA	<i>N,N'</i> -diisopropyléthylamine
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
Et	Éthyle
EtOAc	Acétate d'éthyle
FA	Acide formique
Fmoc	Fluorénylméthoxycarbonyle
HOBt	Hydroxybenzotriazole
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
HRMS	« High resolution mass spectrometry »
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de couplage
M	Multiplet
Me	Méthyle
MeOH	Méthanol
MHz	Megahertz

Mp	Point de fusion (melting Point)
NMR	Résonance magnétique nucléaire (nuclear magnetic resonance)
Ph	Phényle
PyBop	Diéthoxyphosphinyloxybenzotriazole de phosphinyle
Q	Quadruplet
R _f	Rapport frontal
s	Singulet
t	Triplet
TBTU	<i>N</i> -oxyde de <i>N</i> -[(1H-benzotriazol-1-yl)(diméthylamino)méthylène]- <i>N</i> -méthylméthanaminium tétrafluoroborate
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TLC	« Thin Layer Chromatography »
UV	Ultraviolet
Δ	Déplacement chimique

À mes chers parents. À Insaf la lumière de ma vie.

À la mémoire de mon grand-père et à mon maître.

Remerciements

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide et le soutien de nombreuses personnes que je tiens à remercier :

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur William D. Lubell pour m'avoir accueillie au sein de son groupe de recherche et pour la confiance qu'il m'a témoignée pour la réalisation d'un travail de recherche extrêmement intéressant et enrichissant. Je tiens à le remercier pour ses conseils précieux et son esprit critique qui m'ont permis de progresser aussi bien d'un point de vue expérimental que théorique. Les nombreuses discussions que j'ai eu avec lui, surtout dans les moments de doute, ainsi que sa gentillesse et sa passion, lesquels m'ont beaucoup aidé à surmonter les moments difficiles que j'ai traversés.

Je tiens à adresser mes remerciements à mes examinateurs pour l'honneur qu'ils me font d'accepter de juger ce travail.

Merci de nous faire partager votre compétence et d'apporter à ce travail un regard éclairé et critique.

Un grand merci à mes camarades de paillasse, les membres anciens et présents du groupe Lubell, plus particulièrement Julien Dufour-Gallant qui a pris le temps de m'encadrer dans le début de mes recherches, Cynthia, les Mariams, Mohamed, Yésica, Carine, Stéphane, Fatemeh, Duc, Prasad, Julien Poupart et Lylia pour tous les bons moments partagés.

Merci à Mildred Bien-Aimé pour son écoute son soutien moral pendant les périodes difficiles et pour les nombreuses fois où elle a dû garder ma fille Insaf.

Je remercie également les membres des laboratoires d'analyses Sylvie Bilodeau, Antoine Hamel, Cédric Malveau, Marie-Christine Tang, Alexandra Furtos et Karine Venne ainsi que Céline Millette pour son soutien pour les tâches administratives.

Et pour finir, je remercie mes parents pour leur amour et pour avoir toujours cru en moi. Merci à mes frères et ma sœur, ma famille et ma belle-famille pour leur soutien moral. Un grand merci à mon mari pour sa présence, son amour et son soutien.

Introduction

1.1 La naissance prématurée

1.1.1 Accouchement prématuré dans le monde

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, près de 15 millions de bébés naissent prématurément chaque année, ce qui représente un dixième des nouveaux nés dans le monde ¹. « Une naissance sur dix est prématurée », 1 millions parmi eux meurent suite aux complications liées à leur naissance prématurée ¹.

L'accouchement prématuré est défini comme un accouchement survenant avant 37 semaines de gestation, qui pourrait être subdivisés en 3 catégories principales : prématurité moyenne de 32 à 37 semaines; grande prématurité de 28 à 31 semaines, caractérisée par une morbidité à court et à long terme; prématurité extrême, pour une naissance avant 28 semaines de gestation. La prématurité extrême est la catégorie qui compte le plus grand taux de décès et d'handicaps sévères chez les survivants ^{2, 3}. Dépendamment de la durée de gestation, ces nouveau-nés souffriront à vie d'une incapacité d'ordre physique ou mental, de maladies cardiovasculaires, des problèmes gastro-intestinaux et pulmonaires, de l'hypertension et du diabète. La prématurité présage également de futures difficultés éducatives et professionnelles ⁴⁻⁷, engendrant un coût très élevé pour les familles et la société.

Au cours des 20 dernières années, le taux mondial de naissances prématurées ne cesse d'augmenter ¹. Plusieurs raisons sont à l'origine : le développement dans les pratiques cliniques, qui conduit à l'augmentation du taux de naissances multiples, la fécondation in vitro, l'origine ethnique afro-américaine, les infections et les maladies chroniques telles que le

diabète et l'hypertension, l'âge maternel, le tabagisme, l'abus de drogues et le stress psychosocial ^{2,8}.

Le coût de naissances prématurées reste encore mal connu, les statistiques se limitent aux services de soins intensifs néonataux de l'hôpital, en oubliant les dépenses liées aux complications à long terme causées par la naissance prématurée. Les premières données obtenues sur le sujet sont très inquiétantes. En 2005 les États-Unis ont compté plus de 26 milliards de dollars de dépenses pour assister les bébés prématurés durant leurs premières semaines de vie, ce qui représente la moitié des coûts d'hospitalisation des nourrissons ^{6,9}. Au Royaume-Uni, le coût total de naissances prématurées a été estimé à 2,946 milliards de pounds en 2006 ¹⁰.

L'accouchement survient suite au déclenchement des contractions rythmiques et intenses du muscle utérin qui procèdent à la dilatation et l'ouverture du col utérin pour laisser passer le bébé. Les mécanismes exacts du déclenchement spontané du travail chez l'humain sont encore mal connus. Cependant, il a été prouvé que la prostaglandine F_{2α} et l'ocytocine jouent des rôles essentiels dans ces mécanismes, une meilleure compréhension des phénomènes impliqués dans l'induction des contractions utérines étant indispensable en prévention des accouchements prématurés.

1.1.2 La prostaglandine F_{2α}

La prostaglandine F_{2α} (PGF_{2α}) est un lipide dérivé de l'acide arachidonique composé de vingt atomes de carbone, comprenant un cyclopentane, une double liaison *trans* entre les carbones 13 et 14 ainsi qu'un groupement hydroxyle au carbone 15 (Figure 1.1) ¹¹. Le chiffre (2) suivant l'abréviation indique le nombre des doubles liaisons présentes dans la chaîne

latérale attachée au cyclopentane. L'inscription α indique la configuration *cis* des groupements hydroxyles (OH) sur le carbone en position 9 et 11 de la molécule ¹².

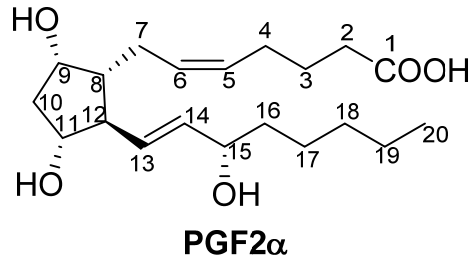


Figure 1.1. Structure de PGF2 α .

1.1.3 Le récepteur de la prostaglandine F2 α

Le récepteur de prostaglandine F2 α (FP) appartient à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG) ¹³ et joue un rôle fondamental comme médiateur des fonctions cellulaires. De plus, il est impliqué dans plusieurs processus physiologiques, comme la stimulation des contractions utérines, la contractilité du cœur et autres muscles lisses.

Le récepteur de prostaglandine F2 α comporte trois parties (Figure 1.2):

- un domaine amino-terminal extracellulaire qui est impliqué dans la liaison du ligand,
- un domaine carboxy-terminal intracellulaire qui participe dans l'activation des voies de signalisation,

- un domaine à sept traversées transmembranaires (TM1-TM7) interconnectées par trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires qui interviennent dans la liaison du ligand.

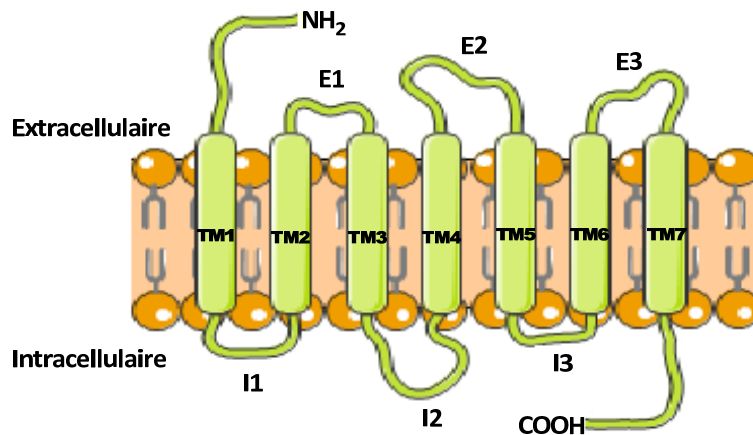


Figure 1.2. Récepteur de la prostaglandine F2 α .

1.1.4 La prostaglandine F2 α et son implication dans le travail pré-terme

L'implication de la prostaglandine F2 α (PGF2 α) dans le processus de la parturition a été bien établie depuis plusieurs années ¹⁴. En effet, la concentration de la prostaglandine F2 α dans le liquide amniotique augmente au début du déclenchement des contractions utérines spontanées ¹⁵ et s'accroît d'une façon remarquable dans le travail prématuré. Il a été démontré que les souris "knock-out" du FP n'arrivent jamais à accoucher ^{16, 17}. Il a aussi été prouvé que l'administration de PGF2 α par injection provoque la fin de la gestation à n'importe quel stade de la grossesse ¹⁸.

Une fois la prostaglandine F2 α liée à son récepteur couplé aux protéines G, plusieurs voies de signalisations sont activées. Une voie implique la protéine G α_q et mène à la

l'accumulation du phosphate inositol, en plus de la mobilisation calcique intracellulaire qui active ERK1/2 MAPK et la protéine kinase PKC dépendante du Ca^{2+} ¹⁹⁻²¹. Une deuxième voie dépend de la protéine $\text{G}\alpha_{12}$ et de la réorganisation du cytosquelette par la protéine Rho/ROCK ²². Ces deux voies de signalisation contribuent à la contraction phasique et tonique du myomètre (Figure 1.3).

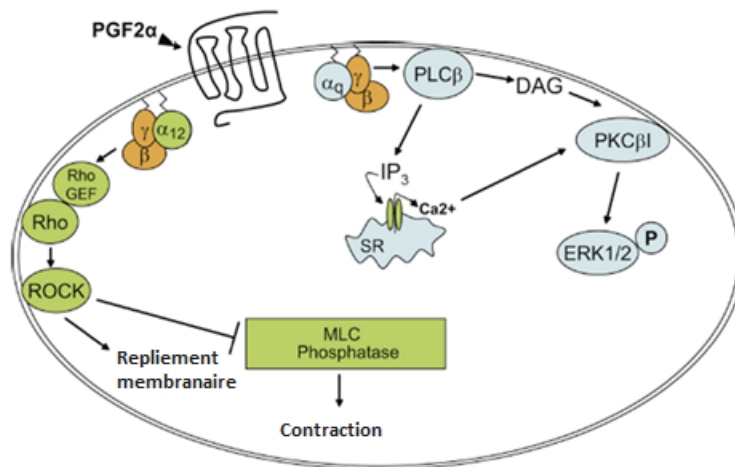


Figure 1.3. Cascade de signalisation du récepteur activé par PGF2α ²³ ($\text{G}\alpha_q \equiv \alpha_q$, $\text{G}\alpha_{12} \equiv \alpha_{12}$).

Due à son implication dans la stimulation des contractions utérines, le récepteur de la prostaglandine F2α est devenu une cible importante dans le développement d'une nouvelle classe d'agents tocolytiques capables de moduler l'activité du récepteur de la prostaglandine F2α sélectivement.

1.2 Développement d'agents tocolytiques, des inhibiteurs du travail prématuré

1.2.1 Agents tocolytiques

Le mot tocolytique vient du grec *tokos* (accouchement) et *lytique* (provoque la dissolution). Les agents tocolytiques sont des produits visant à interrompre les contractions utérines, en agissant sur la contractilité des fibres musculaires utérines et leur synchronisation

pour éviter un accouchement avant la fin de la 37^{ème} semaine, ce qui reste un objectif rarement réalisé.

De nos jours plusieurs classes d'agents tocolytiques sont utilisées en clinique pour retarder la naissance. Le béta-2 mimétique Hexoprenalin (Gynipral®) ^{24, 25}, l'antagonistes de l'ocytocine Atosiban (Tractocile®) ²⁶, les inhibiteurs calciques nifedipine (Adalat CR ®) ²⁷, l'inhibiteur de la synthèse des prostaglandines Indométacine (Indocid®) ²⁸, le sulfate de magnésium et les agonistes β 2-adrénergiques exemple Ritodrine® et la terbutaline (Bricanyl®) ont prouvé leurs utilité en tant que médicaments tocolytiques. Par contre leur administration est associée à des effets secondaires avec une efficacité de tocolyse qui dépasse rarement les 48 heures ²⁹.

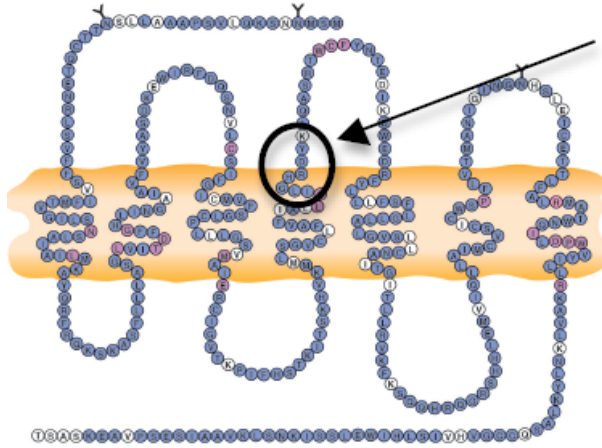
1.2.2 Conception de petits peptides modulateurs du récepteur PGF2 α

La prostaglandine F2 α liée à son récepteur joue un rôle très important dans le déclenchement des contractions utérines ³⁰. Une autre propriété intéressante du récepteur de la prostaglandine F2 α réside dans le fait qu'il possède des sites de liaison topographiquement distincts des sites orthostériques (site de liaison du ligand naturel) appelés sites allostériques (allostérie : du grec allos stereos, signifiant autre site). L'approche développée dans notre laboratoire autour de ce concept est de concevoir des peptidomimétiques comme des ligands allostériques possédant des propriétés pharmaceutiques très intéressantes:

- ils se lient à un site différent du site du ligand naturel pour affecter sélectivement certaines voies de signalisation sans entrer en compétition avec le ligand naturel,
- ils arrivent rapidement à la saturation des sites de liaison, ce qui élimine les risques de surdose,

- ils permettent d'éviter les obstacles liés à l'utilisation des peptides comme la faible biodisponibilité orale, une forte dégradation enzymatique, une faible durée demi-vie pour offrir plusieurs avantages comme la biodisponibilité, la stabilité face aux enzymes, une bonne perméabilité membranaire.

Des études par mutagenèse aléatoire et dirigée ont démontré le rôle de la deuxième boucle extracellulaire dans la liaison du ligand endogène et dans l'activation du récepteur^{31,32}. En collaboration avec le laboratoire du professeur Sylvain Chemtob, on voulait explorer la possibilité de bloquer l'interaction protéine- protéine en reproduisant un fragment de la deuxième boucle extracellulaire qui se situe à l'interface de la région extracellulaire et qui pourrait potentiellement faire partie des sites allostériques (à l'extérieur du domaine de liaison du site orthostérique)^{31,33}. À partir d'un criblage *in vitro*, le peptide, PDC113 (Ile-Leu-Gly-His-Arg-Asp-Tyr-Lys) a été sélectionné, en effet de dernier inhibe la réponse vasomotrice induite par PGF2 α avec 80% d'efficacité et un IC₅₀ de 340 nM (dans la micro-vascularisation oculaire porcine)³⁴. Le PDC113 a aussi démontré une bonne capacité à bloquer les contractions utérines spontanées et réduire significativement les contractions utérines induites par PGF2 α dans les tissus utérines *ex vivo* chez les souris³⁴. D'autres études systématiques telles qu'un remplacement par tous acides aminés du résidu par l'alanine (balayage d'alanine), par leurs énantiomères ou par des acides aminés à chaînes latérales homologues ont été réalisées. Le PDC113.31 (Ile-Leu-Gly-His-X-Asp-Tyr-Lys, X = D-citrulline) a été obtenu lors du remplacement de la D-arginine par la D-citrulline. Cet analogue présente un pourcentage d'inhibition >85% sur contraction micro-vasculaire induite par PGF2 α avec un IC₅₀ de 13 nM³⁵.



Deuxieme boucle extracellulaire du récepteur de la prostaglandine F2 α

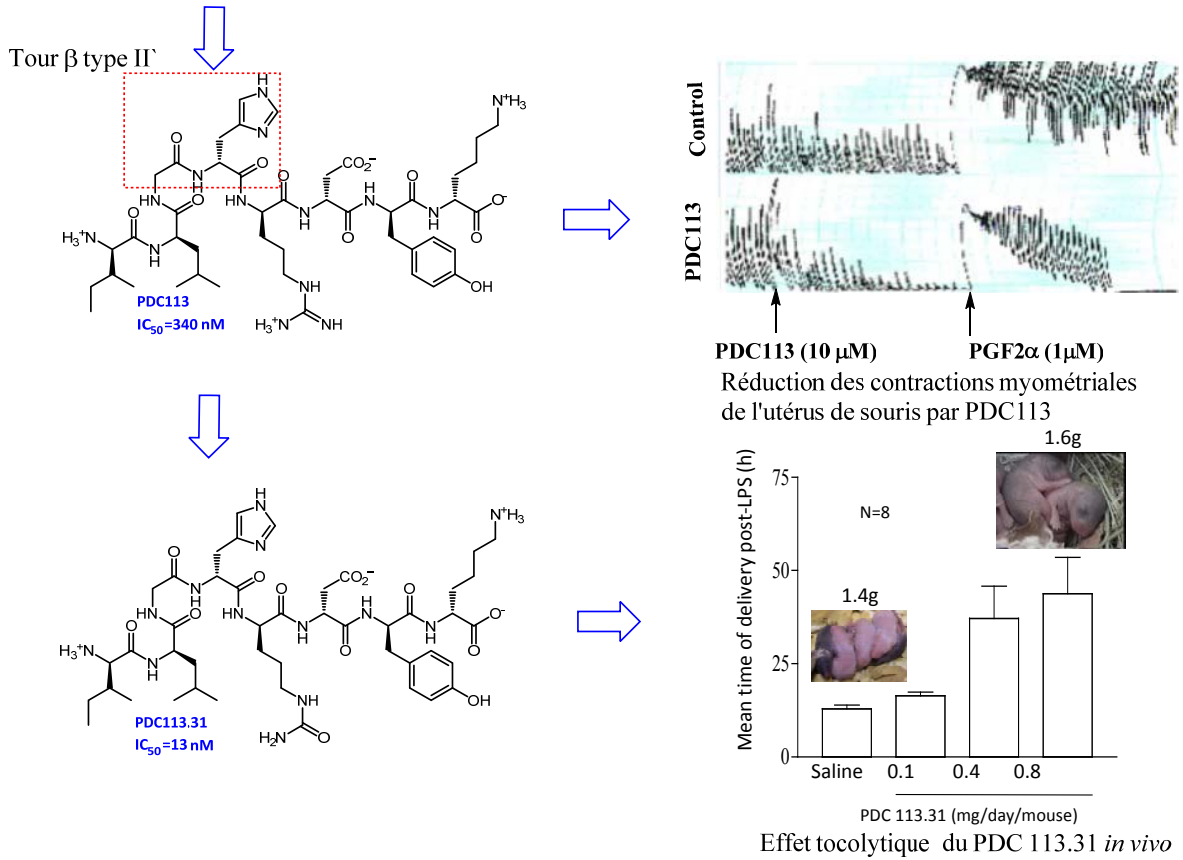


Figure 1.4. Les mimes développés à partir de la deuxième boucle extracellulaire et leurs activités biologiques ^{31, 33-35}.

Dans les essais *ex vivo*, le PDC113.31 a montré une grande aptitude de réduire la durée et la fréquence des contractions utérines spontanées dans les tissus myométriaux des souris juste après l'accouchement. Il est aussi capable de réduire les contractions utérines induites par l'endotoxine lipopolysaccharide (LPS) ou PGF2 α ³⁵. Une activité similaire a été observée dans des modèles bovins et ovins ³⁶. Les tests *in vivo* (chez les souris) révèlent des résultats très concluants. Le PDC113.31 montre une activité tocolytique intéressante, le délai d'accouchement dans le modèle de souris a été retardé de 48h à une dose de 0.8mg par jour par animal ³⁵ (Figure 1.4), sachant que la durée de gestation d'une souris est de 19 à 21 jours ³⁷. Le PDC113.31 a récemment terminé la phase 1b en recherche clinique avec succès chez les femmes en bonne santé avec la dysménorrhée primaire. Cette étude a été conçue pour évaluer la sécurité du PDC113.31 et prouver sa capacité à inhiber les contractions utérines excessives ³⁸.

Dans le but d'améliorer l'efficacité, la réactivité et la biodisponibilité du PDC113 et du PDC113.31, il était nécessaire de passer au développement de mimes peptidiques possédant des propriétés structurales géométriques et électroniques similaires aux analogues déjà développés. En examinant la structure du PDC113 et du PDC113.31 plusieurs points ont été constatés :

- le tour β type II` est induit par le dipeptide Gly-D-His qui pourrait être responsable de la géométrie globale du peptide ³⁹.
- les chaînes latérales D-Ile, D-Leu et D-Tyr ont un caractère lipophile.
- la perte de l'activité biologique observée lors du remplacement respectif des résidus D-Arg⁵ et D-Asp⁶ par le D-Ala indique l'importance de leurs chaînes latérales chargées.

Le remplacement du résidu central Gly-D-His par (3*S*,6*S*,7*S*,9*S*)-3-*N*-(Boc)amino-7-benzylindolizidine-2-one-3-carboxylique comme un mime rigide du tour β type II' ⁴⁰ a donné l'accès à une nouvelle génération de mimes peptidiques. Les recherches se sont poursuivies en apportant plusieurs modifications sur le peptide issu du remplacement du résidu central par l'indolizidine-2-one, donnant naissance à une série d'analogues avec l'indolizidine-2-one comme squelette central et le PDC113.824 est apparu comme le mime peptidique le plus puissant (Figure 1.5).

1.2.3 PDC113.824 inhibiteur allostérique puissant du récepteur de la prostaglandine F2 α

L'utilisation du squelette indolizidine-2-one qui représente un mime peptidique rigide du tour β type II' a été maintenue. Le remplacement des résidus N- et C-terminaux hydrophobes par des structures aromatiques améliore l'efficacité d'inhiber la réponse vasomotrice par rapport leurs analogues aliphatiques ³⁵. Les analogues où le résidu L-arginine a été remplacé par le résidu pyridylalanine montrent une meilleure efficacité pour la vasoconstriction de la rétine porcine ³⁵. Le PDC113.824 résultant de cette série de modifications a montré les meilleurs résultats observés avec une efficacité d'inhibition de 98% et un IC₅₀ = 1,1 nM.

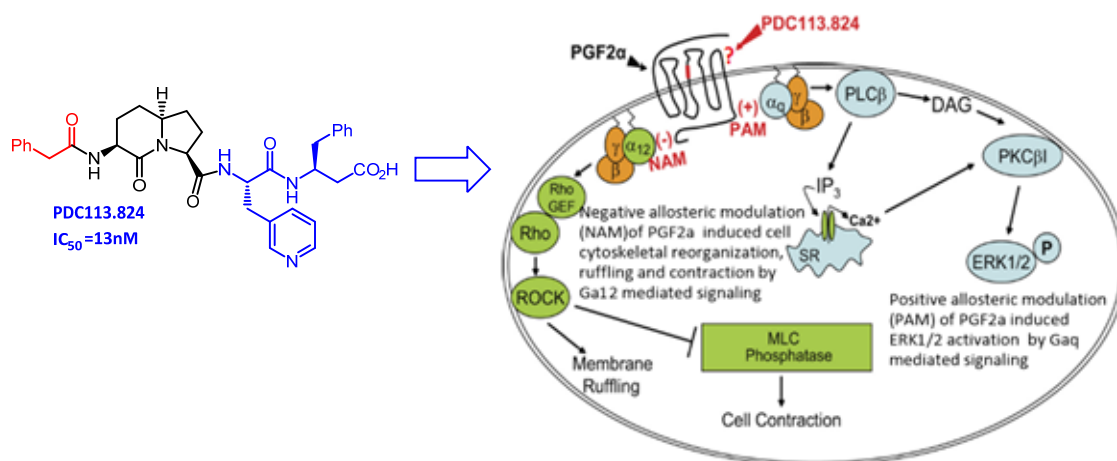


Figure 1.5. Rôle du PDC113.824 dans la cascade de signalisation de PGF2 α (G α q \equiv α q, G α 12 \equiv α 12)²³.

Chez les souris, le PDC113.824 inhibe le travail induit par LPS de 30h²³. Pour le travail induit par la PGF2 α , le PDC113.824 est capable de retarder l'accouchement de 40 h²³, alors que les souris non traitées ont accouché après 2h²³. Le PDC113.824 agit *in vitro* comme un modulateur négatif en inhibant l'activation de la protéine G α 12 et ainsi, il inhibe la voie Rho kinase (ROCK) responsable de la réorganisation du cytosquelette²³. D'un autre côté le PDC113.824 agit comme un modulateur allostérique positif en amplifiant l'activation de la PKC et de Erk1/2 induite par PGF2 α ²³ (Figure 1.5).

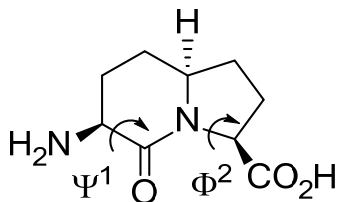
1.2.3.1 Effet du PDC113.824 sur les différentes voies de signalisation intracellulaire du récepteur FP

Une étude menée dans notre laboratoire en collaboration avec les laboratoires de pharmacologie des Professeurs Audrey Claing (Université de Montréal), Stéphane Laporte et Terence Hébert (Université Mc Gill) a permis de comprendre le mécanisme d'action du PDC113.824 lors de l'interaction avec le récepteur. En présence de prostaglandine F2 α , le récepteur de PGF2 α change de

conformation et active la protéine $G\alpha_q$, qui active la phospholipase C (PLC)²³. La PLC provoque la mobilisation calcique intracellulaire par l'accumulation d'inositol phosphate IP_3 et l'activation de la protéine kinase C (PKC) par DAG (diacyl glycérol). La protéine kinase C va activer à son tour les protéines kinases ERK1/2, ainsi d'autres protéines kinases vont être activés pour contribuer à la prolifération cellulaire²³. Il a aussi été démontré que la $PGF2\alpha$ active la protéine $G\alpha_{12}$ qui induit la réorganisation du cytosquelette dépendante de la protéine Rho/ROCK. Le PDC113.824 agit sur les deux protéines G simultanément. D'une part il agit comme un modulateur positif en amplifiant l'activation de la PKC et la ERK1/2 induit par la $PGF2\alpha$ et d'autre part il agit comme un modulateur négatif et inhibe l'activation de la protéine $G\alpha_{12}$ -Rho-ROCK. Ce qui laisse à conclure que le PDC113.824 présente des propriétés allostériques et une sélectivité sur différentes voies de signalisation, autrement dit "bias signalling"²³.

1.2.3.2 Structure tridimensionnelle de l'indolizidin-2-one

L'analyse par diffraction de rayons X des structures cristallines de l'indolizidin-2-one **1** (figure 1.6), montre que le mime peptidique adopte un tour β de type II' avec des valeurs des angles dièdres $\Psi^1 = 176$ et $\Phi^2 = -78$ ⁴¹.



1: Indolizidin-2-one

Figure 1.6. Indolizidine-2-one.

Le squelette central (3*S*, 6*S*, 9*S*)-indolizidin-2-one a été par la suite remplacé par d'autres résidus centraux qui miment le tour β avec des angles dièdres différents.

1.2.4 Le (3*R*, 6*R*, 9*R*)-indolizidin-2-one, la quinolizidinone et l'indolizidin-9-one comme mimes du PDC113.824

Dans le but d'obtenir plus d'informations sur le fonctionnement du récepteur de la prostaglandine F2 α et le tour β responsable de l'orientation des pharmacophores dans la conformation requise pour la reconnaissance sur le récepteur, le résidu indolizidin-2-one a été remplacé par une série d'azabicycloalcanes⁴², tel que l'énantiomère (3*R*, 6*R*, 9*R*)-indolizidin-2-one **2** qui mime le tour β de type II⁴¹, l'indolizidin-9-one **3** et le quinolizidinone **4** qui miment les tour β de type II' mais avec des différences dans les valeurs des angles dièdres (figure 1.7)⁴³.

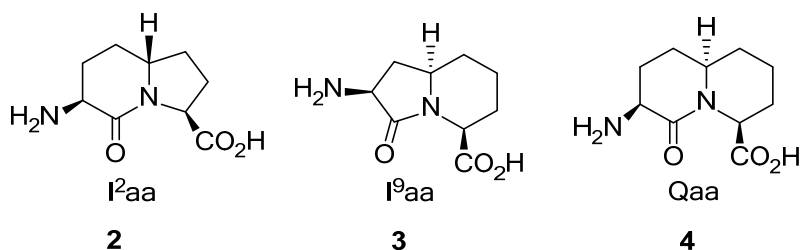


Figure 1.7. Les azabicycloalcanes **2-4** utilisés comme mimes peptidiques.

Les analogues avec les azabicycloalcanes **2-4** comme résidu central ne montrent aucune activité *in vitro* ni *ex vivo*⁴². Cela démontre que le tour β de type II ainsi que le tour β type II' avec des angles suffisamment différents, ne permettent pas de positionner les pharmacophores dans la géométrie reconnue par le récepteur.

À la recherche de nouveaux mimes peptidiques diversifiables, plus facile d'accès et moins coûteux, le squelette central a été remplacé par des aza-acides aminés.

1.2.5 Les aza-acides aminés comme mimes peptidiques

Les azapeptides sont des dérivés des acides aminés où le carbone α est remplacé par un atome d'azote ⁴⁴, ce qui génère plusieurs modifications dans le peptide :

- une réduction de la flexibilité qui engendre respectivement des contraintes au niveau des angles ψ et ϕ dû au remplacement de la liaison amide par une liaison urée, et la répulsion électronique entre les deux paires d'électrons des atomes d'azote voisins.
- un type de repliement β sera adopté, dépendamment de la position de l'aza acide aminé dans la séquence peptidique.

Le remplacement de l'indozilidon-2-one par des résidus aza-Xaa-Pro préalablement développés dans notre laboratoire ^{45, 46}, semblait une alternative très intéressante pour le développement d'agents tocolytiques. Une librairie de cinq analogues aza (aza-Gly-Pro, aza-(propargyl)Gly-Pro, aza-(allyl)Gly-Pro, aza-Phe-Pro et aza-Ala-Pro) a été introduite au sein du mime peptidique (Figure 1.8). Les tests dans des modèles *in vitro* et *ex vivo* ont révélé une activité similaire au PDC113.824 pour l'aza-Gly-Pro **5** et l'aza-Phe-Pro **7** ⁴², donnant naissance à une nouvelle catégorie d'agents tocolytiques. D'autres recherches dans notre laboratoire sont en voie de développement autour de ce nouveau concept.

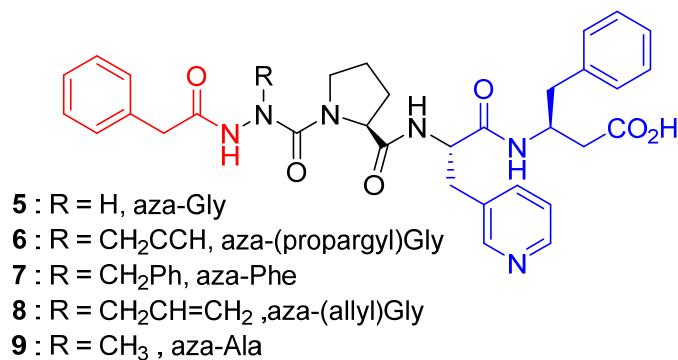


Figure 1.8. Azapeptides analogues du PDC 113.824.

1.2.5.1 Structure tridimensionnelle des dérivés aza

Les analyses par rayons X de différents systèmes aza-Xaa-Pro tel que Boc-aza-Ala-Pro-NHi-Pr, Cbz-aza-Asp(Et)-Pro-NHi-Pr et Cbz-aza-Asn(Me)-Pro-NHi-Pr suggèrent que ces mimes peptidiques favorisent la formation d'un repliement β de type I^{47, 48}. Également l'analyse conformationnelle (niveau HF / 6-31G*, ab initio de la théorie des orbitales moléculaires) de l'Ac-aza-Gly-L-Ala-NHMe confirme que l'analogue qui adopte le tour β de type I et significativement plus stable que son conformère adoptant le tours β de type II' de 10.5 kJ/mol⁴⁹.

En examinant les propriétés conformationnelles des dérivés aza, on constate que le tour β de type I peut être impliqué dans la reconnaissance du récepteur. Nous avons donc tenté d'introduire des résidus qui miment le tour β de type I dans les mimes peptidiques. L'azabicyclo [5.3.0]alkanone et le dipeptide macrocyclique étudiés dans la section suivante ont été utilisés comme des mimes du tours β de type I. Les résidus Gly-Pro ainsi que le D-Ala-Pro ont été utilisés comme des mimes du tour β du type II' afin d'identifier la conformation exacte qui permet de maintenir ou améliorer l'activité biologique.

1.2.6 Étude des squelettes centraux utilisés dans le développement de nouveaux mimes peptidiques

Dans le but d'introduire des mimes peptidiques capables d'adopter le tour β de type I et type II', la macrocyclique lactame insaturée ⁵⁰ **10** et l'azabicyclo [5.3.0]alkanone **11** ⁵¹ (figure 1.9) ont été choisis due à leurs capacités d'adopter un tour β de type I, alors que Gly-Pro **12** et le D-Ala-Pro **13** ^{52, 53} (figure 1.9) ont été choisis pour leur potentiel à mimer le tour β de type II'. Dans les sections suivantes nous essayerons de montrer quelques méthodes pour préparer ces résidus et expliquer leurs capacités à adopter les tours β souhaités à l'aide des études structurales.

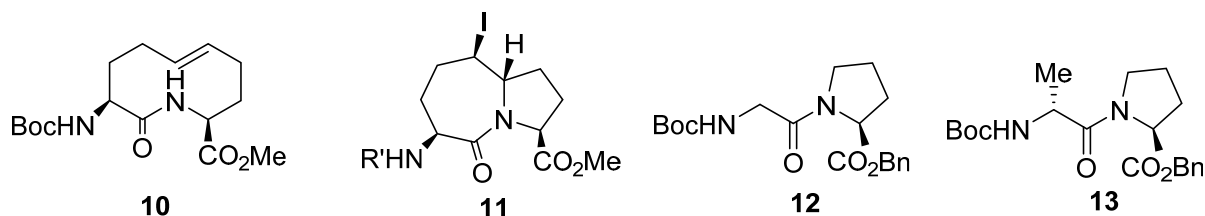


Figure 1.9. structure de la macrocyclique lactame insaturée, L'azabicyclo[5.3.0]alkanone, Gly-Pro et le D-Ala-Pro

1.2.6.1 Synthèse de la macrocyclique lactame insaturée, mime du tour β de type I et diffraction rayons X :

Dans le but de préparer des mimes rigides du tour β , l'équipe Katzenellenbogen a développé une méthodologie qui fait appel à une réaction de cyclisation par métathèse (Schéma 1.1) pour obtenir un dipeptide macrocyclique **10** mime du tour β type I ⁵⁰. L'analyse par diffraction de rayons X et par modélisation moléculaire utilisant la méthode de Monte-Carlo et la minimisation de l'énergie montrent que les deux conformations chaise-chaise (0,0 kcal/mol) et chaise-bateau (2,4 kcal/mol) adoptent essentiellement un tour β de type I ⁵⁰.

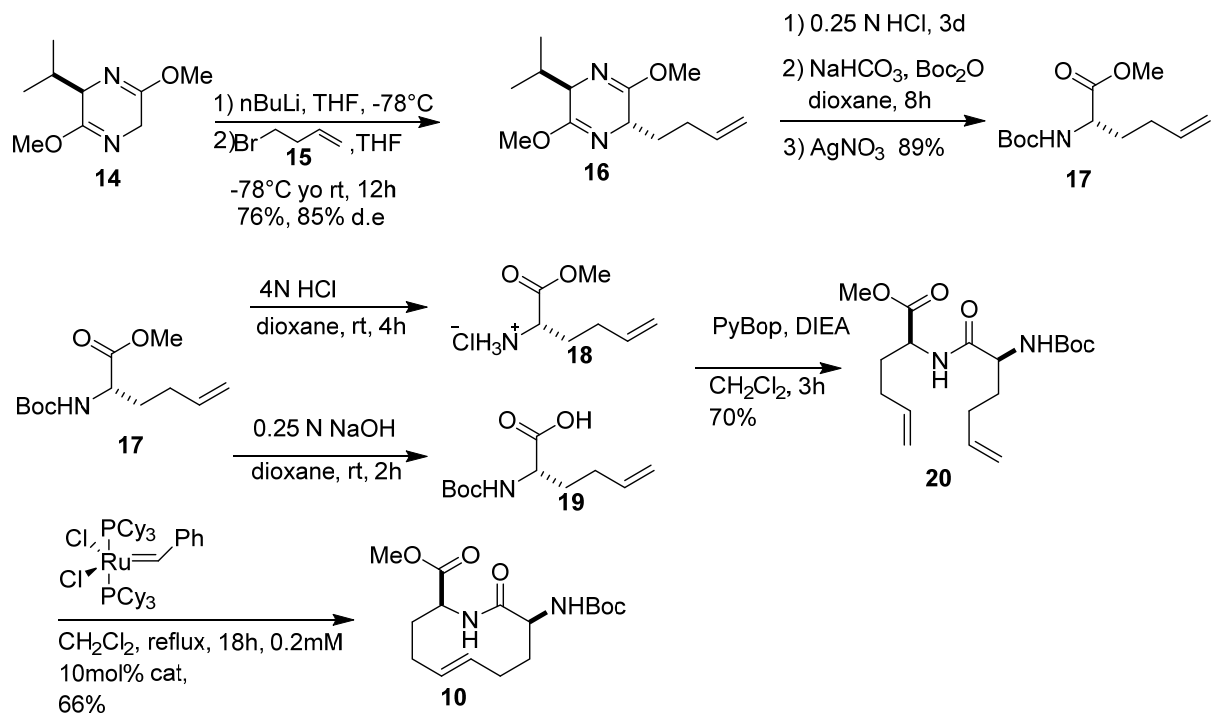


Schéma 1.1. Synthèse du dipeptide macro lactame ⁵⁰.

Le groupe du Pr Lubell ^{54 51} a rapporté une nouvelle variante à la synthèse du lactame macrocyclique **10** à partir de L-serine **21** (Schéma 1.2).

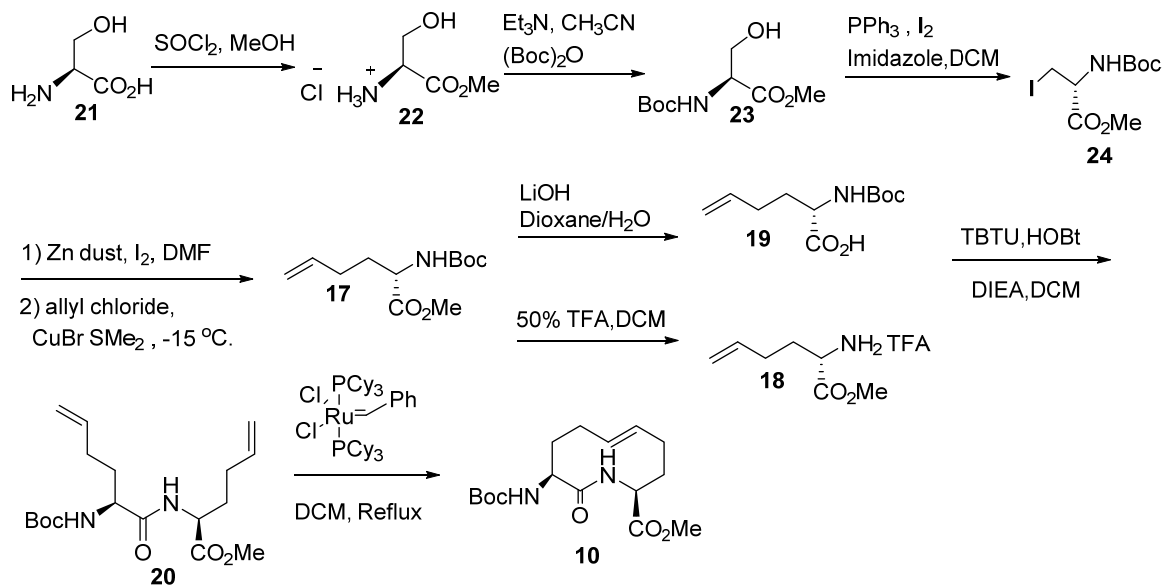


Schéma 1.2. Synthèse modifiée du dipeptide macro lactame ⁵⁰.

1.2.6.2 Synthèse d'azabicyclo[5.3.0]alkan-2-one acide aminé et diffraction rayons X

L'azabicyclo[5.3.0]alkan-2-one acide aminé **11** a été synthétisé selon une cyclisation transannulaire du dipeptide macrocyclique **10**. Deux méthodes ont été développées pour obtenir le produit désiré (Schéma 1.3) ^{51, 55}. La macrolactame insaturée **10** a été traitée avec l'iode dans THF à reflux, suivie d'une protection de l'amine résultante avec un groupement Boc ⁵¹. La deuxième méthode implique l'utilisation du bicarbonate de sodium en excès pour neutraliser l'acide HI formé en présence du groupement Boc ⁵⁵.

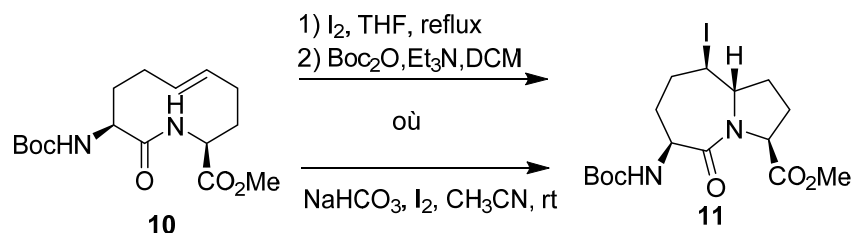


Schéma 1.3. Cyclisation trans-annulaire.

La stéréochimie du bicyclo **11** a été confirmée par diffractions des rayons X. Les angles dièdres ($\Psi^1 = -63.5$, $\phi^2 = -46.6$) mesurés démontrent que l'azabicyclo [5.3.0]alkan-2-one peut adopter une conformation qui s'apparente à celle d'un tour β de type I ⁵¹.

1.2.6.3 Synthèse du D-alanine et glycine proline et diffraction rayons X

La synthèse et l'étude structurale des molécules possédant un motif Xaa-Pro suscitent un grand intérêt auprès des chercheurs, en raison de leurs utilisations dans des molécules à intérêt biologique. Les D-alanine et glycine proline sont essentiellement obtenus par des couplages peptidiques. Des études par analyse diffraction des rayons X ou par modélisation moléculaire (exemple *N*-pivaloyl-D-alaniny1-proline-*N'*-isopropylamide, $\phi^1 = 60$, $\Psi^1 = -140$,

$\Phi^2 = -89$, $\Psi^2 = 9$) montrent que la portion Xaa-Pro (Xaa = D-Ala ou Gly) peut adopter un tour β du type II^{52, 53}.

1.3 Rappel sur le peptidomimétisme et les repliements β

1.3.1 Peptidomimétisme

Une approche très prometteuse dans le développement de nouveaux agents thérapeutiques consiste à synthétiser des molécules non-peptidiques ou pseudo-peptidiques capables de mimer la structure tridimensionnelle du peptide natif en conservant toutes ses propriétés bioactives. Ces molécules peptidomimétiques présentent non-seulement les avantages liés à l'utilisation des peptides (l'efficacité, la sélectivité, une faible toxicité, une grande diversité fonctionnelle et structurale, en plus d'éviter les interactions inter médicamenteuses et l'accumulation dans les tissus), mais ils permettent aussi de contourner les limitations que rencontrent les peptides comme la vulnérabilité faces aux protéases, l'incapacité de traverser les membranes cellulaires, la faible biodisponibilité orale et le poids moléculaire élevé⁵⁶.

Dans l'effort de mieux comprendre l'interaction ligand-récepteur, le peptidomimétisme se présente comme un outil de choix donnant accès à des classes thérapeutiques plus stables, efficaces et sélectifs. L'examen de la relation structure-activité de plusieurs analogues du peptide parent permet de fournir des informations pour comprendre les interactions ligands-récepteurs et étudier leurs mécanismes d'action spécialement quand ils sont impliqués dans des pathologies. Le design d'un peptidomimétique passe par plusieurs étapes⁵⁷:

- l'identification de la protéine cible et le site d'interaction (segment de la protéine cible, dans notre cas la deuxième boucle extracellulaire) le plus court possible,
- l'établissement du modèle pharmacophore basé sur l'identification de la conformation spatiale requise (hélice α , tour β , feuillet β ...) et la chaîne latérale par un balayage d'alanine de chaque résidu, l'utilisation d'homologues (de taille réduite) de la chaîne latérale, l'utilisation des acides aminés énantiomères, substitution du proton du α -carbone par un méthyl pour empêcher la formation des liaisons hydrogène et restreindre le peptide, utilisation d'isostère de lien amide, rigidification globale du peptide par cyclisation
- l'incorporation de structures organiques respectant le mieux les propriétés chimiques et spatiales du pharmacophore.

De par leur nature, les peptides reproduisent les caractéristiques spatiales des protéines, favorisant ainsi la formation des hélices α , les feuillets β et les tours β « β -turn». Nous nous intéresserons principalement à l'étude des tours β , un des éléments structuraux sur lequel on se base pour développer nos structures peptidiques.

1.3.2 Les repliements β (tours β)

Les coudes β se caractérisent par un repliement de la chaîne peptidique impliquant 4 résidus consécutifs ($i, i+1, i+2, i+3$), où la distance entre les $C\alpha$ des résidus i et $i+3$ est inférieure à 7 Å^{58, 59} (Figure 1.10). Le repliement pourrait être stabilisé par un pont hydrogène entre le carbonyle du premier résidu (i) et l'hydrogène de l'amide du quatrième résidu ($i+3$) formant un cycle à 10 chaînons^{60, 61}. On constate alors, un changement de direction de la chaîne peptidique de 180°. Des études expérimentales et théoriques ont permis de classer les tours β en neuf catégories⁶¹ selon leurs angles dièdres phi (ϕ) et psi (ψ) (Tableau 1)^{60, 62}.

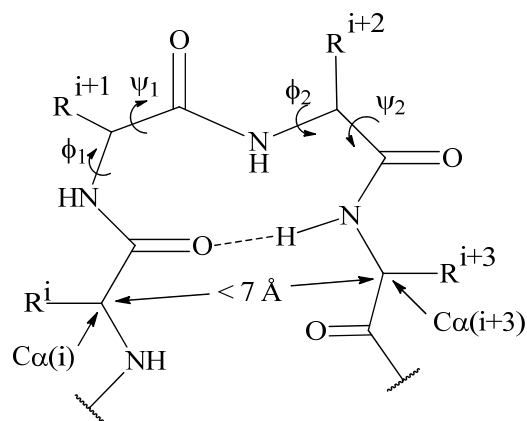


Figure 1.10. Structure d'un tour β .

Tableau 1.1 : Valeur des angles dièdres de différents tours β .

Type de repliement β	ϕ^{i+1} ($^\circ$)	ψ^{i+1} ($^\circ$)	ϕ^{i+2} ($^\circ$)	ψ^{i+2} ($^\circ$)
I	-60	-30	-90	0
II	-60	120	80	0
VIII	-60	-30	-120	120
I'	60	30	90	0
II'	60	-120	-80	0
VIa1	-60	120	-90	0
VIa2	-120	120	-60	0
VIb	-135	135	-75	160
IV	Replissements n'appartenant pas aux autres catégories			

Les repliements β constituent un élément de la structure secondaire des protéines souvent localisés à la surface. Ils jouent des rôles importants dans les interactions protéine-protéine. La reconnaissance par le récepteur exige que le ligand adopte une conformation bien définie dans l'espace et que les chaînes latérales soient dirigées de façon à favoriser l'interaction avec le site actif. Ces éléments architecturaux sont essentiellement prédits par le tour β . Par conséquent, il est primordial de développer de nouvelles structures contraintes qui miment les repliements β afin de déterminer la conformation nécessaire pour améliorer ou maintenir l'activité vis-à-vis du peptide parent.

Plusieurs systèmes ont été développés pour introduire des repliements β au sein des mimes peptidiques. Par exemple l'insertion de contraintes conformationnelles comme l'utilisation d'analogues de prolines ⁶², lactames de Freidinger ^{63, 64}, diazépines et benzodiazépines ⁶⁵, ou l'utilisation des structures plus rigides comme les azabicycloalcanes ⁶⁶ ou encore l'utilisation des contraintes électroniques comme les azapeptides.

1.3.3 Introduction de contraintes cycliques

L'utilisation des contraintes cycliques est parmi les stratégies les plus employées pour rigidifier la structure peptidique et réduire sa flexibilité conformationnelle. Cette modification structurale peut augmenter l'affinité et la sélectivité envers le récepteur tout en améliorant la stabilité et la biodisponibilité du peptide. Les macro-lactames et les azabicycloalcanes sont apparus comme des structures di-peptidiques relativement rigides capable d'adopter des tours β (Figure 1.11) ^{41, 50, 51}.

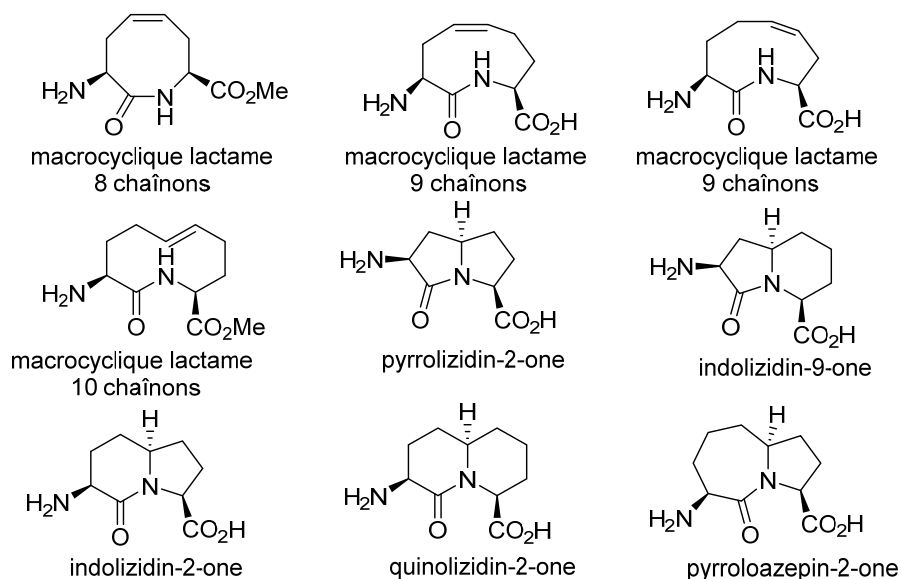


Figure 1.11. Structures des azabicycloalcanes et lactames macrocycliques développées par le Groupe Lubell ^{41, 51, 54}.

Dans cette optique, les azabicycloalcanes ont été incorporés dans des structures d'inhibiteurs d'enzymes et ligands de récepteurs ⁶⁶. Le groupe Hanessian a développé des inhibiteurs de la thrombine en remplaçant la séquence Pro-Phe-Arg par le motif indolizidinone, donnant accès à des analogues **21** et **22** puissants et sélectifs ⁶⁷. Ils ont observé un IC₅₀ de 4 nM pour l'analogue amine **21** et un IC₅₀ de 20 nM pour l'analogue hydroxylé **22** (Figure 1.12).

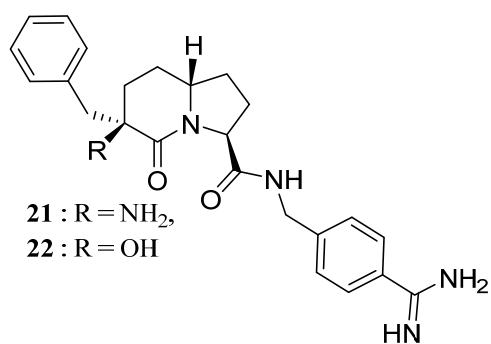


Figure 1.12. Indolizidinone mimes peptidiques inhibiteurs de la thrombine.

L'azabicyclo[5.3.0]alcanone **23** a été utilisée dans un mime peptique inhibiteur sélectif du caspase 3 avec un $IC_{50} = 18$ nM, alors que son analogue indoilidinone **24** inhibe sélectivement le caspase 1 avec un IC_{50} de 36 nM (Figure 1.13) ⁶⁸.

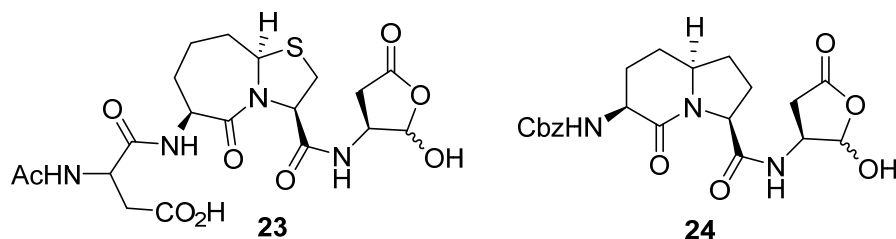


Figure 1.13. Structures des azabicyclo[5.3.0] et [4.3.0]alcanone inhibiteurs des caspases.

1.3.4 Modification de la chaîne latérale

La nature des chaînes latérales du peptide jouent un rôle crucial dans la reconnaissance moléculaire sur le récepteur ^{69, 70}. En effet, le positionnement de certains groupements et leur nature, que ce soit hydrophobique, polaire ou électrostatique, contribue à créer les interactions essentielles avec le site actif ⁷¹. Pour ce faire, un acide aminé avec une chaîne latérale non naturelle peut être introduit dans le squelette peptidique. La chaîne latérale servira alors à réduire la flexibilité du peptide, par exemple la méthylation du noyau aromatique de la tyrosine empêche la libre rotation autour de l'angle de rotation (χ^2) ⁷². L'investigation par modification de chaînes latérales a été utilisée pour augmenter l'absorption des α -amino-acides par les intestins ⁷³. On constate alors une augmentation de l'absorption de 36 fois plus pour l'analogue acide acétique **26**, de 42 fois pour propylamine **27**, de 55 fois pour l'analogue avec hydrogène **28** et de 102 fois pour le dérivé hydroxylé **29** (figure 1.14).

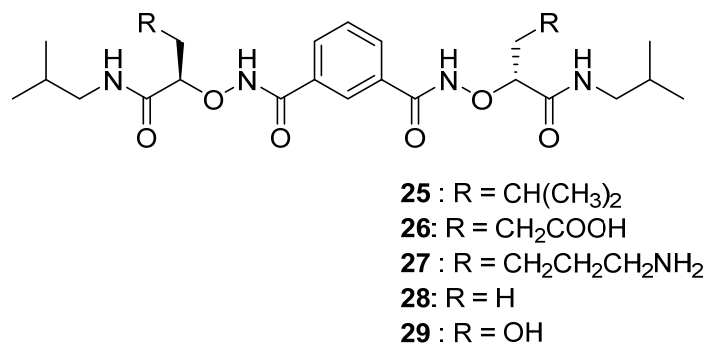


Figure 1.14. Analogues α -acides aminés.

Une modification de chaîne latérale dans Antillatoxin, un peptide cyclique et neurotoxine puissant, conduit à des changements dramatiques dans la cytotoxicité (figure 1.15)⁷⁴.

R	cytotoxicity (EC ₅₀)
 antillatoxin	45nM
	11000 nM
	1200nM

Figure 1.15. Analogues de l'Antillatoxin.

1.3.5 Introduction d'isostère

Une autre approche dans la conception des peptidomimétiques consiste à modifier le lien peptidique lui-même ou le remplacement d'un atome du squelette peptidique par un autre atome (Figure 1.16)⁷⁵. Ce genre de modification pourrait avoir un effet direct sur l'activité biologique du peptidomimétique⁷⁶. On peut alors observer un changement dans la polarité,

l'hydrophobie, ou encore la stabilité de la liaison notamment pour les analogues à doubles liaisons où la liaison entre le carbone α et le carbone β est insaturée ^{77, 78}.

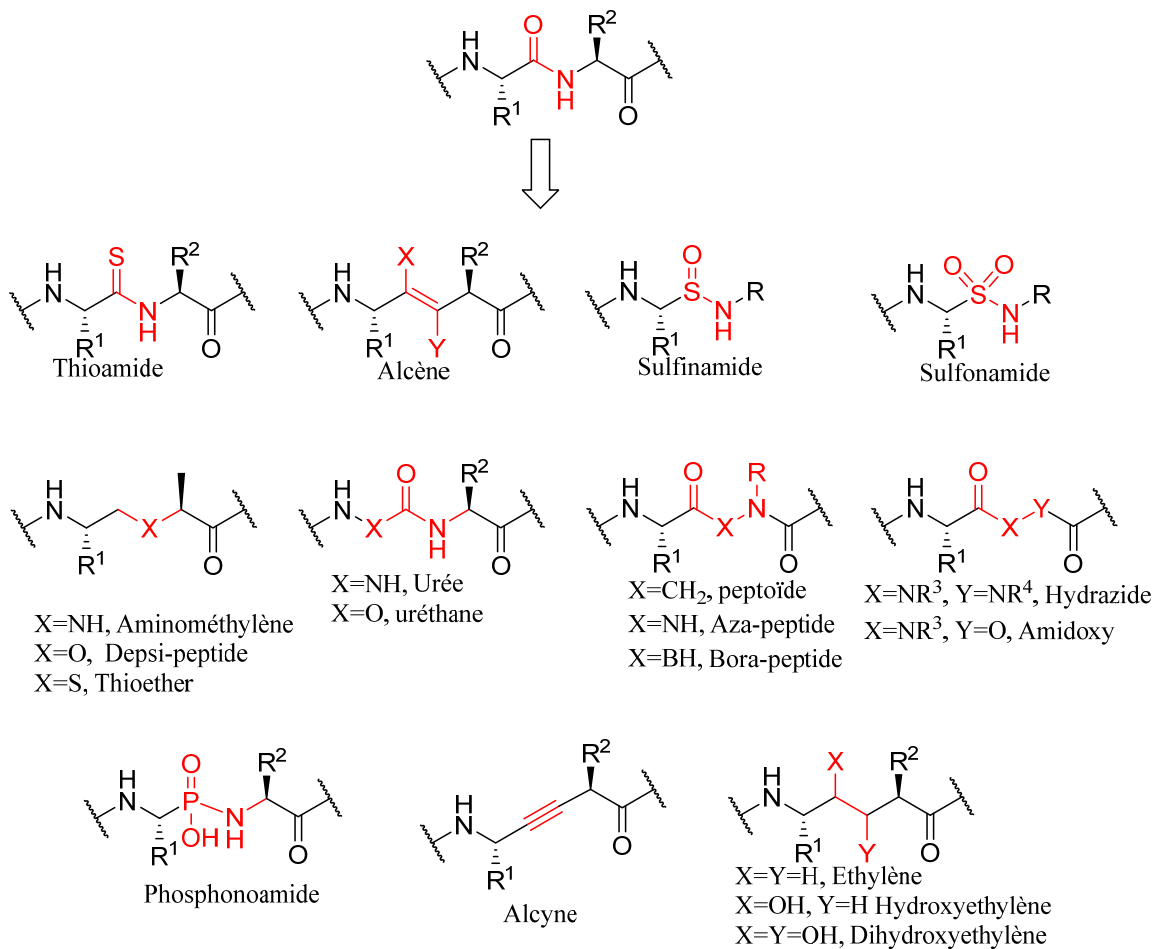


Figure 1.16. Exemples d'isostère du lien amide ^{75, 79, 80}.

1.4 Intérêt de recherche

Ces travaux de maîtrise sont effectués dans le cadre d'une collaboration entre les laboratoires des professeurs Audrey Claing, Stéphane A. Laporte, Sylvain Chemtob et William D. Lubell. Notre objectif était d'examiner la nature du tour β essentiel pour la reconnaissance sur le récepteur de prostaglandine F₂ α . Comme mentionné auparavant, l'étude

réalisée dans notre laboratoire a confirmé le PDC 113.824 et l'aza-Gly-Pro **5** comme inhibiteurs allostériques du récepteur de la prostaglandine F2 α capables de prolonger la durée de gestation chez les souris.

Les structures cristallines de l'indolizidin-2-one **1** squelette central du PDC113.824 suggèrent que ce résidu adopte un tour β du type II', alors que l'aza-Gly-Pro résidu central du mème peptidique **5** peut adopter un tour β du type I ou II'. Sachant que les dérivés aza-Gly-Pro peuvent adopter les deux conformations, il nous a semblé pertinent d'étudier la nature du tour β impliqué dans la reconnaissance du récepteur. Quatre analogues du PDC113.824 ont été synthétisés en utilisant un azabicyclo[5.3.0]alkanone **11** et un macrocycle **10** comme mimes du tours β de type I, ensuite le Gly-proline **12** et le D-Ala-Pro **13** comme mimes du tours β de type II' (Schéma 1.4). Nous nous sommes appuyés sur la stratégie développée dans notre laboratoire pour préparer la lactame macrocyclique^{51, 54} qui a été ensuite couplée avec la pyridylalanine- β -homophenylalanine benzyl ester. Le tétra-peptide résultant **30** a été utilisé comme un intermédiaire commun pour obtenir les deux mimes peptidiques azabicyclo[5.3.0]alkanone **33** et macrocycle lactame **32** (Schéma 4). Nous avons tenté de faire une cyclisation transannulaire directement sur le tétra-peptide macrocyclique **30** au lieu de synthétiser le bicyclic **11** et de le coupler par la suite à la pyridylalanine- β -homophenylalanine benzyl ester. Afin de confirmer la stéréochimie du tétra-peptide bicyclique, nous avons synthétisé l'azabicyclo[5.3.0]alkanone **11** à partir de la lactame macrocyclique **10**. Le bicyclic obtenu a été couplé avec la pyridylalanine- β -homophenylalanine benzyl ester (Schéma 1.4). L'examen des spectres RMN proton et carbone 13 des deux homologues montrent des déplacements chimiques et des constantes de couplages identiques.

Les résultats obtenus ont démontré qu'un tour β de type II' était indispensable pour le maintien de l'activité, ils ont aussi démontré que les tours β non-naturels sont plus efficace que les tours β naturels, en effet les mimes du tour β du type I, tels que l'azabicyclo[5.3.0]alkanone **33** et la macrocycle lactame **32** ne présentent aucune d'activité inhibitrice sur les contractions utérines de souris *ex vivo* ni *in vitro*, tandis que la D-Ala-Pro **35** (mime du tour β type II') montre une bonne capacité à réduire les contractions utérines, la Gly-Pro **34** a son tour β potentialise l'effet de la PGF2 α sur la voie des MAP kinases ERK1/2. L'évidence qu'un tour β de type II' non naturel est plus efficace repose sur le fait que le PDC113.824 et l'aza-Gly-Pro **5** sont les analogues les plus puissants observés.

Considérant que la D-Ala-pro **35** présente la meilleure activité dans l'essai sur contractions myométriales de l'utérus de souris *ex vivo* parmi les quatre analogues, un examen plus approfondi de sa conformation en solution a été réalisée en utilisant la spectroscopie de RMN. Une concentration du DMSO qui varie de 5% à 100% a été choisi comme solvants pour observer les changements de déplacement chimique du proton amide impliqué dans le maintien du tour β . On observe alors une faible variation dans le déplacement chimique ($\Delta\delta = 0.28$ ppm en fonction de la variation de la concentration du solvant) du proton NH pyridinylalaninyle due à son implication dans la liaison hydrogène qui stabilise le repliement. Le signal du proton NH alaninyle présente une grande variation dans le déplacement chimique ($\Delta\delta = 1,21$ ppm) tandis que le signal NH homophénylalaninyle ($\Delta\delta = 0,53$ ppm) présente une valeur intermédiaire.

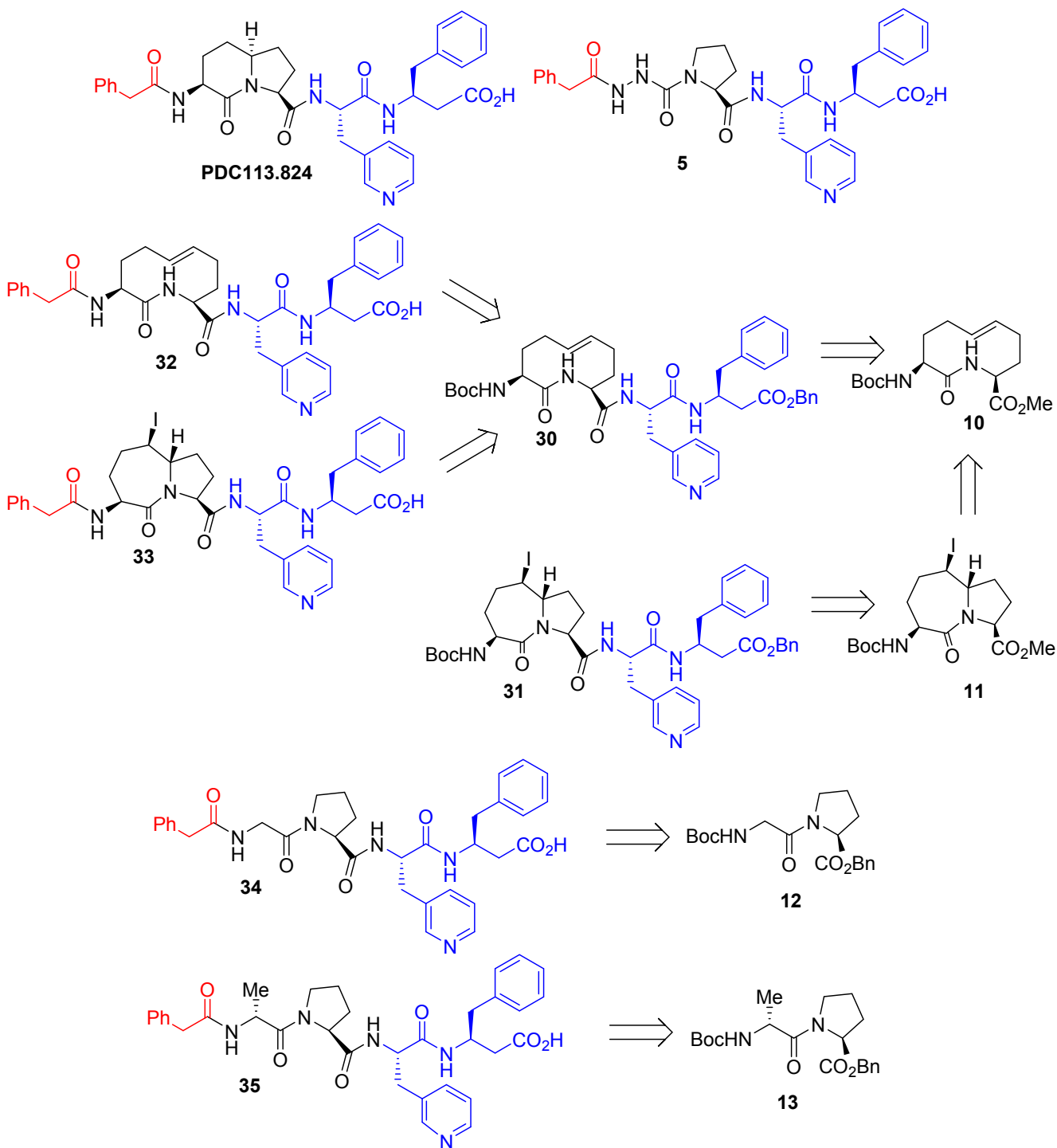


Schéma 1.4. Objectif de recherche.

Chapitre 2. Étude du tour béta nécessaire pour la reconnaissance sur le récepteur de la prostaglandine F2 α

2.0 Introduction

Dans l'intérêt de trouver la conformation active du PDC113.824 et de l'aza-glycyl-proline lors de l'interaction avec le récepteur, il a été nécessaire de synthétiser de nouveaux mimés peptidiques capables de mimer les deux conformations possiblement adoptées par le PDC113.824 et l'aza-glycyl-proline. L'azabicyclo[5.3.0]alkanone et le dipeptide macrocyclique ont été choisis due à leurs capacités de mimer le tour β type I, tandis que le glycyl-proline et le D-alanyl-proline sont susceptibles d'adopter un tour β type II.

Dans l'article ci-présent, j'ai effectué la synthèse de la totalité des mimés peptidiques, macrocycle **32**, azabicyclo[5.3.0]alkanone **33**, glycyl-proline **34**, le D-alanyl-proline **35**. J'ai également rédigé cet article sous la supervision du Professeur William D. Lubell. Xin Hou, a réalisé les tests *ex vivo* des mimés peptiques sur le myomètre des souris, sous la supervision du Professeur Chemtob. Ljiljana Nikolajev a effectué les tests *in vitro* sur la voie de signalisation des protéines kinases ERK1/2, sous la supervision du Professeur Stéphane A. Laporte. Sara Ratni a examiné l'effet des mimés peptidiques sur la voie ROCK, sous la supervision du Professeur Audrey Claing. Les co-auteurs ont aussi rédigé leurs propres parties expérimentales. Les tests biologiques ont été performés selon le protocole suivant,

Teste sur les contractions myométriale *ex vivo*²³: immédiatement après l'accouchement, des bandes de 2 à 3 mm de largeur et de 1 cm de longueur ont été coupées à partir de l'utérus des souris, en suite elles ont été suspendues dans des bains d'organes contenant du tampon de Krebs équilibrées avec 21% d'oxygène à 37°C avec une tension initiale fixée à 2g. Le système d'acquisition de données AcqKnowledge (BIOPAC MP150) a été utilisé pour

enregistrer la durée et la fréquence des pics de contractions myométriales en présence ou en absence de la PGF₂ α et les mimes peptidiques **32-35**

Teste sur les protéines kinases ERK1/2 ²³. Le niveau de phosphorylation des protéines kinases ERK1/2 a été mesuré par des procédés Western Blot classiques. Les cellules HEK293 ont été mises dans des plaques à 6 puits préalablement prétraitées à la poly-L-lysine (0.1mg/ml), ensuite transfectées avec le récepteur HA-FP (ug/ml). Le milieu a été changé 24 h après la transfection, et l'expérience a eu lieu 24h plus tard. Les cellules ont été privées de sérum pendant 30 minutes, prétraitées avec les mimes peptidiques **32-35** (2um) pendant 30 mn et provoquées avec le ligand PGF₂ α (0 ou 1uM) pendant 5 minutes, ensuite les cellules ont été lysées dans du tampon de Laemmli 2 \times (250 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% de SDS, 10% de glycérol, 0,01% de bleu de bromophénol). Les lysats ont été migrés sur un gel de SDS-PAGE 10% qui fut ensuite transféré sur une membrane de nitrocellulose et le niveau de protéines ERK1/2 phosphorylé a été détecté grâce aux anticorps monoclonaux anti-phospho-ERK1/2 (souris) et polyclonaux anti-total- ERK1-2 (lapin) respectivement. Les signaux ont été mesurés via densitométrie et les tests statistiques ont été effectués avec Graphpad Prism 5.

Contraction cellulaire (cell ruffling) ²³. les cellules FP privées de sérum ont été étalées sur des lamelles, prétraitées ou non avec chaque mime peptidique MER1-4 pendant 30 min à 37 ° C, stimulées avec 1 μ M de PGF₂ α pendant 30 min, fixées avec 4% de paraformaldehyde (PFA) , et colorées avec Alexa Fluor 488 phalloïdine. Neuf domaines (5075 cellules / domaine) par lamelle ont été quantifiés pour évaluer les contractions cellulaires circulaires.

Investigation of the Active Turn Geometry for the Labour Delaying Activity of Indolizidinone
and Azapeptide Modulators of the Prostaglandin F2 α Receptor.

Meriem K. Boukanoun,[†] Xin Hou,[‡] Ljiljana Nikolajev,^{¶§} Sara Ratni,[¶] David Olson,^{¶¶} Terence Hébert,[§] Audrey Claing,[¶] Stéphane A. Laporte,^{¶§} Sylvain Chemtob,^{§‡} and William D. Lubell^{†,}*

[¶]Department of Medicine, McGill University Health Center Research Institute, Montréal H3A 1A1, [§]Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montréal H3G 1Y6, Départements de [¶]pharmacologie et [†]chimie, l'Université de Montréal, Montréal H3C 3J7, and [‡]Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine Research Center, Montréal H3T 1C5, Canada

Submitted to Organic & Biomolecular Chemistry

Remarque: la numérotation des molécules a été modifiée pour respecter l'uniformité du
mémoire

2.1 Abstract

Pursuing molecules that delay labour, so-called tocolytics, the prostaglandin F2 α receptor (FP) was targeted, because of its roles in the stimulation of uterine contractions leading to birth and preterm birth. Previously, the indolizidinone PDC113.824 and the aza-glyciny-proline analog **5**, both were shown to delay labour in the mouse by modulating FP function, likely by an allosteric mechanism, which features biased signalling. Crystal structure and computational analyses of the indolizidin-2-one amino acid and aza-glyciny-proline components of PDC113.824 and **5** in model peptides have shown them to adopt geometry that mimic ideal type I and II' β -turns. To elucidate the precise turn geometry for receptor recognition, analogs **32-35** have now been synthesized: macrocycle and pyrroloazepinone mimic **32** and **33** to mimic type I β -turn, and glyciny-proline and D-alaniny-proline analogs **34** and **35** to favour type II' β -turn geometry. Notably, transannular cyclization of peptide macrocycle **30** has provided diastereoselectively pyrroloazepinone **31** by a novel route that provides effective access to mimics **32** and **33** by way of a common intermediate. Among the four analogs, none exhibited efficacy nor potency on par with PDC113.824 and **5**; however, D-alaniny-proline analog **35** proved superior to the other analogs in reducing PGF2 α -induced myometrial contractions and inhibiting FP modulation of cell ruffling, a response dependent on the G₁₂/RhoA/ROCK signaling pathway. Furthermore, Gly-Pro analog **34** potentiated the effect of PGF2 α on Gq mediated ERK1/2 activation. Evidence that **35** adopted turn geometry was obtained by conformational analysis using NMR spectroscopy to characterize respectively the influences of solvent and temperature on the chemical shifts of the amide NH protons. Although mimicry of the type II' geometry by **35**, PDC113.824 and **5** may favour activity,

distortion from ideal geometry by the indolizidinone and aza-glycinyll residues of the latter appears to enhance their biological effects.

2.2 Introduction

A major determinant of neonatal mortality and morbidity, defined as childbirth before 37 weeks of gestation, preterm birth can have long-term adverse health consequences.¹⁻³ Notably, >10% of all babies are born too soon, accounting for ~15 million preterm babies worldwide every year, among which ~1 million die each year due to complications at birth.¹ Contemporary drugs which delay labour,⁴⁻⁷ so-called tocolytics, have had limited success, such that the incidence of preterm birth has increased over the past thirty years. Beyond concerns for the well being of premature infants, the socio-economic considerations of preterm birth include costs for hospitalization, rehabilitation and special schooling, which have increased paradoxically due to improved survival rates. In 2005, the costs associated with preterm birth in the US was estimated to be >\$26 billion, making preterm birth the highest per patient cost of any medical disorder.^{8,9}

Pursuing a novel approach to delay labour, we have targeted the prostaglandin F₂ α (PGF₂ α) receptor (FP), because of the major role played by this G protein-coupled receptor (GPCR) in the regulation of uterine activity and the molecular mechanisms of human labour and parturition.¹⁰ The expression of FP augments markedly during term and especially preterm parturition.^{11,12} Moreover, the FP knockout mouse never goes into labour.¹³

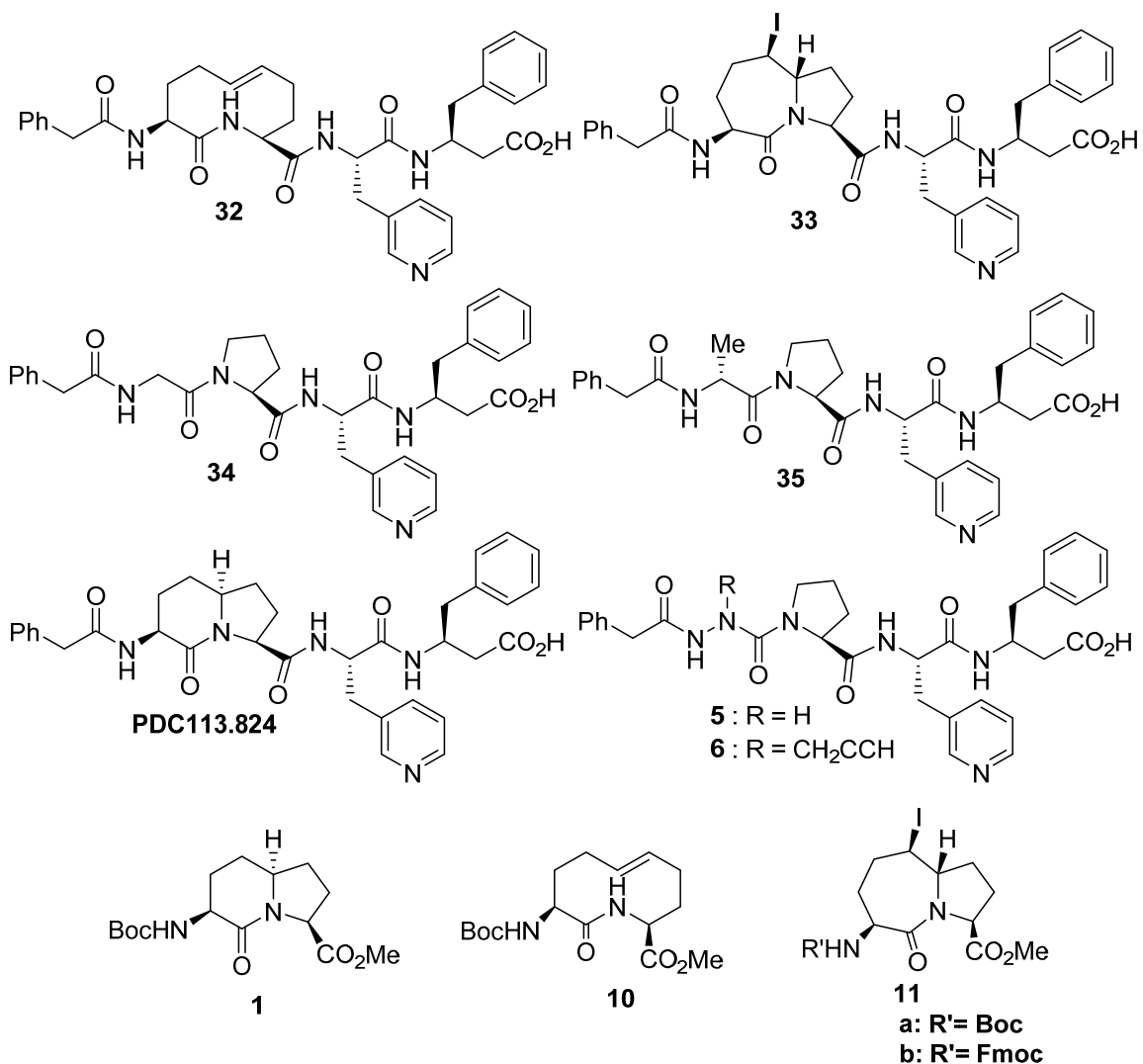


Figure 2.1. Indolizidinone PDC113.824, azapeptides **5** and **6**, as well as targets **32-35**, in which type I and II' β -turn mimics have been inserted.

In targeting FP, we have created two series of modulators, which do not compete with the native orthosteric ligand PGF₂ α for FP binding, but appear to bind to a remote allosteric site and influence receptor signalling by altering receptor conformation.^{14,15} For example, indolizidinone analogs typified by PDC113.824 (**5**, Figure 2.1) exhibit no activity on FP in the absence of PGF₂ α ; however, in the presence of this native ligand, they enhance coupling to

G α q resulting in increased PKC-dependent ERK1/2 signalling, and simultaneously inhibit G α 12 coupling and RhoA/ROCK-dependent cytoskeletal rearrangement.¹⁴ In addition, PDC113.824 inhibits myometrial contractions. In pregnant mice, indolizidinone (PDC113.824) delayed respectively lipopolysaccharide- and PGF2 α -induced delivery with average times of 28 and 42 h.¹⁴ A second series of FP modulators was prepared by replacement of the indolizidinone moiety of PDC113.824 with an aza-amino acyl-proline residue, as typified by aza-glyciny-proline analog **5**, which exhibited similar effects on myometrium contraction and biased signalling as PDC113.824. In this azapeptide series, the side-chain of the aza-residue appears to influence the biased signalling of FP. For example, an aza-propargylglyciny-proline analog **6** exhibited comparable effects on myometrial contractions and ERK_{1/2} signalling as **5**,¹⁵ albeit with reduced influence on RhoA/ROCK signalling. Such findings illustrate that FP signalling can be modulated by these allosteric ligands to favour specific modalities.^{14, 15, 16}

Underlying their similar mechanism of action may be a common conformation adopted by (3*S*,6*S*,9*S*)-indolizidin-2-one PDC113.824 and azaGly-Pro analog **5**. In the crystal structure of (3*S*,6*S*,9*S*)-indolizidinone *N*-(Boc)amino methyl ester **1**, the dihedral angles of the backbone atoms constrained inside the heterocycle ($\psi = -176^\circ$ and $\phi = -78^\circ$) resembled the values of the central residues in an ideal type II' β -turn ($\psi = -120^\circ$ and $\phi = -80^\circ$, Table 2.1).¹⁷ In tetrapeptide models, however, conformational analysis using the Monte Carlo/stochastic dynamics simulation with AMBER* parameters in water as implicitly represented by the GB/SA solvation model indicated that the (3*S*,6*S*,9*S*)-indolizidin-2-one amino acid residue was more effective as a reverse turn than as a β -turn mimic.¹⁸ Conformational analysis of Ac-aza-Gly-L-Ala-NHMe predicted the type I β -turn as an energy minimum that was 10.5 kJ/mol lower in energy than its type II' β -turn conformer.¹⁹ Moreover, X-ray analyses of aza-

dipeptide models (Boc-aza-Ala-Pro-NH*i*-Pr, Cbz-aza-Asp(Et)-Pro-NH*i*-Pr and Cbz-aza-Asn(Me)-Pro-NH*i*-Pr) showed the aza-Xaa-Pro dipeptide to adopt the central *i* + 1 and *i* + 2 residues of a type I β -turn.^{20, 21}

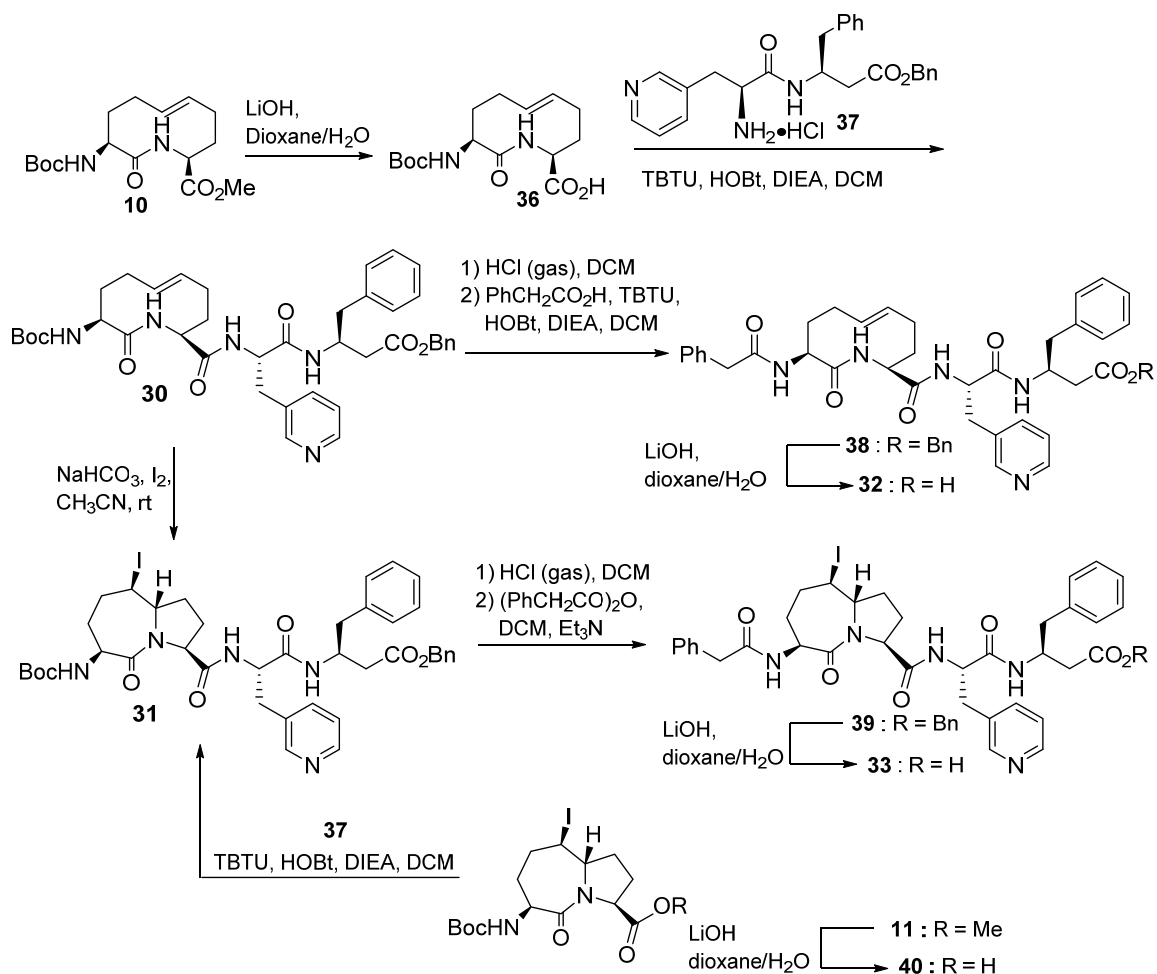
To differentiate whether type I or II' β -turn conformations were responsible for the activity of PDC113.824 and **5**, we have now synthesized and examined the biological activity of analogs **32-35** in which the respective indolizidinone or aza-Gly-Pro moiety was replaced by other residues known to adopt such ideal turns (Figure 2.1). For example, 10-member unsaturated macrocyclic lactam **10** and azabicyclo[5.3.0]alkan-2-one amino acid **11**, both have been shown by X-ray crystallography to adopt type I β -turn conformations (Table 2.1).^{23, 26} On the other hand, to induce type II' conformers, Gly-Pro and D-Ala-Pro were employed, because these sequences have been shown to prefer the central position of this β -turn type.^{24, 27} By studying analogs **32-35** for potential to reduce PGF2 α -induced myometrial contractions, to potentiate the effect of PGF2 α on Gq-mediated ERK_{1/2} activation and to inhibit FP modulation of cell ruffling, we seek to gain key insights into the conformational requirements for the mechanisms contributing to FP-dependent physiological and patho-physiological responses.

Table 2.1. Ideal type I and II' β -turn dihedral angles and comparisons with turn mimics.

	ϕ_1	Ψ_1	ϕ_2	Ψ_2	Reference
(3 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,9 <i>S</i>)-indolizidin-2-one 1		-176	-78		17
<i>N</i> -Boc-aza-alaninyl-proline- <i>N'</i> -iso-propylamide	-66.7	-17.7	-58.1	-24.7	21
macrocyclic lactam 10	-82	-20	-107	-18	22
azabicyclo[5.3.0]alkan-2-one amino ester 11		-63.5	-46.6		23
<i>N</i> -pivaloyl-D-alaninyl-proline- <i>N'</i> -isopropylamide	60	-140	-89	9	24
ideal type I β -turn	-60	-30	-90	0	25
ideal type II' β -turn	60	120	80	0	25

2.3 Results and Discussion

The importance of the turn geometry of PDC113.824 and **5** for their similar biological activity was investigated by replacement of their respective 3-amino indolizidin-2-one 9-carboxylate and aza-glyciny-proline residues with alternative dipeptide analogs known to adopt type I and II' geometry. In particular, 10-membered macrocyclic lactam **10** and azabicyclo[5.3.0]alkan-2-one amino acid **11** were employed to favour type I β -turn geometry, and Gly-Pro and D-Ala-Pro were employed as type II' inducers. Instead of preparing both macrocycle and bicycle independently prior to their insertion into the analogs,^{24,28} transannular cyclization was employed to convert the macrocyclic peptide into its bicyclic counterpart.



Scheme 2.1. Synthesis of 10-member macrocyclic mimic **32** and azabicyclo[5.3.0]alkan-2-one mimic **33**

Computational, X-ray and NMR analyses of 10-membered macrocyclic lactam **10** have previously shown that the dipeptide constrained in the ring prefers to adopt ϕ , ψ , and ω torsional angles similar to that of the central residues of an ideal type I β -turn (Table 2.1).²² Macrocycle **10** was synthesized by ring-closing metathesis of methyl *N*-(Boc)homoallylglycinyl-homoallylglycinate using the first generation of Grubb's catalyst.²³ The linear dipeptide was assembled by the coupling of selectively protected homoallylglycine

derivatives, which were synthesized by a route featuring the copper-catalyzed cross-coupling reaction of methyl *N*-(Boc)iodoalaninate to allyl chloride.²⁹ Acid **36** was obtained from hydrolysis of methyl ester **10** with lithium hydroxide in 1:1 dioxane/water.

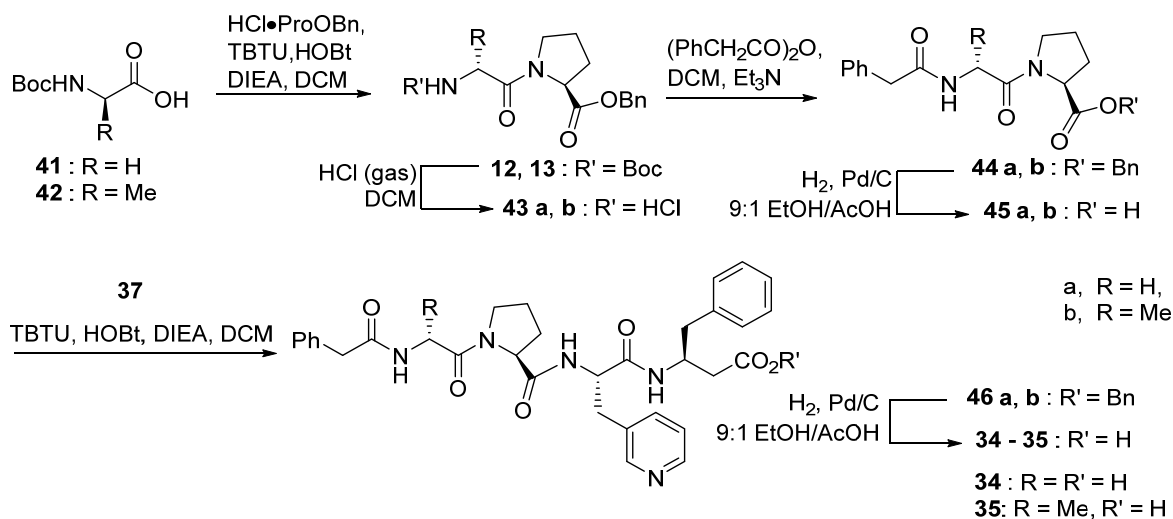
Acid **36** was coupled to pyridinylalaninyl- β -homophenylalanine benzyl ester **37** using TBTU, HOBt, and DIEA to give protected peptide **30** in 74% yield after chromatography.¹⁵ Removal of the Boc protection was effectively accomplished in 97% yield by bubbling HCl gas into a solution of **30** in CH₂Cl₂. Alternative methods for the Boc cleavage, such as 2N HCl in dioxane, and 50% TFA in CH₂Cl₂, gave side products and relatively lower yields. The resulting hydrochloride salt was coupled to phenyl acetic acid using TBTU, HOBt and DIEA in dichloromethane to afford phenylacetamide **38** in 70% yield. Hydrolysis of benzyl ester with 2N LiOH in dioxane gave acid **32** after purification by preparative reverse-phase HPLC (Scheme 2.1).

Previously, X-ray analyses of *N*-(Boc)- and *N*-(Fmoc)amino pyrroloazepinone esters **11a** and **11b** indicated that the dihedral angles within the bicycle were similar to those of the central residues of an ideal type I β -turn (Table 2.1).²³ Pyrroloazepinones **11a** and **11b** were respectively synthesized by diastereoselective transannular cyclizations of macrocyclic lactam **10** and its Fmoc counterpart using iodine in THF.^{23, 28} Instead of preparing ester **11a** for subsequent introduction into a constrained analog by peptide coupling chemistry, a new strategy featuring transannular cyclization within the peptide framework was examined to introduce the azabicyclo[5.3.0]alkan-2-one into peptide mimic **33**. Macrocyclic peptide **30** was treated with iodine in the presence of excess sodium bicarbonate for 1h (Scheme 2.1). Transannular cyclization of macrocycle **30** provided pyrroloazepinone **31** as a single

diastereomer in 94% yield. To confirm the stereochemistry of the compound **31**, bicycle **11** prepared according literature from macrocycle **10**,³⁰ was hydrolysed with 2N LiOH in dioxane to give acid **40**, then coupled to pyridinylalaninyl- β -homophenylalanine benzyl ester **37** using TBTU, HOBt, and DIEA to provide the protected peptide **31**, which exhibited identical chemical shift and coupling constant J values to material prepared from transannular cyclization on peptide **30**. Removal of the Boc group of **31** with HCl gas as described above gave the hydrochloride salt, which was directly coupled to phenyl acetic anhydride to give **39**. To minimize side product and simplify purification in the installation of the phenylacetyl group, phenyl acetic anhydride was employed with triethylamine in CH₂Cl₂. Phenylacetamide **39** was isolated in 73% yield after purification by chromatography on silica gel. Finally, ester hydrolysis as described above provided acid **33**, which was purified by preparative reverse-phase HPLC.

Natural amino acids were employed to favour the type II' β -turn geometry. Specifically, Gly-Pro and D-Ala-Pro were used, because of their preference to adopt the central positions of the type II' β -turn in natural peptides.²⁷ Proline benzyl ester was respectively coupled to *N*-(Boc)glycine **41** and *N*-Boc-D-alanine **42** using TBTU, HOBt, and DIEA to give quantitatively the protected dipeptides **12** and **13**, which were observed to exist as prolyl amide isomers in their respective NMR spectra. Removal of the Boc group with HCl gas and phenylacetylation of the respective salts **43** with phenyl acetic anhydride and triethylamine in CH₂Cl₂ afforded respectively phenylacetamides **44a** and **44b** in 86% and 78% yields. Hydrogenolytic removal of the benzyl ester of **44** with palladium-on-carbon as catalyst in 9:1 EtOH:AcOH furnished respectively in 90% and 85% yields acids **45a** and **45b** which were coupled to pyridinylalaninyl- β -homophenylalanine benzyl ester **37** using TBTU, HOBt,

and DIEA to give respectively tetrapeptides **46a**, and **46b** in 72% and 81% yields. Finally, hydrogenation using the conditions described above removed the benzyl ester to provide respectively acids **34** and **35** after purification by preparative reverse-phase HPLC (Scheme 2.2).



Scheme 2.2. Synthesis of Gly-Pro and D-Ala-Pro analogs **34** and **35**.

2.4 Biological Activity

Biological effects of azapeptide mimics

Effect of indolizidinone PDC113.824, azapeptide 5 and analogs 32-35 on myometrial contraction

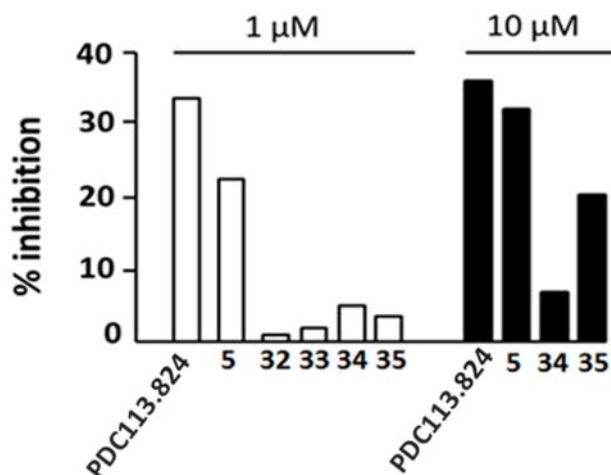


Figure 2.2. Effects of indolizidinone PDC113.824, azapeptide 5 and analogs 32-35 on mean tension induced by PGF2α. At the beginning of each experiment, mean tension of spontaneous myometrial contractions was considered as the basal response.

As previously reported,^{28, 15} indolizidinone PDC113.824 and azapeptides 5 and 7 reduced significantly in a dose-dependent manner the strength and duration of both PGF2α induced and spontaneous contractions of myometrium obtained from spontaneous post-partum mice. The influences of 32-35 on PGF2α induced myometrial contractions were thus examined to evaluate their inhibitory potential.

In contrast to the activity of indolizidin-2-one PDC113.824 and aza-peptide 5, the related mimics 32-35 exhibited no or significantly reduced effects on PGF2α induced myometrial contractions (Figure 2.2). The type II' mimics 34 and 35 exhibited slightly better

activity than the type I mimic counterparts **32** and **33**. Among the four analogs, D-Ala-Pro peptide **35** possessed the best activity and at 10 μ M exhibited about 50% of the inhibitory activity shown by indolizidin-2-one PDC113.824 and aza-peptide **5** in the myometrial contraction assay.

Effect of aza-peptides on PGF $_{2\alpha}$ stimulated signaling pathways

Both the binding of PGF $_{2\alpha}$ on HEK 293 cells stably expressing FP (FP cells) and PGF $_{2\alpha}$ dependent signaling have been shown to be influenced by indolizidinone **5** and aza-peptide **5** in ways that facilitated G $_q$ -mediated signaling via PKC/ERK $_{1/2}$ and inhibited signaling by way of the G $_{12}$ -mediated RhoA/ROCK pathway^{28,15}. The latter impaired actin reorganization and cell membrane ruffling^{28,15}. To gain insight into the importance of modulator conformation on these downstream effects, analogs **32-35** were examined for their potential to regulate both of these signaling pathways.

The effects of analogs **32-35** on PGF $_{2\alpha}$ -mediated ERK $_{1/2}$ activation was assessed in HEK293 cells expressing HA-tagged FP. Among the four analogs, compared to untreated conditions (Vehicle, DMSO) (Vehicle \equiv Veh \equiv solvent), only Gly-Pro derivative **34** exhibited no effect on ERK $_{1/2}$ activation (not shown), but increased PGF $_{2\alpha}$ -mediated phosphorylation of ERK $_{1/2}$ (Figure 2.3). The latter effect was more obvious and significant at higher PGF $_{2\alpha}$ concentrations. The increase in efficacy of PGF $_{2\alpha}$ -mediated ERK $_{1/2}$ activation was comparable to that produced by azaGly-Pro analog **5**, which was previously shown to potentiate MAPK activity.¹⁵ On the other hand, type I mimics **32** and **33**, and type II' mimic **35**, all did not show any significant effect on PGF $_{2\alpha}$ -mediated activation of ERK $_{1/2}$ relative to agonist-stimulated cells treated with DMSO (Figure 2.3).

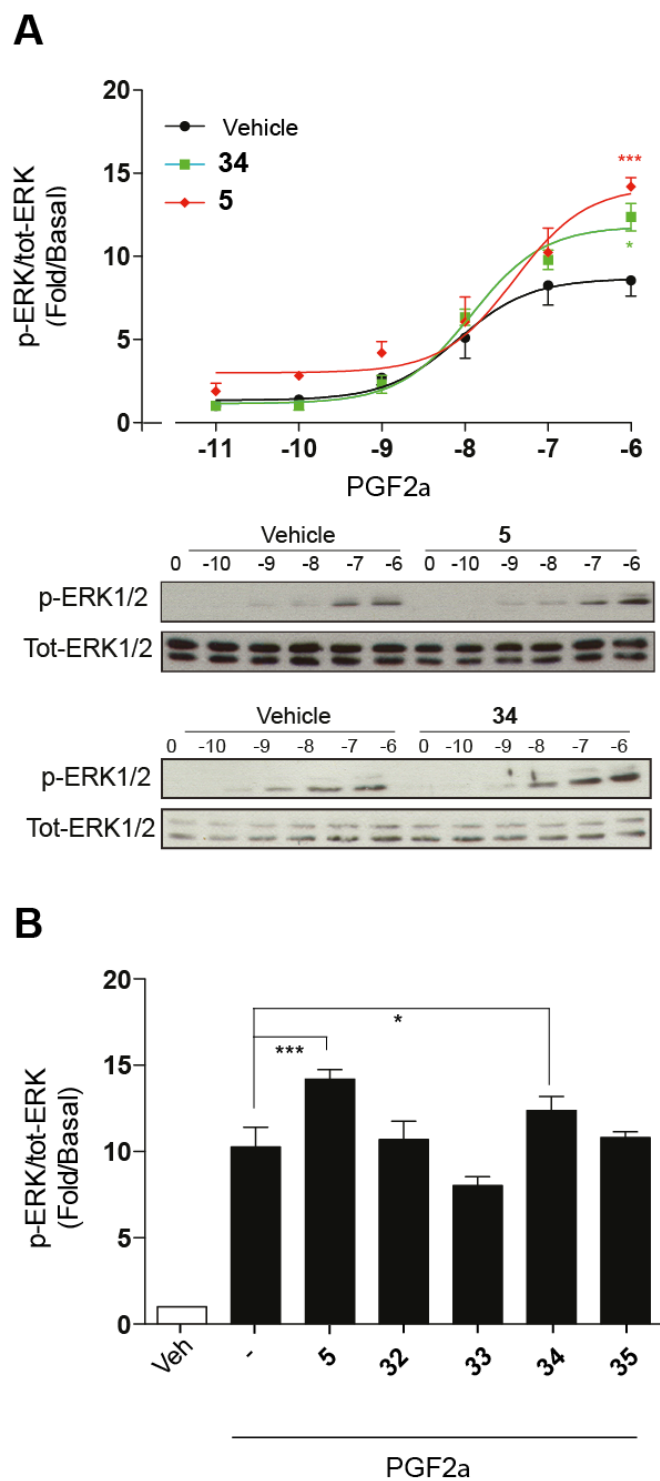


Figure 2.3. Effect of compounds 32-35 on PGF₂ α -mediated ERK1/2 activation.

(A) HEK293 cells expressing HA-FP untreated (Vehicle) (Vehicle \equiv Veh \equiv solvent), treated with azapeptide **5** (2 μ M, 30 min) or **34** (2 μ M, 10 min), then challenged with increased

concentrations of PGF₂α (2 min). p-ERK signals were quantified by densitometry, normalized to that of t-ERK and plotted in dose-response curves as fold over basal (non-stimulated condition) (top panel). Shown are representative immuno-blots of ERK activation treated with azapeptide **5** and **34**. Lysates were immunoblotted for phosphorylated ERK (p-ERK) and total ERK (t-ERK) (bottom panels). (B) Densitometry analysis of data from HEK293 cells either left unstimulated (Veh) or challenged with PGF₂α (1μM, 2 min) in the presence of either DMSO (-), azapeptide **5**, and analogs **32-35** (2μM, 30min). Data are presented as mean ±SEM and results are representative of at least **34** independent experiments. *, p<0.05; ***, p<0.001.

Stimulation with PGF₂α (1 μM, 15 min) caused membrane ruffle formation in ~84% of FP cells (Figure 2.4). Azapeptide analogs 1-3 did not affect membrane ruffling; although the effects of analog **35** were not statistically significant, this compound exerted a tendency in reducing PGF₂α-elicited membrane ruffling, consistent with its efficacy in diminishing PGF₂α-induced myometrial contraction (Figure 2.4).

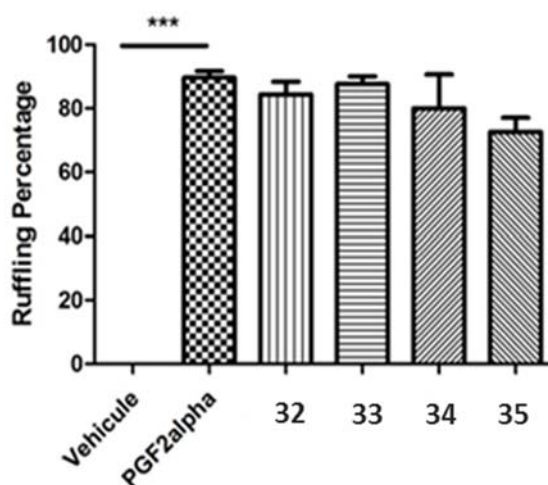


Figure 2.4. Effects of analogs 32-35 on cell ruffling.

FP expressing cells seeded onto cover-slips were pretreated with analogs **32-35** (1 μ M, 30 min) and then stimulated with PGF2 α (1 μ M, 15 min) as previously described¹⁴. Cells were then fixed with paraformaldehyde (4%), stained with Phalloidin-Alexa Fluor 488, and mounted onto cover-slips using GelTol media. Numbers of cells exhibiting circular ruffling for each condition were counted. Results are the mean \pm SEM of 3 independent experiments where more than 100 cells were counted. ***P<0.001 are values compared to the control unstimulated conditions.

FP expressing cells seeded onto cover-slips were pretreated with analogs **32-35** (1 μ M, 30 min) and then stimulated with PGF2 α (1 μ M, 15 min) as previously described.¹⁴ Cells were then fixed with paraformaldehyde (4%), stained with Phalloidin-Alexa Fluor 488, and mounted onto cover-slips using GelTol media. Numbers of cells exhibiting circular ruffling for each condition were counted. Results are the mean \pm SEM of 3 independent experiments where more than 100 cells were counted. ***P<0.001 are values compared to the control unstimulated conditions.

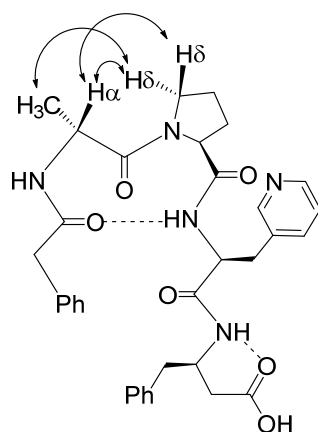


Figure 2.5. ROESY correlations for D-alanyl proline mimic **35**.

2.5 Conformational analysis of D-alaninyl proline mimic **35** using NMR spectroscopy.

Considering that D-alaninyl proline mimic **35** exhibited the best activity in the myometrial contraction assay among the four analogs, further examination of its conformation in solution was performed using NMR spectroscopy. Although conformation in the environment of the membrane bound receptor may vary from that in solution, 5% DMSO- d_6 in chloroform was chosen as solvent to favour a folded geometry and to facilitate spectroscopic experiments.

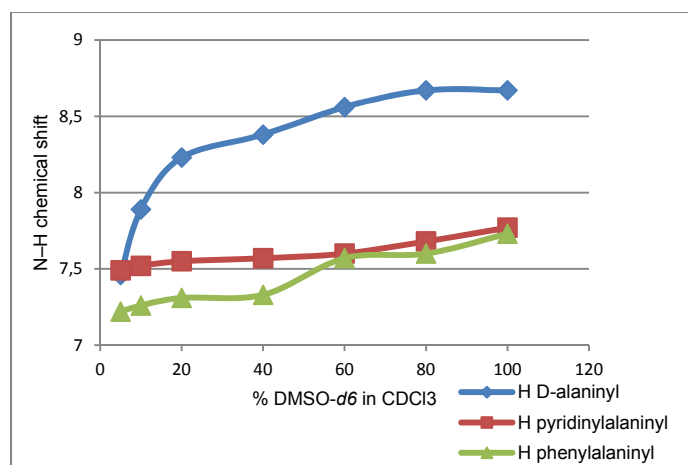


Figure 2.6. Variation of amide N–H chemical shift values versus the percentage of DMSO- d_6 in DMSO- $d_6/CDCl_3$

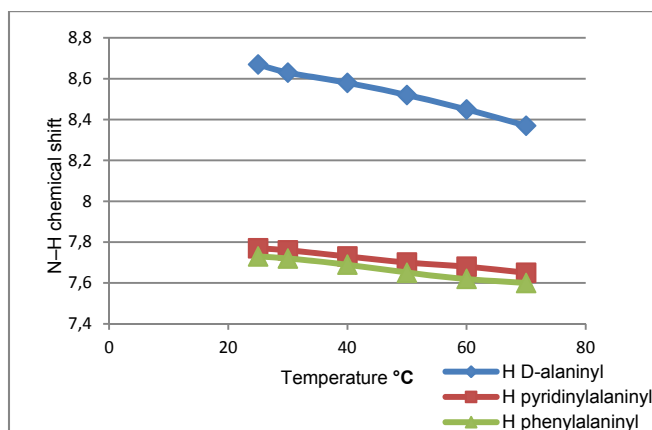


Figure 2.7. Variation of amide N–H chemical shift values versus temperature °C

Initially, the proton signals of **35** were assigned using two-dimensional COSY and HSQC experiments in 5% DMSO- d_6 in $CDCl_3$. The prolyl major *trans*-isomer (>97%) was then confirmed by observation of characteristic through-space transfer of magnetization between the proline residue δ -protons at 3.33 ppm and both the α -proton (4.30 ppm) and methyl protons (1.26 ppm) of the D-alaninyl residue in the ROESY spectrum in 5% DMSO- d_6 in $CDCl_3$ (Figure 2.5, Supporting Information). The environments of the amide protons of mimic **35** were next evaluated by NMR experiments in which variations of their chemical shift values were measured as a function of the percent of DMSO- d_6 (5 to 100%) added to the $CDCl_3$ solution, as well as a function of temperature (Figures 2.6 and 2.7). Notably, relative to the signals of the other amide protons, the pyridinylalaninyl NH signal exhibited little variation ($\Delta\delta = 0.28$ ppm) in chemical shift indicative of a solvent shielded proton engaged in a hydrogen bond. The D-alaninyl NH signal ($\Delta\delta = 1.21$ ppm) was solvent exposed, and the β -homophenylalaninyl NH signal ($\Delta\delta = 0.53$ ppm) exhibited an intermediate value. The chemical displacements of the amide protons as a function of increasing temperature from 25 to 70 °C in DMSO- d_6 exhibited a similar pattern. The pyridinylalaninyl NH ($\Delta\delta = 0.12$ ppm) and D-alaninyl NH ($\Delta\delta = 0.30$ ppm) signals were respectively the least and most influenced by the change in temperature, indicative of solvent shielded and exposed protons. The chemical shift of the β -homophenylalaninyl NH signal ($\Delta\delta = 0.13$ ppm) was also solvent shielded, which may be due in part to hydrogen bonding in a five-membered ring with the side chain carboxylate (Figure 2.5). In sum, the NMR experiments confirmed that a turn conformation is favoured for D-alaninyl proline mimic **35**.

2.6 Conclusion

To study the effect of the β -turn in receptor recognition of FP modulators PDC113.824 and **5**, their indolizidin-2-one and aza-glycinyl-proline moieties were replaced with residues previously reported to adopt type I and II' β -turn conformations. Four analogs were successfully synthesized in high purity and good yields for biological testing. Transannular cyclization on peptide **30** possessing macrocyclic lactam was employed to synthesize azabicyclo[5.3.0]alkan-2-one for the preparation of peptide **33**. Although analogs **32-35** did not exhibit similar potency as the parent indolizidin-2-one and aza-glycinyl-proline derivatives PDC113.824 and **5**, type II' β -turn mimic **35** exhibited significant inhibitory effects on myometrial contraction at 10 μ M. Moreover, type II' β -turn mimics **34** and **35** were found to respectively potentiate PGF 2α mediated ERK $_{1/2}$ activation with similar efficacy as azaGly-Pro analog **6**, and to diminish associated RhoA/ROCK-dependent cell ruffling. In the light of the activity of mimics **34** and **35**, the biologically active β -turn conformation for indolizidin-2-one and aza-glycinyl-proline derivatives PDC113.824 and **5** appears to be similar to a type II' β -turn; however, subtle deviation from this geometry appears to be significant for potency in modulating PGF 2α induced myometrial contraction, as well as PGF α mediated ERK $_{1/2}$ activation and associated RhoA/ROCK-dependent cell ruffling.

2.6 General Protocols:

Unless otherwise stated, all reactions were run under argon atmosphere, using distilled solvents, which were transferred by syringe. Anhydrous solvents (CH $_2$ Cl $_2$, CH $_3$ OH) were obtained by passage through solvent filtration systems (Glass Contour, Irvine, CA). Final reaction mixture solutions were dried over MgSO $_4$. Reaction progress was monitored by

analytical thin-layer chromatography (TLC), using glass-backed plates covered with a 0.25 mm thickness of silica gel. Visualization was accomplished using potassium permanganate reagent, iodine vapors, UV illumination (254 nm), Dragendroff's reagent or ceric ammonium molybdate stain. Flash column chromatography was carried out on 230-400 mesh silica gel.³¹ The HPLC analyses of product purity were performed on a reverse phase GunFire™ C18 column 3.5 μm (21x50 mm column) using a flow rate of 0.350 mL/min and a binary solvent system consisting of solvent A, H₂O (0.1% FA) mixed with either solvent B acetonitrile (0.1% FA) or solvent C methanol (0.1% FA): the systems for the gradient of elution were as follows: system 1, 10-50% A in B over 12 min; system 2, 20-70% A in B over 12 min; system 3, 40-90% A in B over 12 min; system 4, 30-70% A in C over 10 min; system 5, 20-90% A in C over 12 min; system 6, 40-90% A in C over 10 min. Low and high resolution mass spectrometric data (ES and FAB) were obtained by the Centre Régional de Spectrométrie de Masse de l'Université de Montréal. ¹H NMR (400/500/700 MHz) and ¹³C NMR (100/125/175 MHz) spectra were recorded in CDCl₃ (δ 7.27 and 77), MeOH (δ 3.31 and 49.15) or DMSO (2.50 and 39.52). Chemical shifts are reported in parts per million; coupling constant *J* values are reported in Hertz. The proton and carbon NMR signals of minor prolyl amide isomers are presented respectively in brackets and parentheses. Specific rotations [α]_D were measured at 20°C at the specified concentrations (*c* in g/100 mL) using a 1 dm cell length on a Perkin- Elmer polarimeter 341 and the general formula: [α]_D²⁰ = (100α)/(*dc*). The HA-tagged prostaglandin-F2α receptor construct was made as previously described.¹⁴ MEM, heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), L-glutamine and gentamicin were from Invitrogen (Carlsbad, CA). PGF₂α was purchased from Cayman. Mouse monoclonal anti-phospho-ERK_{1/2} (T202/Y204) and rabbit polyclonal anti-total ERK_{1/2} were from Cell Signaling

Technology (Danvers, MA). Anti-mouse and anti-rabbit HRP-conjugated IgG were from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO) and the chemiluminescence lightening (ECL) was from Perkin-Elmer.

***N*-(Boc)Amino-(*E*,3*S*,10*S*)-2-oxo-1,2,3,4,5,8,9,10-octa-hydro-1H-azocine-10-carbonyl-**

(2*S*)-(3-pyridyl)alaninyl-(3*S*)- β -homophenylalanine benzyl ester (30): A solution of (*E*,2*S*,9*S*)-9-*N*-(Boc)amino-10-oxo-1,2,3,4,7,8,9,10-octahydroazecine-2-carboxylic acid (**36**, prepared according to reference 24, 195 mg, 0.63 mmol) in 13 mL of CH₂Cl₂ was treated with hydroxybenzotriazole (HOBt, 92 mg, 0.69 mmol) and *O*-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium tetrafluoroborate (TBTU, 221 mg, 0.69 mmol), stirred for 15 min, treated with (2*S*)-(3-pyridyl)alaninyl-(3*S*)- β -homophenylalaninyl benzyl ester hydrochloride (**37**, 286 mg, 0.69 mmol, prepared according to reference 15) followed drop-wise by DIEA (355 μ L, 2.04 mmol), and stirred at room temperature overnight. Evaporation of the volatiles gave a residue, which was purified by flash chromatography on silica gel using (5% isopropanol in CHCl₃) as eluent to furnish the benzyl ester **30** (330 mg, 74% yield) as white powder: *R*_f 0.5 (5% isopropanol in CHCl₃); mp 170°C, [α]_D²⁰ 8.18 (*c* 1.1, MeOH) ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.49 (s, 9H), 1.80-1.84 (dd, *J* = 5, 14.5 Hz, 1H), 2.02-2.15 (m, 3H), 1.23-1.26 (m, 1H), 2.35-2.46 (m, 4H), 2.73-2.77 (m, 1H), 2.82-2.87 (m, 2H), 3.03-3.08 (m, 1H), 4.31 (s, 1H), 4.41-4.48 (m, 1H), 4.57-4.61 (m, 2H), 5.06-5.08 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H), 5.12-5.15 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H), 5.22 (s, 1H), 5.36-5.42 (m, 1H), 5.48-5.51 (m, 1H), 6.62 (s, 1H), 6.84-6.86 (d, *J* = 8 Hz, 1H), 6.96 (s, 1H), 7.06-7.08 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.15-7.25 (m, 4H), 7.32-7.39 (m, 5H), 7.46-7.49 (d t, *J* = 2, 7.5 Hz, 1H), 8.35 (d, *J* = 2 Hz, 1H), 8.41-8.42 (dd, *J* = 1.5, 4.5 Hz, 1H), ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 28.3, 29.8, 30.3, 31.8, 35.3, 37.0, 39.7, 47.5, 54.1, 54.23, 54.26, 54.6, 66.4, 81.0, 123.4, 126.6, 128.4, 128.5, 128.6, 129.2, 132.1, 132.2, 135.6, 136.8,

137.2, 148.3, 150.4, 155.5, 169.1, 171.1, 171.5, 173.7. HRMS m/z calcd for $C_{40}H_{50}N_5O_7$ $[M+H]^+$ 712.3704, found 712.3732.

Phenylacetyl-(*E*, 3*S*, 10*S*)-2-oxo-1,2,3,4,5,8,9,10-octa-hydro-1*H*-azocine-10-carbonyl - (2*S*)-(3-pyridyl)alaninyl-(3*S*)- β -homophenylalanine benzyl ester (38):

Carbamate **30** (100 mg, 0.14 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (4 mL), cooled to 0°C, and treated with HCl gas bubbles for 2 h, when TLC showed complete disappearance of starting material. The volatiles were removed by evaporation and the residue was thrice dissolved in CH_2Cl_2 (5 mL) and evaporated to give the HCl salt. Triethylamine (336 μ l, 2.4 mmol) was added to a stirred solution of the resulting hydrochloride salt (160 mg, 0.24 mmol) and phenylacetic anhydride (73 mg, 0.28 mmol) in 5 mL of DCM at room temperature, and the mixture was stirred overnight. Evaporation of the volatiles provided a residue, which was purified by flash chromatography on silica gel using 10% isopropanol in chloroform as eluent. Evaporation of the collected fractions afforded phenylacetamide **38** (123 mg, 70% yield): R_f = 0.48 (10% isopropanol in chloroform); mp 210°C; $[\alpha]_D^{20}$ -5 (c 1.5, CH_2Cl_2); 1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 1.51-1.61 (m, 2H), 1.75-1.77 (m, 1H), 1.91-1.97 (m, 2H), 2.07-2.40 (m, 1H), 2.44-2.51 (m, 2H), 2.35-2.40 (m, 1H), 2.44-2.49 (m, 1H), 2.68-2.86 (m, 4H), 3.61-3.64 (d, J = 14 Hz, 1H), 3.69-3.72 (d, J = 14 Hz, 1H), 4.26-4.30 (m, 2H), 4.36-4.47 (m, 2H), 5.02-5.08 (q, J = 12.5, 19.75 Hz, 2H), 5.14-5.19 (m, 1H), 5.59-5.64 (m, 1H), 7.16-7.35 (m, 17H), 7.54-7.56 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 7.94-7.96 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 8.09-8.10 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 8.19-8.21 (d, J = 7 Hz, 1H), 8.38 (s, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO) δ 28.0, 30.4, 30.7, 31.9, 35.4, 38.4, 39.7, 40.3, 42.5, 47.8, 52.4, 54.0, 66.1, 123.6, 126.7, 126.8, 128.0, 128.4, 128.5, 128.6, 128.7,

128.8, 129.5, 129.7, 132.6, 133.5, 136.4, 136.7, 136.9, 138.4, 148.0, 150.6, 170.3, 170.9, 171.1, 171.6, 172.0. HRMS m/z calcd for C₄₃H₄₈N₅O₆ [M+H]⁺ 730.3599, found 730.3616.

Phenylacetyl-(*E*,3*S*,10*S*)-2-oxo-1,2,3,4,5,8,9,10-octa-hydro-1*H*-azocine-10-carbonyl-(2*S*)-(3-pyridinyl)alaninyl-(3*S*)- β -homophenylalanine (32):

Benzyl ester **38** (20 mg, 0.027 mmol) was dissolved in 1 mL of dioxane, cooled to 0°C, and treated with 2 N LiOH (1 mL). The ice bath was removed and the mixture was stirred at room temperature for 1h, when TLC showed complete disappearance of starting material. The volatiles were evaporated under reduce pressure. The resulting aqueous volume was acidified to pH 3 using 1N HCl and extracted 3 times with ethyl acetate (5 mL). The organic layers were combined, washed with brine, dried, filtered, and evaporated. The residue was purified by preparative HPLC on a C18 reverse-phase column. Freeze-drying of the collected fractions gave acid **32** (6 mg, 35%) as white powder; ¹H NMR (700 MHz, CD₃OD) δ 1.54-1.59 (m, 1H), 1.74-1.76 (m, 1H), 1.91-1.93 (m, 1H), 2.05-2.11 (m, 1H), 2.14-2.15 (m, 1H), 2.32-2.35 (m, 4H), 2.41-2.44 (m, 1H), 2.83-2.87 (m, 3H), 3.01-3.04 (m, 1H), 3.74-3.76 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H), 3.78-3.81 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H), 4.35 (s, 1H), 4.38-4.41 (m, 1H), 4.45-4.47 (m, 1H), 4.51-4.53 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H), 5.31-5.34 (m, 1H), 5.46-5.5 (m, 1H), 7.20-7.38 (m, 11H), 7.64-7.65 (m, 1H), 8.37-8.38 (m, 2H); ¹³C NMR (175 MHz, CD₃OD) δ 27.6, 29.1, 29.3, 31.4, 34.6, 37.3, 38.9, 39.5, 41.9, 53.1, 54.1, 54.3, 123.8, 126.1, 126.6, 127.7, 128.0, 128.3, 128.9, 129.1, 132.3, 133.5, 135.5, 137.8, 137.9, 146.8, 149.2, 170.4, 172.1, 173.1, 173.57, 173.59. HRMS m/z calcd for C₃₆H₄₁N₅O₆ [M+H]⁺ 640.3129, found 640.3141.

(3*S*,6*R*,7*S*,10*S*)-2-Oxo-3-*N*-(Boc)amino-6-iodo-1-azabicyclo[5.3.0]decane-10-carbonyl-(2*S*)-(3-pyridyl)alaninyl-(3*S*)- β -homophenylalanine benzyl ester (31)

Octahydroazecine **30** (150 mg, 0.21 mmol) was dissolved in 2 mL of CH₃CN, treated with NaHCO₃ (84 mg, 0.63 mmol) followed by three portions of iodine (total 253 mg, 0.63 mmol) at a rate of one portion every 2 min, stirred for 1h at room temperature, and treated with 1 M Na₂S₂O₃ until the solution became clear. The mixture was concentrated and the aqueous volume was extracted three times with DCM (5 mL). The combined organic phase was washed with brine, dried, filtered, and concentrated under reduced pressure. Purification of the residue by flash chromatography (5% isopropanol in CHCl₃) gave iodide **31** (150 mg, 94% yield) as yellow powder: R_f = 0.49 (5% isopropanol in CHCl₃); mp 110 °C; [α]_D²⁰ -55 (*c* 1.0, MeOH); ¹H NMR (700 MHz, CDCl₃) δ 1.50 (s, 9H), 1.74-1.79 (m, 2H), 1.89-1.93 (m, 1H), 1.97-2.01 (m, 2H), 2.18-2.20 (m, 1H), 2.35-2.38 (m, 1H), 2.54-2.61 (m, 3H), 2.79-2.83 (m, 1H), 2.86-2.89 (m, 1H), 2.96-2.99 (m, 1H), 3.55-3.58 (dd, *J* = 3.5, 14.3 Hz, 1H), 4.06-4.08 (m, 1H), 4.09-4.12 (m, 1H), 4.49-4.50 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H), 4.51-4.55 (m, 1H), 4.60-4.62 (m, 1H), 4.77-4.80 (m, 1H), 5.04-5.05 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H), 5.08-5.09 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H), 5.13 (s, 1H), 7.20-7.27 (m, 6H), 7.30-7.36 (m, 5H), 7.41-7.42 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H), 7.59-7.61 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.42-8.47 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H), ¹³C NMR (175 MHz, CDCl₃) δ 25.9, 27.9, 28.5, 32.8, 33.7, 34.0, 34.9, 37.8, 40.2, 48.2, 53.9, 56.7, 62.08, 63.96, 66.28, 81.6, 123.5, 126.4, 128.0, 128.30, 128.39, 128.4, 129.5, 134.0, 136.0, 136.2, 138.1, 147.9, 150.1, 156.3, 169.7, 170.4, 170.8, 171.2. HRMS *m/z* calcd for C₄₀H₄₉IN₅O₇ [M+H]⁺ 838.2671, found 838.2669.

Phenylacetyl-(3*S*,6*R*,7*S*,10*S*)-2-oxo-6-iodo-1-azabicyclo[5.3.0]decane-10-carbonyl-(2*S*)-(3-pyridyl)alaninyl-(3*S*)- β -homophenylalanine benzyl ester (39**):**

As described for the synthesis of **38** above, the Boc group was removed using HCl gas from carbamate **40** (100 mg, 0.12 mmol) in 4 mL of DCM at 0°C for 2 h to give the HCl salt. The

salt (160 mg, 0,21 mmol) was treated with phenylacetic anhydride (66mg, 0.26mmol) and triethylamine (294 μ l, 2.1mmol) in 5 mL of dichloromethane to give a residue, which was purified by flash chromatography on silica gel using 8% isopropanol in chloroform to give amide **39** (120 mg, 73%) as yellow powder: *R*_f 0.47 (10% isopropanol in chloroform); ¹H NMR (700 MHz, CD₃OD) δ 1.48-1.55 (m, 2H), 1.96-1.98 (m, 2H), 2.02-2.12 (m, 2H), 2.39-2.42 (m, 1H), 2.55-2.57 (m, 1H), 2.58-2.59 (m, 1H), 2.61-2.69 (m, 2H), 2.83-2.86 (dd, *J* = 7, 13.3 Hz, 1H), 2.87-2.90 (dd, *J* = 7, 13.3 Hz, 1H), 3.01-3.03 (dd, *J* = 3.5, 14.7 Hz, 1H), 3.58-3.60 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H), 3.73-3.76 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H), 4.14-4.16 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 4.33-4.38 (m, 4H), 4.49-4.53 (q, *J* = 7 Hz, 1H), 5.06-5.07 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 5.09-5.11 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 7.21-7.23 (m, 2H), 7.25-7.31 (m, 9H), 7.34-7.37 (m, 4H), 7.54-7.56 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.24 (s, 1H), 8.37-8.38 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 8.57 (s, 1H); ¹³C NMR (175 MHz, CD₃OD) δ 25.2, 26.9, 32.9, 33.0, 33.3, 34.8, 38.1, 39.9, 42.0, 48.1, 55.1, 56.6, 62.0, 63.7, 66.0, 123.7, 126.1, 126.8, 127.7, 128.00, 128.06, 128.09, 128.5, 129.12, 129.13, 134.7, 135.1, 136.6, 137.2, 137.8, 146.8, 146.2, 170.8, 170.9, 172.23, 172.24, 173.0. . HRMS *m/z* calcd for C₄₃H₄₇IN₅O₆ [M+H]⁺ 856.2565, found 856.2573.

Phenylacetyl-(3S,6R,7S,10S)-2-Oxo-6-iodo-1-azabicyclo[5.3.0]decane-10-carboxylate-carboxylate-(2S)-(3-pyridyl)alaninyl-(3S)- β -homophenylalanine (33): As described above for the synthesis of acid **32**, benzyl ester **39** (40 mg, 0.051 mmol) was hydrolyzed with aqueous LiOH in dioxane, and the residue was purified by preparative HPLC on a C18 reverse-phase column to give acid **33** (12 mg, 30%) as a white powder. ¹H NMR (700 MHz, CD₃OD) δ 1.50-1.56 (m, 2H), 1.96-1.99 (m, 2H), 2.03-2.13 (m, 2H), 2.41-2.44 (m, 1H), 2.46-

2.50 (dd, $J=7$, 15.75 Hz, 1H), 2.53-2.57 (d d, $J=7$, 15.75 Hz, 1H), 2.58-2.64 (m, 2H), 2.84-2.88 (dd, $J=7.7$, 14.35 Hz, 1H), 2.92-2.94 (dd, $J=5.6$, 14Hz, 1H), 3.01-3.04 (dd, $J=4.2$, 14.7 Hz, 1H), 3.72-3.74 (d, $J=14.7$ Hz, 1H), 4.18-4.19 (t, $J=6.3$ Hz, 1H), 4.31-4.34 (m, 2H), 4.35-4.37 (dd, $J=4.2$, 11.9 Hz, 1H), 4.42-4.43 (m, 2H), 4.48-4.52 (q, $J=7$ Hz, 1H), 7.19-7.23 (m, 2H), 7.26-7.31 (m, 8H), 7.53-7.54 (d, $J=7.7$ Hz, 1H), 8.23 (s, 1H), 8.36-7.37 (d, $J=4.9$ Hz, 1H), 8.49 (s, 1H); ^{13}C NMR (175 MHz, CD_3OD) δ 25.2, 27.0, 33.0, 33.1, 33.4, 35.0, 38.8, 39.7, 42.0, 48.2, 55.1, 56.6, 62.0, 63.6, 123.6, 126.0, 126.8, 127.9, 128.5, 129.11, 129.13, 134.7, 135.1, 137.3, 138.3, 146.7, 149.2, 167.9, 170.8, 172.1, 172.3, 173.0. HRMS m/z calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 766.2096, found 766.2086.

***N*-(Boc)Glyciny-(2*S*)-proline benzyl ester (**12**):**

A solution of proline benzyl ester (500 mg, 2.07 mmol) in dichloromethane (40 mL) was treated with HOBt (334 mg, 2.48 mmol) and TBTU (700 mg, 2.48 mmol), stirred for 15 min, treated with *N*-(Boc)glycine (**41**, 434 mg, 2.48 mmol), followed drop-wise by DIEA (722 μL , 4.14 mmol), and stirred at room temperature overnight. Evaporation of the volatiles gave a residue, which was purified by flash chromatography on silica gel using 1:1 hexanes/EtOAc as eluant. Evaporation of the collected fractions gave dipeptide **12** (763 mg, 98% yield) as clear oil: $R_f = 0.48$ (1:1 hexane/EtOAc); $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -80$ (c 1.0, MeOH); ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) showed a 2.75:1 mixture of prolyl amide isomers δ 1.44 (s, 9H), [1.86 (m, 4H)], 1.96-2.20 (m, 4H), 3.43-3.47 (m, 1H), 3.55-3.59 (m, 1H), [3.63 (m, 1H)], 3.88-4.01 (m, 2H), [4.42 (m, 1H)], 5.12-5.14 (d, $J=12.5$ Hz, 1H), 5.16-5.18 (d, $J=12.5$ Hz, 2H), 5.45 (s, 1H); 7.31-7.37 (m, 5H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (22.1), 24.6, 28.3, 28.9, (31.3), (42.8), 43.0, 45.8, (46.6), (58.6), 58.9, 66.9, (67.5), 79.5, 128.0, 128.3, 128.5, (128.7), (135.0), 135.7, (155.7), 155.8,

167.4, (167.6), (171.3), 171.6; HRMS m/z calcd for $C_{19}H_{27}N_2O_5$ $[M+H]^+$ 363.1914, found 362.1910.

(2R)-N-(Boc)Alaninyl-(2S)-proline benzyl ester (13): Employing the protocol described for the synthesis of dipeptide **12**, alaninyl-proline **13** was prepared from treating proline benzyl ester (500 mg, 2.07 mmol) in dichloromethane (40 mL) with HOBt (334 mg, 2.48 mmol), TBTU (700 mg, 2.48 mmol), *N*-Boc-D-alanine (18, 469 mg, 2.48 mmol), and DIEA (722 μ L, 4.14 mmol), and was purified by flash chromatography on silica gel using 40% hexane in EtOAc as eluent. Evaporation of the collected fractions gave dipeptide **13** (670 mg, 92% yield) as yellow oil: R_f 0.49 (1:1 hexane/EtOAc); $[\alpha]_D^{20}$ -25 (c 1.0, MeOH) 1H NMR (500 MHz, CD_3OD) showed a 5:1 mixture of prolyl amide isomers, δ [1.16 (d, $J = 7$ Hz, 3H)], 1.35-1.33 (d, $J = 7$ Hz, 3H), [1.43 (s, 9H)], 1.46 (s, 9H), 1.98-2.04 (m, 2H), 2.06-2.12 (m, 1H), 2.18-2.24 (m, 1H), 3.50-3.55 (m, 1H), [3.61 (m, 2H)], 3.79-3.84 (m, 1H), [4.30 (m, 3H)], 4.50-4.55 (m, 2H), [4.98 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H)], 5.14-5.16 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H), 5.21-5.23 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H), [5.28 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H)], 5.52-5.54 (d, $J = 7$ Hz, 1H), 7.33-7.38 (m, 5H); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ (18.12), 18.73, (22.4), 24.6, (28.33), 28.38, 29.0, (46.6), 46.9, (47.6), 47.9, 59.2, (59.4), 66.8, (67.3), 79.5, 128.0, 128.2, (128.4), 128.5, (128.7), 135.6, 155.0, (155.5), 171.63, 171.69; HRMS m/z calcd for $C_{20}H_{29}N_2O_5$ $[M+H]^+$ 377.2071, found 377.2070

Phenylacetyl-glycinyl-(2S)-proline benzyl ester (44a)

As described for the synthesis of **38** above, HCl gas was bubbled through a solution of carbamate **12** (1 g, 2.76 mmol) in 50 mL of DCM to give a salt. The hydrochloride (796 mg, 2.76 mmol) was treated with phenylacetic anhydride (1.4 g, 5.52 mmol) and triethylamine (3.871 mL, 27.6 mmol), and the residue obtained after evaporation was purified by flash

chromatography on silica gel using 7% MeOH in EtOAc to afford phenylacetamide **44a** (866 mg, 86%): *R_f* 0.5 (10% MeOH in EtOAc); mp 120°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -71 (*c* 1.0, MeOH); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) showed a 5.12:1 mixture of prolyl amide isomers δ 1.77 (s, 1H), [1.90 (m, 4H)], 1.98-2.04 (m, 2H), 2.17-2.24 (m, 1H), 3.45-3.49 (m, 1H), 3.57-3.64 (m, 3H), 3.96-4.00 (dd, *J* = 4.18, 18 Hz, 1H), 4.10-4.15 (dd, *J* = 4.18, 18 Hz, 1H), [4.44 (m, 1H)], 4.55-4.58 (m, 1H), 5.12-5.14 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H), 5.19-5.21 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H), 6.51 (s, 1H), 7.28-7.38 (m, 10H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (22.1), 24.5, 28.9, (31.3), (41.9), 42.1, 43.5, 45.9, (46.6), (58.6), 58.9, 67.0, (67.5), 127.3, 128.1, 128.3, 128.5, (128.6), (128.7), 128.9, 129.4, 134.5, (134.9), 135.4, 166.9, (167.1), (170.9), 171.0, (171.1), 171.5. HRMS *m/z* calcd for C₂₂H₂₅N₂O₄ [M+H]⁺ 381.1808, found 381.1802

Phenylacetyl-(2*R*)-alaninyl-(2*S*)-proline benzyl ester (44b): As described above for carbamate **13** (1g, 2.65mmol), the Boc group was removed with HCl to give white powder. The hydrochloride salt (858 mg, 2.65 mmol) was treated with phenylacetic anhydride (1.35 g, 5.31mmol) and triethylamine (3.72 mL, 26.5 mmol), and the residue after evaporation was purified by flash chromatography on silica gel using 7% MeOH in EtOAc to afford ester **44b** (916 mg, 78% yield) as white powder: *R_f* 0.45 (10% MeOH in EtOAc); mp 140 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -3.8 (*c* 1.0, MeOH); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) showed a 3:1 mixture of prolyl amide isomers δ [1.17 (m, 3H)], 1.29-1.33 (m, 3H), [1.84 (m, 2H)], 1.95-2.03 (m, 2H), 2.14-2.25 (m, 2H), 3.50-3.53 (m, 3H), 3.74-3.77 (m, 1H), 4.49-4.50 (m, 1H), 4.80-4.84 (m, 1H), 5.08-5.09 (m, 2H), 6.69-6.73 (m, 1H), [6.88 (m, 1H)], [7.27 (m, 10H)], 7.28-7.35 (m, 10H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (17.6), 18.2, (22.4), 24.6, 29.0, (31.1), (43.0), 43.5, (46.6), (46.7), 46.8, 46.9, 59.2, (59.4), 66.7, (67.3), 127.1, 128.0, 128.2, (128.3), 128.5, (128.6), 128.7, 129.2,

134.9, (134.96), (135.2), 135.6, 170.1, (170.7), 171.1, 171.5, (172.10), (172.18); HRMS m/z calcd for $C_{23}H_{27}N_2O_4$ $[M+H]^+$ 395.1965, found 395.1960.

Phenylacetyl-glycinyl-(2*S*)-prolyl-(2*S*)-3-pyridinylalaninyl-(3*S*)- β -homophenylalanine benzyl ester (46a):

A solution of phenylacetyl-glycinyl-(2*S*)-proline benzyl ester **44a** (100 mg, 0.26 mmol) in anhydrous EtOH (60 mL) and AcOH (6 mL) was treated with palladium-on-carbon (10 wt %, 30 mg) and stirred under 1 atm of hydrogen overnight. The mixture was filtered on Celite™, which was washed with hot MeOH, and the combined filtrate and washings were evaporated and freeze-dried to give acid **45a**. Phenylacetyl-glycinyl-(2*S*)-proline (**45a**, 172 mg, 0.61mmol) was dissolved in 12 mL of dichloromethane, treated with HOBt (91 mg, 0.67mmol) and TBTU (216 mg, 0.67 mmol), stirred for 10 min, treated with 3-(pyridyl)alaninyl- β -homophenylalaninyl benzyl ester hydrochloride (**37**, 230 mg, 0.56 mmol), followed drop-wise by DIEA (292 μ L, 1.68 mmol), and stirred overnight. Evaporation of the volatiles gave a residue, which was purified by flash chromatography on silica gel using 8% MeOH in EtOAc. Evaporation of the collected fractions afforded peptide **46a** (274 mg, 72%) as yellow oil: R_f 0.4 (10% MeOH in EtOAc); $[\alpha]_D^{20}$ -23.5 (c 1.0, MeOH); 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1.79-1.87 (m, 2H), 1.90-1.93 (m, 1H), 2.17-2.19 (m, 1H), 2.52-2.54 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 2.80-2.94 (m, 3H), 3.14-3.19 (dd, J = 5.2, 14 Hz, 1H), 3.30-3.37 (m, 1H), 3.40-3.45 (m, 1H), 3.67 (s, 2H), 3.76-3.81 (dd, J = 3.6, 17.2 Hz, 1H), 3.99-4.04 (dd, J = 5.6, 17.2 Hz, 1H), 4.41-4.44 (m, 1H), 4.47-4.54 (m, 2H), 5.07-5.10 (d, J = 12 Hz, 1H), 5.13-5.16 (d, J = 12 Hz, 1H), 6.79-6.82 (m, 1H), 6.94-6.95 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.14-7.15 (m, 3H), 7.22-7.28 (m, 3H), 7.34-7.37 (m, 10H), 7.30 (s, 1H), 7.51-7.54 (d t, J = 2, 2, 8 Hz, 1H), 8.35-8.36 (d, J = 2

Hz, 1H), 8.38-8.39 (dd, $J = 1.6, 4.8$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 24.7, 27.3, 33.9, 37.1, 39.9, 42.2, 43.4, 46.6, 47.6, 54.3, 60.1, 66.5, 123.7, 126.7, 127.3, 128.3, 128.4, 128.5, 128.6, 128.9, 129.3, 129.4, 133.1, 134.6, 135.6, 137.1, 137.9, 147.6, 150.3, 168.8, 169.6, 170.9, 171.3, 171.7. HRMS m/z calcd for $\text{C}_{40}\text{H}_{44}\text{N}_5\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 690.3286, found 690.3287.

Phenylacetyl-(2R)-alaninyl-(2S)-prolyl-(2S)-3-pyridinylalaninyl-(3S)- β -homophenylalanine benzyl ester (46b)

46b was prepared using the same hydrogenation and coupling procedures as described above for **46a**, employing benzyl ester **44b** (110 mg, 0.28 mmol) and palladium-on-carbon (10 wt %, 30 mg) to give the acid. Acid **45b** (187 mg, 0.61 mmol) was coupled to 3-(pyridyl)alaninyl- β -homophenylalaninyl benzyl ester hydrochloride **37** (230 mg, 0.56 mmol) using HOBt (91 mg, 0.67 mmol), TBTU (216 mg, 0.67 mmol), and DIEA (292 μL , 1.68 mmol). Purification of the residue by flash chromatography on silica gel using 8% MeOH in EtOAc afforded peptide **46b** (320 mg, 81% yield) as white powder: R_f 0.38 (10% MeOH in EtOAc); $[\alpha]_D^{20}$ -12.4 (c 1.5, MeOH); mp 70°C ; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 1.32-1.33 (d, $J = 7$ Hz, 3H), 1.37-1.46 (m, 1H), 1.77-1.83 (m, 1H), 1.92-1.97 (m, 2H), 2.53-2.62 (m, 2H), 2.76-2.81 (m, 1H) 2.85-2.90 (dd, $J = 8.5, 13.5$ Hz, 1H), 3.00-3.04 (dd, $J = 6, 14$ Hz, 1H), 3.19-3.23 (dd, $J = 6, 14.5$ Hz, 1H) 3.37-3.42 (m, 1H), 3.47-3.50 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 3.52-3.55 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 3.74-3.81 (td, $J = 3, 9$ Hz, 1H), 4.35-4.40 (m, 1H), 4.42-4.44 (m, 1H), 4.48-4.58 (m, 2H), 5.04-5.06 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H), 5.08-5.11 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H), 6.52-6.53 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H), 7.14-7.28 (m, 12H), 7.30-7.37 (m, 5H), 7.43-7.45 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.58-7.60 (d, $J = 8$ Hz, 1H), 8.42-8.43 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H), 8.47 (s, 1H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 16.1, 24.1, 28.7, 33.1, 37.6, 40.3, 42.6, 47.4, 47.9, 48.2, 54.8, 61.0, 66.4, 123.49, 126.6, 127.4, 128.1, 128.3, 128.4,

128.5, 128.9, 129.40, 129.42, 134.1, 134.2, 135.9, 136.8, 137.8, 147.5, 150.4, 170.2, 171.0, 171.1, 172.3, 172.4. HRMS m/z calcd for C₄₁H₄₆N₅O₆ [M+H]⁺ 704.3442, found 704.3446.

Phenylacetyl-glycinyl-(2S)-prolyl-(2S)-3-pyridinylalaninyl-(3S)-β-homophenylalanine (34)

34 was obtained from ester **46a** (100 mg, 0.14 mmol) by hydrogenation with palladium-on-carbon (10 wt %, 17 mg) as described above. Purification by preparative HPLC on a C18 reverse-phase column gave acid **34** (30 mg, 36% yield) as white powder: ¹H NMR (700 MHz, CD₃OD) detected a 4.5:1 mixture of prolyl amide isomers δ [1.62 (m, 2H)], 1.75-1.85 (m, 2H), 1.89-1.94 (m, 1H), 2.05-2.10 (m, 1H), [2.22 (m, 1H)], 2.44 (s, 2H), 2.85-2.86 (d, *J* = 7 Hz, 2H), 2.88-2.92 (m, 1H), 3.12-3.15 (m, 1H), 3.53-3.56 (m, 1H), 3.58-3.70 (m, 3H), 4.04 (s, 2H), 4.36-4.38 (m, 1H), 4.41-4.43 (m, 1H), 4.50-4.52 (m, 1H), [4.64 (m, 1H)], 7.20-7.36 (m, 11H), 7.69-7.72 (m, 1H), [8.20 (s, 2H)], 8.35-8.39 (m, 2H); ¹³C NMR (175 MHz, CD₃OD) δ (21.8), 24.2, 28.8, (31.8), 34.0, (34.7), 37.7, 39.7, (41.1), 41.9, 42.10, (42.15), 46.5, (46.8), 48.2, 54.0, (59.7), 60.4, 123.7, (126.0), 126.1, 126.5, (126.6), (127.9), 128.0, 128.22, (128.23), 128.9, (129.0), (129.11), 129.13, 134.0, 135.1, (135.3), 137.8, (137.9), 138.0, 146.9, 149.4, 168.5, 168.7, 170.5, (170.6), (172.1), 172.7, (172.8), 173.0. HRMS m/z calcd for C₃₃H₃₈N₅O₆ [M+H]⁺ 600.2816, found 600.2828. RP-HPLC system 1: 97%, R.T. 5.67 min. RP-HPLC system 2: 99%, R.T. 5.89 min

Phenylacetyl-(2R)-alaninyl-(2S)-prolyl-(2S)-3-pyridinylalaninyl-(3S)-β-homophenylalanine (35)

35 was synthesized using the protocol described above for **34**, employing benzyl ester **46b** (119 mg, 0.16 mmol) and palladium-on-carbon (10 wt %, 21 mg). The residue was purified by

preparative HPLC on a C18 reverse-phase column to afford **35** (41 mg, 41% yield) as white powder: ¹H NMR (700 MHz, CD₃OD) detected a 5:1 of mixture of prolyl amide isomers, δ [0.87 (d, *J* = 7 Hz, 3H)], 1.39-1.40 (d, *J* = 7 Hz, 3H), 1.44-1.48 (m, 1H), 1.71-1.74 (m, 1H), [1.78, (m, 1H)], 1.82-1.87 (m, 1H), [1.94 (m, 1H)], 2.05-2.11 (m, 1H), [2.23 (m, 1H)], [2.38 (m, 1H)], 2.44-2.52 (m, 2H), 2.69-2.73 (m, 1H), [2.83 (m, 2H)], 2.88-2.94 (m, 2H), 3.00-3.03 (dd, *J* = 4.5, 14.7 Hz, 1H), [3.10 (dd, *J* = 4.5, 14.7 Hz, 1H)], 3.46-3.49 (m, 1H), 3.55-3.62 (m, 2H), [3.65 (m, 2H)], 3.75-3.78 (m, 1H), 4.36-4.40 (m, 2H), 4.44-4.49 (m, 2H), [4.60 (d d, *J* = 4.9, 10.5 Hz, 1H)], [4.78 (dd, *J* = 2.8, 9.1 Hz, 1H)], [7.08 (m, 1H)], [7.17 (m, 5H)], 7.21-7.27 (m, 6H), 7.31-7.33 (m, 5H), 7.68-7.69 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), [8.29 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H)], 8.36-8.38 (m, 2H), [8.46 (m, 2H)]. ¹³C NMR (175 MHz, CH₃OD) δ 14.9, (15.3), (22.2), 23.8, 28.8, (31.4), 33.0, (34.9), 38.1, (38.4), 39.7, 39.9, 41.5, (41.6), (46.92), 46.99, 47.3, 48.2, (48.3), (54.1), 55.0, (66.1), 60.9, (123.6), 123.7, (126.0), 126.54, (126.56), (127.9), 128.16, (128.19), 128.8, 129.0, 129.1, (133.9), 134.6, 135.2, (135.5), 137.5, (137.8), (138.0), 138.1, 146.7, (146.9), (149.3), 149.4, (170.6), 170.9, (172.0), 172.6, 172.1, 172.7, (172.8), 173.0. HRMS *m/z* calcd for C₃₄H₄₀N₅O₆ [M+H]⁺ 614.2973, found 614.2985. RP-HPLC system 1: 99%, R.T. 7.59 min. RP-HPLC system 2: 98%, R.T. 5.40 min.

(3*S*,6*R*,7*S*,10*S*)-2-Oxo-3-*N*-(Boc)amino-6-iodo-1-azabicyclo[5.3.0]decane-10-carbonyl-(2*S*)-(3-pyridyl)alaninyl-(3*S*)-β-homophenylalanine Benzyl Ester (31) from Ester 11a:

Benzyl ester **11a** (20 mg, 0.046 mmol) was dissolved in 1 mL of dioxane, cooled to 0 °C, and treated with 2 N LiOH (2 mL). The ice bath was removed and the mixture was stirred at room temperature for 1h, when TLC showed complete disappearance of starting material *R_f* = 0.3 (40% hexane in EtOAc). The volatiles were evaporated under reduce pressure. The aqueous

volume was acidified to pH 3 using 1N HCl and extracted 3 times with ethyl acetate (10 mL). The resulting acid **17** was dissolved in 12 mL of dichloromethane treated with HOBt (7 mg, 0.05mmol) and TBTU (16 mg, 0.05 mmol), stirred for 10 min, treated with 3-(pyridyl)alaninyl- β -homophenylalaninyl benzyl ester hydrochloride **37** (18 mg, 0.055 mmol), followed drop-wise by DIEA (22 μ L, 0.13 mmol), and stirred overnight. Evaporation of the volatiles gave a residue, which was purified by flash chromatography (5% isopropanol in CHCl₃) to give peptide ester **31** (20 mg, 52% yield) as yellow powder: R_f 0.49 (5% isopropanol in CHCl₃); mp 110 °C; [α]_D²⁰ -55 (c 1.0, MeOH). The spectral data of **31** were identical to those presented above.

Ex vivo Myometrial Contraction Assay. As previously described,¹⁴ immediately after delivery, uteri from mice were dissected to provide myometrial strips (2-3 mm wide and 1-2 cm long), which were suspended in organ baths containing Krebs buffer equilibrated with 21% oxygen at 37°C with an initial tension. Spontaneous contraction peak, duration, and frequency in the absence or in presence of PGF₂ α and mimics (PDC113.824, **5** and **32-35**) were recorded with a Kent digital polygraph system.¹⁴

MAP Kinase Activation. Activation of MAP kinase by PGF₂ α was measured by conventional Western blot methods as previously described.¹⁴ Briefly, HA-FP cells in six-well plates were starved for 30 min and pretreated with 1 μ M of each ligand (PDC113.824, **5** and **32-35**) for 30 min and then challenged with PGF₂ α (0.1 or 1 μ M) for 5 min. Cells were lysed in Laemmli buffer 2 \times (250 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 0.01% bromophenol blue). Lysates were migrated on a 10% SDS-PAGE gel, transferred to nitrocellulose membrane, and probed using mouse anti-p-ERK1/2 and rabbit anti-total-

ERK1/2 antibodies. Signals were quantified by densitometry and statistical tests were performed.¹⁴

Cell Ruffling. As previously described,¹⁴ serum-starved FP cells were plated on coverslips, pretreated or not with each ligand (PDC113.824, **5** and **32-35**) for 30 min at 37°C, stimulated with 1 μ M PGF2 α for 30 min, fixed with 4% paraformaldehyde (PFA), and stained with Alexa Fluor 488 phalloidin. Nine fields (5075 cells/field) per coverslip were quantified to assess circular cellular ruffling.¹⁴

Acknowledgment

The authors thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC), March of Dimes Canada and Bill & Melinda Gates Foundation. We thank Sylvie Bilodeau, Antoine Hamel and Cedric Malveau of the Regional High-Field NMR Laboratory for their assistance and Dr. Alexandra Fürtös, Marie-Christine Tang and Karine Venne of the Université de Montréal Mass Spectrometry Facility for mass spectral analyses.

2.7 References

1. W. H. Organization, 2012.
2. C. L. Huddy, A. Johnson and P. L. Hope, *Arch .Dis. Child. Fetal. Neonatal. Ed*, 2001, **85**, F23-28.
3. X. Wang, E. J. Bowman, B. J. Bowman and J. A. Porco, Jr., *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2004, **43**, 3601-3605.
4. S. T. Vermillion and C. N. Landen, *Semin. Perinatol*, 2001, **25**, 256-262.
5. K. G. Peri, C. Quiniou, X. Hou, D. Abran, D. R. Varma, W. D. Lubell and S. Chemtob, *Semin. Perinatol*, 2002, **26**, 389-397.
6. A. Chollet, E. G. Tos and R. Cirillo, *BMC. Pregnancy. Childbirth*, 2007, **7 Suppl 1**, S16.
7. D. M. Olson, D. B. Zaragoza, M. C. Shallow, J. L. Cook, B. F. Mitchell, P. Grigsby and J. Hirst, *Placenta*, 2003, **24 Suppl A**, S47-54.
8. A. S. Butler and R. E. Behrman, *Preterm Birth:: Causes, Consequences, and Prevention*, National Academies Press, 2007.
9. S. Beck, D. Wojdyla, L. Say, A. P. Betran, M. Merialdi, J. H. Requejo, C. Rubens, R. Menon and L. P. F. A. Van, *Bull. World. Health. Organ*, 2010, **88**, 31-38.
10. Z. Liang, S. R. Sooranna, N. Engineer, M. Tattersall, S. Khanjani, P. R. Bennett, L. Myatt and M. R. Johnson, *Mol. Hum. Reprod.*, 2008, **14**, 215-223.
11. R. Romero, H. Munoz, R. Gomez, M. parra, M. Polanco, V. valverde, J. Hasbun, J. Garrido, F. Ghezzi and a. et, *Prostaglandins. Leukotrienes. Essent. Fatty. Acids*, 1996, **54**, 187-191.

12. M. A. Mirando, B. C. Prince, K. A. Tysseling, K. G. Carnahan, T. E. Ludwig, T. A. Hoagland and R. C. Crain, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1995, **395**, 421-433.
13. Y. Sugimoto, A. Yamasaki, E. Segi, K. Tsuboi, Y. Aze, T. Nishimura, H. Oida, N. Yoshida, T. Tanaka, M. Katsuyama, K. Hasumoto, T. Murata, M. Hirata, F. Ushikubi, M. Negishi, A. Ichikawa and S. Narumiya, *Science*, 1997, **277**, 681-683.
14. E. Goupil, D. Tassy, C. Bourguet, C. Quiniou, V. Wischard, D. Pétrin, C. Le Gouill, D. Devost, H. H. Zingg and M. Bouvier, *J. Biol. Chem.*, 2010, **285**, 25624-25636.
15. C. B. Bourguet, E. Goupil, D. Tassy, X. Hou, E. Thouin, F. Polyak, T. E. Hébert, A. Claing, S. A. Laporte and S. Chemtob, *J. med. chem.*, 2011, **54**, 6085-6097.
16. C. B. Bourguet, A. Claing, S. A. Laporte, T. E. Hébert, S. Chemtob and W. D. Lubell, *Can. J. Chem.*, 2014, **92**, 1031-1040.
17. H.-G. Lombart and W. D. Lubell, *J. Org. Chem.*, 1996, **61**, 9437-9446.
18. Y. Takeuchi and G. R. Marshall, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 5363-5372.
19. M. Thormann and H.-J. Hofmann, *J. Mol. Struct.: THEOCHEM*, 1999, **469**, 63-76.
20. F. Andre, G. Boussard, D. Bayeul, C. Didierjean, A. Aubry and M. Marraud, *J. Pept. Res.*, 1997, **49**, 556-562.
21. F. André, G. Boussard, D. Bayeul, C. Didierjean, A. Aubry and M. Marraud, *J. pep. research*, 1997, **49**, 556-562.
22. B. E. Fink, P. R. Kym and J. A. Katzenellenbogen, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 4334-4344.
23. S. Surprenant and W. D. Lubell, *Org. Lett.*, 2006, **8**, 2851-2854.
24. C. M. K. Nair and M. Vijayan, *J. Indian. Inst. Sci.*, 1981, **63**, 81-103.
25. C. M. Venkatachalam, *Biopolymers*, 1968, **6**, 1425-1436.

26. B. E. Fink, P. R. Kym and J. A. Katzenellenbogen, *J. A. Chem. S*, 1998, **120**, 4334-4344.
27. W. D. Lubell, K. S. Beauregard and F. Polyak, 2012.
28. N. D. P. Atmuri and W. D. Lubell, *J. Org. Chem.*, 2015, Ahead of Print.
29. A. Rodriguez, D. D. Miller and R. F. W. Jackson, *Org. Biomol. Chem.*, 2003, **1**, 973-977.
30. T. A. Godina and W. D. Lubell, *J. Org. Chem*, 2011, **76**, 5846-5849.
31. W. C. Still, M. Kahn and A. Mitra, *J. Org. Chem*, 1978, **43**, 2923-2925.

Chapitre 3. Conclusion

Conclusion

Dans le but d'étudier la nature du tour β nécessaire pour la modulation du récepteur de la prostaglandine F2 α , quatre analogues du PDC113.824 ont été synthétisés. Une nouvelle méthodologie de synthèse a permis d'obtenir l'azabicyclo[5.3.0]alkanone **33** et le dipeptide macrocyclique **32**, des mimes peptidiques du tour β type I à partir d'un seul intermédiaire (le térapeptide **30** obtenu par un couplage du dipeptide macrocyclique lactame **10** et la pyridylalanine- β -homophenylalanine benzyl ester **37**). Une cyclisation transannulaire diastéréosélective du térapeptide **30** a permis d'obtenir un seul diastéréoisomère de l'azabicyclo[5.3.0]alkanone **31** avec un rendement quantitatif. La stéréochimie du bicyclic **31** a été confirmée par le couplage de l'azabicyclo[5.3.0]alkanone **11** (préalablement synthétisé par cyclisation transannulaire de la lactame macrocyclique **10**) avec la pyridylalanine- β -homophenylalanine benzyl ester **37**.

Les études structure activité des analogues synthétisés, sur les contractions utérines de souris *ex vivo* et *in vitro*, permettent de conclure que le tour β type I ne présente pas les pharmacophores, dans la disposition requise, pour la reconnaissance sur le récepteur de la prostaglandine F2 α . En effet, les analogues qui miment le tour β de type I ne présentent aucune activité sur les contractions utérines *ex vivo* ni *in vitro*. Ainsi, en éliminant l'hypothèse de l'implication du tour β type I dans l'interaction avec le récepteur, on peut conclure que le tour β de type II' est un élément essentiel pour l'activité du PDC113.824, notamment pour les dérivés aza-amino acyl-proline, susceptibles d'adopter un tour β de type I ou II'. Cette étude démontre que ces analogues adoptent un tour β de type II' plutôt qu'un tour β de type I lors de l'interaction avec le récepteur. De plus, le tour β du type II' où les valeurs des angles dièdres

s'apparentent aux angles de lindolizidine-2-one est plus efficace pour la modulation du récepteur par rapport à un tour naturel, tel que l'analogue D-Ala-Pro **35**.

Un travail réalisé dans notre laboratoire sur les dérivés aza-Gly-Pro **5**, avait montré l'utilité de la diversification de la chaîne latérale sur l'aza-peptide. L'alkylation du résidu aza-Gly a donné accès à l'aza-(propargyl)Gly-Pro **6** et l'aza-Phe-Pro ^{42, 45}, analogues qui présentent des qualités inhibitrices similaires au PDC113.824 . Au cours de cette étude, l'analogue D-Ala-Pro **35** a montré une bonne activité inhibitrice des contractions utérines des souris *ex vivo* à 10 μ M. Il serait donc intéressant d'explorer les analogues où le D-Ala serait remplacé par d'autres D acides aminés afin de préparer une nouvelle génération de mimes peptidiques moins coûteux et facilement accessibles, comparés aux mimes peptidiques préalablement développés. En se basant sur résultats obtenus pour les dérivés aza et dans la perspective d'améliorer l'activité des dérivés de la D-Ala-Pro **35**, le D-Phe-Pro comme analogue de l'aza-Phe-Pro **7** pourrait être synthétisé et testé pour évaluer sa capacité inhibitrice. Selon l'activité biologique observée pour cet analogue, nous pouvons aussi envisager d'introduire la D-histidine dans le mime peptidique pour reproduire la chaîne latérale du PDC113.31.

De plus, dans le but d'identifier le site de liaison allostérique sur le récepteur, plusieurs stratégies sont en cours de développement dans notre laboratoire, notamment l'utilisation d'analogues photosensibles dans des essais de marquage par photoaffinité. Ces ligands contiendront dans leurs séquences un groupement photosensible (e.g., le benzophénone), ils doivent avoir une bonne affinité pour le récepteur afin de former un bon complexe ligand-récepteur non-réversible. Sous irradiation le complexe photomarké est récupéré pour subir un clivage enzymatique ou chimique, les fragments obtenus seront ensuite analysés par

spectrométrie, ainsi la masse du fragment photomarcué sera identifiée. Finalement un séquençage nous permettra de déterminer spécifiquement la nature du fragment photomarcué. Par des approches similaires le fragment actif peut être identifié en utilisant la biotine ou le marquage radioactif par l'iode I^{125} . Lors de l'utilisation de l'iode la présence d'un résidu tyrosine ou histidine sur le ligand est nécessaire. Dans cette optique le mème peptidique D-His-Pro (analogue de la D-Ala-Pro) sera un bon candidat s'il montre une bonne affinité pour le récepteur.

Pour conclure, ces travaux viennent ajouter une information utile et pertinente dans la conception et le design d'agents tocolytiques et dans la compréhension des interactions ligand-récepteur. Dans la recherche de nouveaux agents tocolytiques, le tour β de type II' est un élément significatif qui doit être considéré lors du développement de mimes peptidiques afin de maintenir et améliorer l'activité biologique.

Bibliographie

1. Organization, W. H., Born too soon: the global action report on preterm birth. **2012**.
2. Moutquin, J.-M., Classification and heterogeneity of preterm birth. *BJOG*. **2003**, 110 Suppl 20, 30-3.
3. Marlow, N.; Wolke, D.; Bracewell, M. A.; Samara, M.; Costeloe, K.; Gibson, A. T.; Hennessy, E. M.; Marlow, N.; Wilkinson, A. R.; Wolke, D.; Bracewell, M.; Cruwys, M.; MacGregor, R.; McDonald, L.; Morton, M.; Morris, M.; Thomas, S.; Luck, E.; Bamford, C.; Betteridge, H.; Bruhn, H.; Johnson, S.; Magiati, I.; Morahan, M.; Tsverik, I.; Samara, M.; Palmer, H., Neurologic and developmental disability at six years of age after extremely preterm birth. *N. Engl. J. Med.* **2005**, 352, 9-19.
4. Tomashek, K. M.; Shapiro-Mendoza, C. K.; Davidoff, M. J.; Petrini, J. R., Differences in mortality between late-preterm and term singleton infants in the United States, 1995-2002. *J. Pediatr.* **2007**, 151, 450-6, 456.e1.
5. Rich-Edwards, J. W.; Stampfer, M. J.; Manson, J. E.; Rosner, B.; Hankinson, S. E.; Colditz, G. A.; Willett, W. C.; Hennekens, C. H., Birth weight and risk of cardiovascular disease in a cohort of women followed up since 1976. *B. M. J.* **1997**, 315, 396-400.
6. Butler, A. S.; Behrman, R. E., *Preterm Birth:: Causes, Consequences, and Prevention*. National Academies Press: 2007.
7. Spong, C. Y., Prediction and prevention of recurrent spontaneous preterm birth. *Obstet. Gynecol.* **2007**, 110, 405-15.
8. Petrou, S.; Eddama, O.; Mangham, L., A structured review of the recent literature on the economic consequences of preterm birth. *Arch. Dis. Child. Fetal. Neonatal. Ed.* **2011**, 96, F225-32.

9. Beck, S.; Wojdyla, D.; Say, L.; Betran, A. P.; Merialdi, M.; Requejo, J. H.; Rubens, C.; Menon, R.; Van, L. P. F. A., The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. *Bull. World. Health. Organ.* **2010**, 88, 31-8.
10. Mangham, L. J.; Petrou, S.; Doyle, L. W.; Draper, E. S.; Marlow, N., The cost of preterm birth throughout childhood in England and Wales. *Pediatrics.* **2009**, 123, e312-27.
11. Bos, C. L.; Richel, D. J.; Ritsema, T.; Peppelenbosch, M. P.; Versteeg, H. H., Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2004**, 36, 1187-1205.
12. Jensen, D. V.; Andersen, K. B.; Wagner, G., Prostaglandins in the menstrual cycle of women. *DMB. Dan. Med. Bull.* **1987**, 34, 178-82.
13. Baldwin, J. M., The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO. J.* **1993**, 12, 1693-703.
14. Karim, S. M.; Devlin, J., Prostaglandin content of amniotic fluid during pregnancy and labour. *J. Obstet. Gynaecol. Br. Commonw.* **1967**, 74, 230-4.
15. Romero, R.; Munoz, H.; Gomez, R.; parra, M.; Polanco, M.; valverde, V.; Hasbun, J.; Garrido, J.; Ghezzi, F.; et, a., Increase in prostaglandin bioavailability precedes the onset of human parturition. *Prostaglandins. Leukotrienes. Essent. Fatty. Acids.* **1996**, 54, 187-91.
16. Wray, S., Uterine contraction and physiological mechanisms of modulation. *Am. J. Physiol.* **1993**, 264, C1-C18.
17. Sugimoto, Y.; Yamasaki, A.; Segi, E.; Tsuboi, K.; Aze, Y.; Nishimura, T.; Oida, H.; Yoshida, N.; Tanaka, T.; Katsuyama, M.; Hasumoto, K.; Murata, T.; Hirata, M.; Ushikubi, F.; Negishi, M.; Ichikawa, A.; Narumiya, S., Failure of parturition in mice lacking the prostaglandin F receptor. *Science.* **1997**, 277, 681-3.

18. Horton, E. W.; Poyser, N. L., Uterine luteolytic hormone: a physiological role for prostaglandin F_{2α}. *Physiol. Rev.* **1976**, 56, 595-651.
19. Chen, D.-B.; Westfall, S. D.; Fong, H. W.; Roberson, M. S.; Davis, J. S., Prostaglandin F_{2α} stimulates the Raf/MEK1/mitogen-activated protein kinase signaling cascade in bovine luteal cells. *Endocrinology.* **1998**, 139, 3876-3885.
20. Davis, J. S.; Weakland, L. L.; Weiland, D. A.; Farese, R. V.; West, L. A., Prostaglandin F_{2α} stimulates phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis and mobilizes intracellular calcium in bovine luteal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, 84, 3728-32.
21. Al-Matubsi, H. Y.; Eis, A. L. W.; Brodt-Eppley, J.; MacPhee, D. J.; Lye, S.; Myatt, L., Expression and localization of the contractile prostaglandin F receptor in pregnant rat myometrium in late gestation, labor, and postpartum. *Biol. Reprod.* **2001**, 65, 1029-1037.
22. Fujino, H.; Srinivasan, D.; Regan, J. W., Cellular conditioning and activation of β-catenin signaling by the FPB prostanoid receptor. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 48786-48795.
23. Goupil, E.; Tassy, D.; Bourguet, C.; Quiniou, C.; Wisheart, V.; Petrin, D.; Le Guill, C.; Devost, D.; Zingg, H. H.; Bouvier, M.; Saragovi, H. U.; Chemtob, S.; Lubell, W. D.; Claing, A.; Hebert, T. E.; Laporte, S. A., A Novel Biased Allosteric Compound Inhibitor of Parturition Selectively Impedes the Prostaglandin F_{2α}-mediated Rho/ROCK Signaling Pathway. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285, 25624-25636.
24. Woyton, J.; Zimmer, M.; Fuchs, T., The use of Gynipral (hexoprenaline) in suppression of uterus contractions. *Ginek. Pol.* **1999**, 70, 896-900.
25. Landau, R.; Morales, M. A.; Antonarakis, S. E.; Blouin, J.-L.; Smiley, R. M., Arg16 homozygosity of the β₂-adrenergic receptor improves the outcome after β₂-agonist tocolysis for preterm labor. *Clin. Pharmacol. Ther. (N. Y., NY, U. S.).* **2005**, 78, 656-663.

26. Tsatsaris, V.; Carbonne, B.; Cabrol, D., Atosiban for preterm labor. *Drugs*. **2004**, 64, 375-382.
27. Juon, A.-M.; Nikolaus Kuehn-Velten, W.; Burkhardt, T.; Krahenmann, F.; Zimmermann, R.; von Mandach, U., Nifedipine gastrointestinal therapeutic system (GITS) as an alternative to slow-release for tocolysis-Tolerance and pharmacokinetic profile. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2008**, 140, 27-32.
28. Benini, D.; Fanos, V.; Cuzzolin, L.; Tato, L., In utero exposure to nonsteroidal anti-inflammatory drugs: neonatal renal failure. *Pediatr. Nephrol.* **2004**, 19, 232-4.
29. Rozenberg, P., Tocolysis, use of beta-sympatomimetics for threatening preterm delivery: a critical review. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod (Paris)*. **2001**, 30, 221-30.
30. Pathe-Neuschafer-Rube, A.; Neuschafer-Rube, F.; Puschel, G. P., Role of the ERC motif in the proximal part of the second intracellular loop and the C-terminal domain of the human prostaglandin F2alpha receptor (hFP-R) in G-protein coupling control. *Biochem. J.* **2005**, 388, 317-24.
31. Shi, L.; Javitch, J. A., The binding site of aminergic G protein-coupled receptors: the transmembrane segments and second extracellular loop. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2002**, 42, 437-467.
32. Kristiansen, K., Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacology & therapeutics* **2004**, 103, 21-80.

33. Peeters, M. C.; van Westen, G. J. P.; Li, Q.; Ijzerman, A. P., Importance of the extracellular loops in G protein-coupled receptors for ligand recognition and receptor activation. *Trends. Pharmacol. Sci.* **2011**, *32*, 35-42.
34. Peri, K. G.; Quiniou, C.; Hou, X.; Abran, D.; Varma, D. R.; Lubell, W. D.; Chemtob, S., THG113: a novel selective FP antagonist that delays preterm labor. *Semin. Perinatol.* **2002**, *26*, 389-97.
35. Peri, K. G.; Polyak, F.; Lubell, W.; Thouin, E.; Chemtob, S. Peptides and peptidomimetics useful for inhibiting the activity of prostaglandin F₂ α receptor. WO2003104266A2, 2003.
36. Hirst, J. J.; Parkington, H. C.; Young, I. R.; Palliser, H. K.; Peri, K. G.; Olson, D. M., Delay of preterm birth in sheep by THG113.31, a prostaglandin F₂ α receptor antagonist. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2005**, *193*, 256-266.
37. Biggers, J. D.; Curnow, R. N.; Finn, C. A.; McLaren, A., REGULATION OF THE GESTATION PERIOD IN MICE. *J. Reprod. Fertil.* **1963**, *6*, 125-38.
38. Bottcher, B.; Wildt, L.; Laterza, R. M.; Seufert, R. J.; Buhling, K. J.; Singer, C. F.; Hill, W.; Griffin, P.; Jilma, B.; Schulz, M.; Smith, R. P., A first-in-human study of PDC31 (prostaglandin F₂ α receptor inhibitor) in primary dysmenorrhea. *Hum. Reprod.* **2014**, *29*, 2465-73.
39. Coy, D. H.; Heinz-Erian, P.; Jiang, N. Y.; Sasaki, Y.; Taylor, J.; Moreau, J. P.; Wolfrey, W. T.; Gardner, J. D.; Jensen, R. T., Probing peptide backbone function in bombesin. A reduced peptide bond analog with potent and specific receptor antagonist activity. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 5056-60.

40. Hanessian, S.; McNaughton-Smith, G.; Lombart, H.-G.; Lubell, W. D., Design and synthesis of conformationally constrained amino acids as versatile scaffolds and peptide mimetics. *Tetrahedron*. **1997**, *53*, 12789-12854.
41. Lombart, H.-G.; Lubell, W. D., Rigid Dipeptide Mimetics: Efficient Synthesis of Enantiopure Indolizidinone Amino Acids. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9437-9446.
42. Bourguet, C. B.; Goupil, E.; Tassy, D.; Hou, X.; Thouin, E.; Polyak, F.; Hebert, T. E.; Claing, A.; Laporte, S. A.; Chemtob, S.; Lubell, W. D., Targeting the Prostaglandin F_{2α} Receptor for Preventing Preterm Labor with Azapeptide Tocolytics. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 6085-6097.
43. Gosselin, F.; Lubell, W. D., Rigid Dipeptide Surrogates: Syntheses of Enantiopure Quinolizidinone and Pyrroloazepinone Amino Acids from a Common Diaminodicarboxylate Precursor. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 2163-2171.
44. Takeuchi, Y.; Marshall, G. R., Conformational Analysis of Reverse-Turn Constraints by N-Methylation and N-Hydroxylation of Amide Bonds in Peptides and Non-Peptide Mimetics. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5363-5372.
45. Bourguet, C. B.; Sabatino, D.; Lubell, W. D., Benzophenone semicarbazone protection strategy for synthesis of aza-glycine containing aza-peptides. *Biopolymers*. **2008**, *90*, 824-831.
46. Proulx, C.; Sabatino, D.; Hopewell, R.; Spiegel, J.; Garcia Ramos, Y.; Lubell, W. D., Azapeptides and their therapeutic potential. *Future. Med. Chem.* **2011**, *3*, 1139-1164.
47. Andre, F.; Boussard, G.; Bayeul, D.; Didierjean, C.; Aubry, A.; Marraud, M., Aza-peptides. II. X-ray structures of aza-alanine and aza-asparagine-containing peptides. *J. Pept. Res.* **1997**, *49*, 556-562.

48. Lee, H. J.; Ahn, I. A.; Ro, S.; Choi, K. H.; Choi, Y. S.; Lee, K. B., Role of azaamino acid residue in β -turn formation and stability in designed peptide. *J. Pept. Res.* **2000**, 56, 35-46.
49. Thormann, M.; Hofmann, H.-J., Conformational properties of azapeptides. *J. Mol. Struct.: THEOCHEM* **1999**, 469, 63-76.
50. Fink, B. E.; Kym, P. R.; Katzenellenbogen, J. A., Design, Synthesis, and Conformational Analysis of a Proposed Type I β -Turn Mimic. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 4334-4344.
51. Surprenant, S.; Lubell, W. D., From Macrocyclic Dipeptide Lactams To Azabicyclo[X.Y.0]alkanone Amino Acids: A Transannular Cyclization Route for Peptide Mimic Synthesis. *Org. Lett.* **2006**, 8, 2851-2854.
52. Nair, C. M. K.; Vijayan, M., Structural characteristics of prolyl residues - a review. *J. Indian Inst. Sci.* **1981**, 63, 81-103.
53. Lubell, W. D.; Beauregard, K. S.; Polyak, F. Peptides and chirality effects on the conformation and the synthesis of medically relevant peptides. 2012; Elsevier B.V.: 2012; Vol. 1; pp 86-104.
54. Kaul, R.; Surprenant, S.; Lubell, W. D., Systematic Study of the Synthesis of Macrocyclic Dipeptide β -Turn Mimics Possessing 8-, 9-, and 10- Membered Rings by Ring-Closing Metathesis. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 3838-3844.
55. Godina, T. A.; Lubell, W. D., Mimics of peptide turn backbone and side-chain geometry by a general approach for modifying azabicyclo[5.3.0]alkanone amino acids. *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 5846-5849.

56. Vlieghe, P.; Lisowski, V.; Martinez, J.; Khrestchatisky, M., Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug. Discovery. Today*. **2010**, 15, 40-56.
57. Marshall, G. R., A hierarchical approach to peptidomimetic design. *Tetrahedron*. **1993**, 49, 3547-58.
58. Zalkin, A.; Forrester, J. D.; Templeton, D. H., Ferrichrome-A tetrahydrate. Determination of crystal and molecular structure. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 1810-14.
59. Lewis, P. N.; Momany, F. A.; Scheraga, H. A., Chain reversals in proteins. *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct.* **1973**, 303, 211-29.
60. Venkatachalam, C. M., Stereochemical criteria for polypeptides and proteins. V. Conformation of a system of three linked peptide units. *Biopolymers*. **1968**, 6, 1425-36.
61. Rose, G. D.; Gierasch, L. M.; Smith, J. A., Turns in peptides and proteins. *Adv. Protein Chem.* **1985**, 37, 1-109.
62. Hinds, M. G.; Richards, N. G. J.; Robinson, J. A., Design and synthesis of a novel peptide β -turn mimetic. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1988**, 1447-9.
63. Freidinger, R. M.; Veber, D. F.; Perlow, D. S.; Brooks, J. R.; Saperstein, R., Bioactive conformation of luteinizing hormone-releasing hormone: evidence from a conformationally constrained analog. *Science (Washington, D. C.)*. **1980**, 210, 656-8.
64. Freidinger, R. M.; Perlow, D. S.; Veber, D. F., Protected lactam-bridged dipeptides for use as conformational constraints in peptides. *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 104-9.
65. Pellegrini, M.; Weitz, I. S.; Chorev, M.; Mierke, D. F., A Trisubstituted 1,4-Diazepin-3-one-Based Dipeptidomimetic: Conformational Characterization by NMR and Computer Simulation. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 2430-2436.

66. Cluzeau, J.; Lubell, W. D., Design, synthesis, and application of azabicyclo[X.Y.O]alkanone amino acids as constrained dipeptide surrogates and peptide mimics. *Biopolymers*. **2005**, 80, 98-150.
67. Hanessian, S.; Balaux, E.; Musil, D.; Olsson, L.-L.; Nilsson, I., Exploring the chiral space within the active site of α -thrombin with a constrained mimic of D-Phe-Pro-Arg - design, synthesis, inhibitory activity, and x-ray structure of an enzyme-inhibitor complex. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10, 243-247.
68. Karanewsky, D. S.; Bai, X.; Linton, S. D.; Krebs, J. F.; Wu, J.; Pham, B.; Tomaselli, K. J., Conformationally constrained inhibitors of caspase-1 (interleukin-1 β converting enzyme) and of the human CED-3 homolog caspase-3 (CPP32, apopain). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 2757-2762.
69. Ding, X.; Vera, M. D.; Liang, B.; Zhao, Y.; Leonard, M. S.; Joullie, M. M., Structure-activity relationships of side-chain modified didemnins. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 231-234.
70. Davies, S. J.; Ayscough, A. P.; Beckett, R. P.; Bragg, R. A.; Clements, J. M.; Doel, S.; Grew, C.; Launchbury, S. B.; Perkins, G. M.; Pratt, L. M.; Smith, H. K.; Spavold, Z. M.; Thomas, S. W.; Todd, R. S.; Whittaker, M., Structure-activity relationships of the peptide deformylase inhibitor BB-3497: modification of the methylene spacer and the P1' side chain. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 2709-2713.
71. Orikasa, Y.; Ichinohe, K.; Saito, J.; Hashimoto, S.; Matsumoto, K. i.; Ooi, T.; Taguchi, S., The hydrophobicity in a chemically modified side-chain of cysteine residues of thanatin is related to antimicrobial activity against *Micrococcus luteus*. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2009**, 73, 1683-1684.

72. Jiao, D.; Russell, K. C.; Hruby, V. J., Locally constrained tyrosine analogs with restricted side-chain dynamics. *Tetrahedron*. **1993**, 49, 3511-20.
73. Ma, B.; Zha, H.-Y.; Li, N.; Yang, D.; Lin, G., Effect of Structural Modification of α -Aminoxy Peptides on Their Intestinal Absorption and Transport Mechanism. *Mol. Pharmaceutics*. **2011**, 8, 1073-1082.
74. Okura, K.; Matsuoka, S.; Goto, R.; Inoue, M., The Twisted Side Chain of Antillatoxin is Important for Potent Toxicity: Total Synthesis and Biological Evaluation of Antillatoxin and Analogues. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, 49, 329-332, S329/1-S329/67.
75. Vagner, J.; Qu, H.; Hruby, V. J., Peptidomimetics, a synthetic tool of drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, 12, 292-296.
76. Friedman, H. L., Influence of isosteric replacements upon biological activity. *Natl. Research Council, Natl. Acad. Sci., Washington, D.C., Chem.- Biol. Coordination Center, Pub.* **1950**, 9, 295-358.
77. Alagona, G.; Ghio, C.; Pratesi, C., Force field parameters for molecular mechanical simulation of dehydroamino acid residues. *J. Comput. Chem.* **1991**, 12, 934-42.
78. Grison, C.; Coutrot, P.; Geneve, S.; Didierjean, C.; Marraud, M., Structural Investigation of "cis" and "trans" Vinylogous Peptides: cis-Vinylog Turn in Folded cis-Vinylogous Peptides, an Excellent Mimic of the Natural β -Turn. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 10753-10764.
79. Moree, W. J.; Van Gent, L. C.; Van der Marel, G. A.; Liskamp, R. M. J., Synthesis of peptides containing a sulfinamide or a sulfonamide transition-state isostere. *Tetrahedron*. **1993**, 49, 1133-50.

80. Gante, J., Peptide mimetics - tailor-made enzyme inhibitors. *Angew. Chem.* **1994**, 106, 1780-802, (See also *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1994, 33(17), 1699-720).

Annexe : Données spectrales et profils HPLC

Supporting information

for

Investigation of the Active Turn Geometry for the Labour Delaying Activity of Indolizidinone and Azapeptide Modulators of the Prostaglandin F2 α Receptor.

Meriem K. Boukanoun,^a Xin Hou,^b Ljiljana Nikolajev,^c Sara Ratni,^d David Olson,^e Audrey Claing,^d Stéphane A. Laporte,^c Sylvain Chemtob,^b and William D. Lubell^a

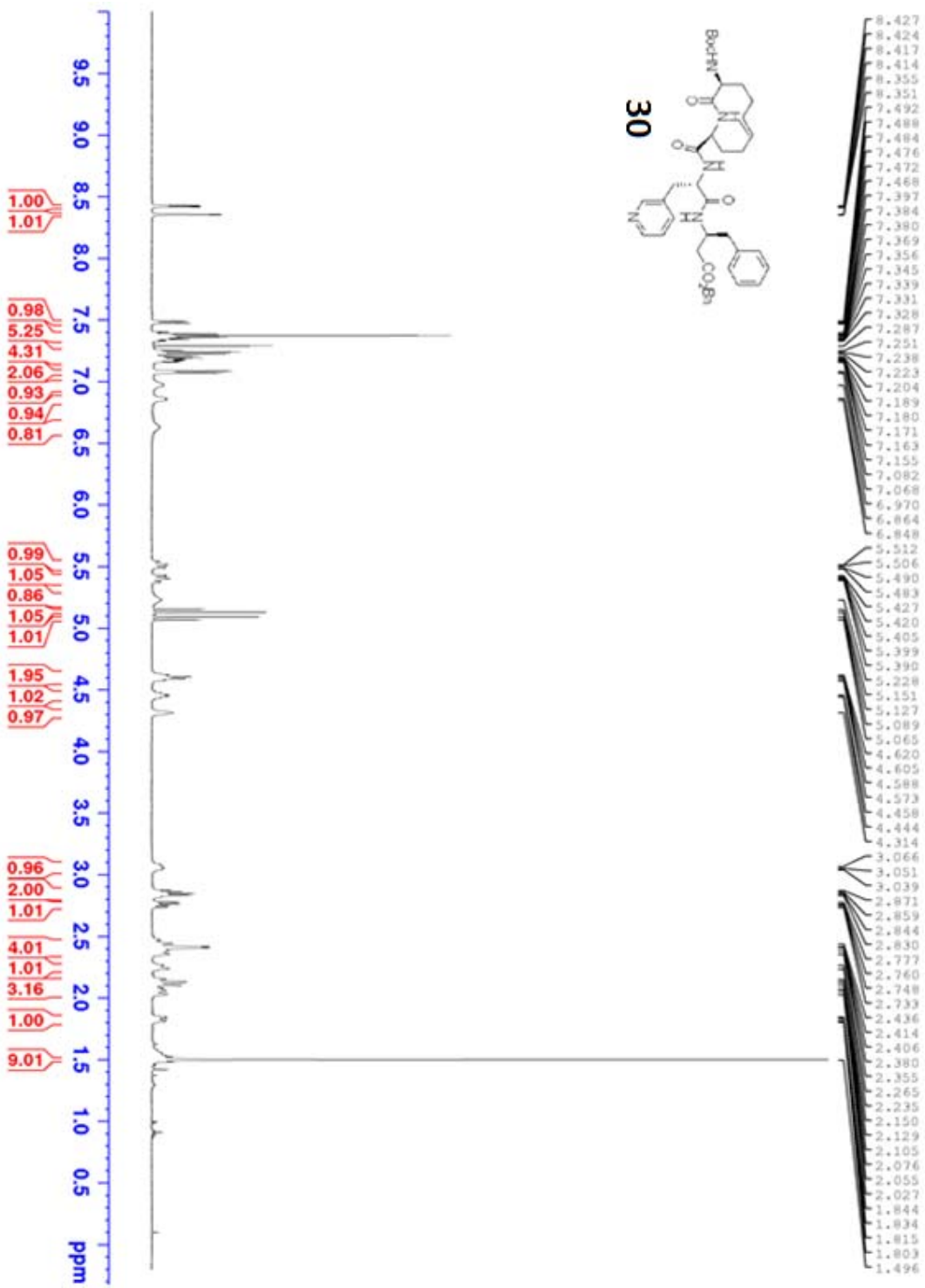
Départements de ^dpharmacologie et ^achimie, l'Université de Montréal, Montréal H3C 3J7,

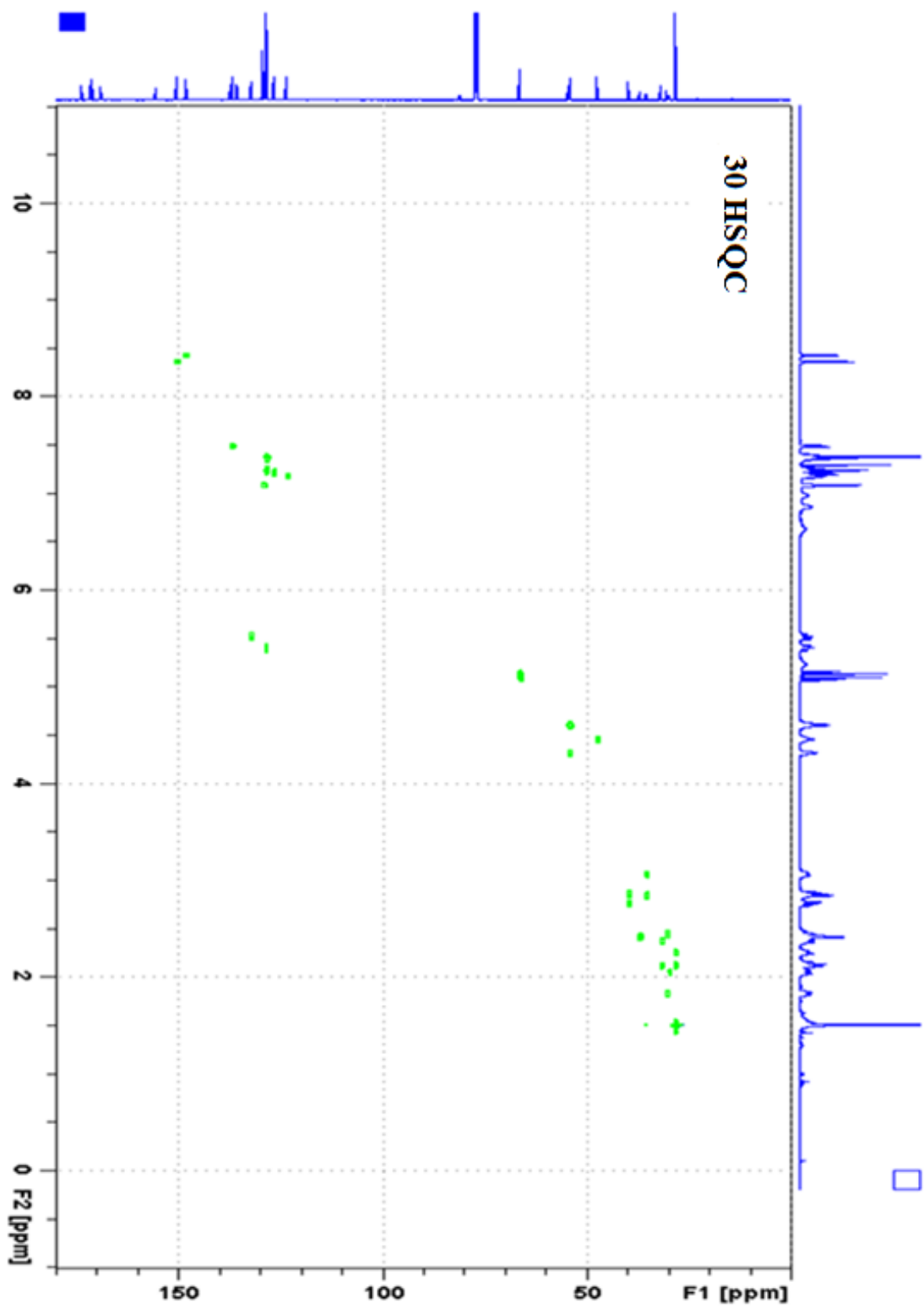
^bCentre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine Research Center, Montréal H3T 1C5,

^eDepartment of Medicine, McGill University Health Center Research Institute, Montréal

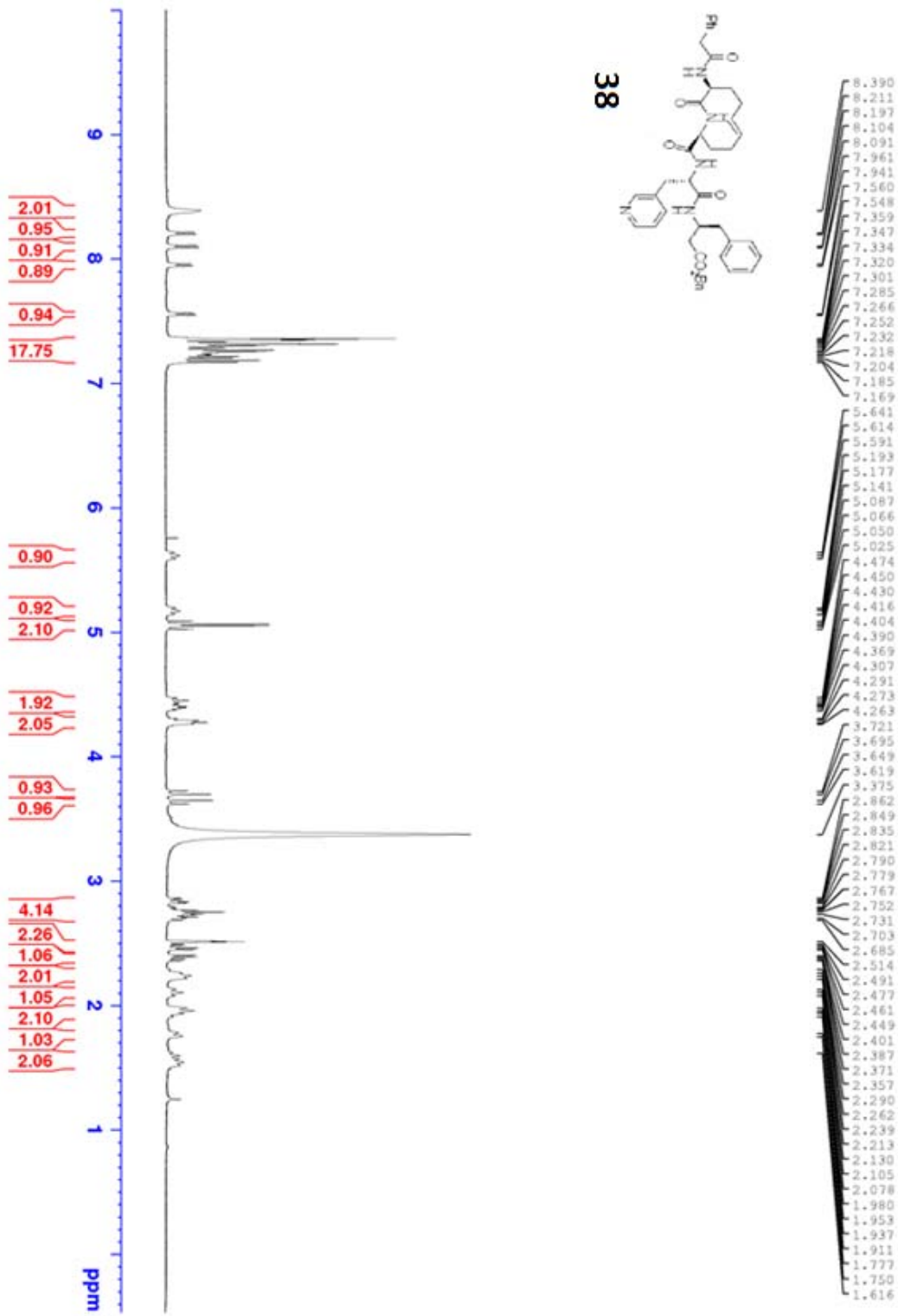
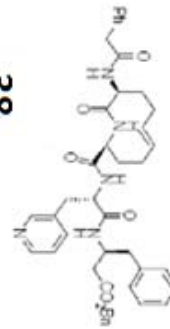
H3A 1A1, and ^eDepartments of Obstetrics & Gynecology, Pediatrics and Physiology

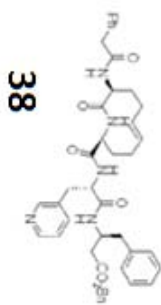
University of Alberta Edmonton, Alberta T6G2S2 Canada





38





172.70
171.70
171.07
170.00
170.00

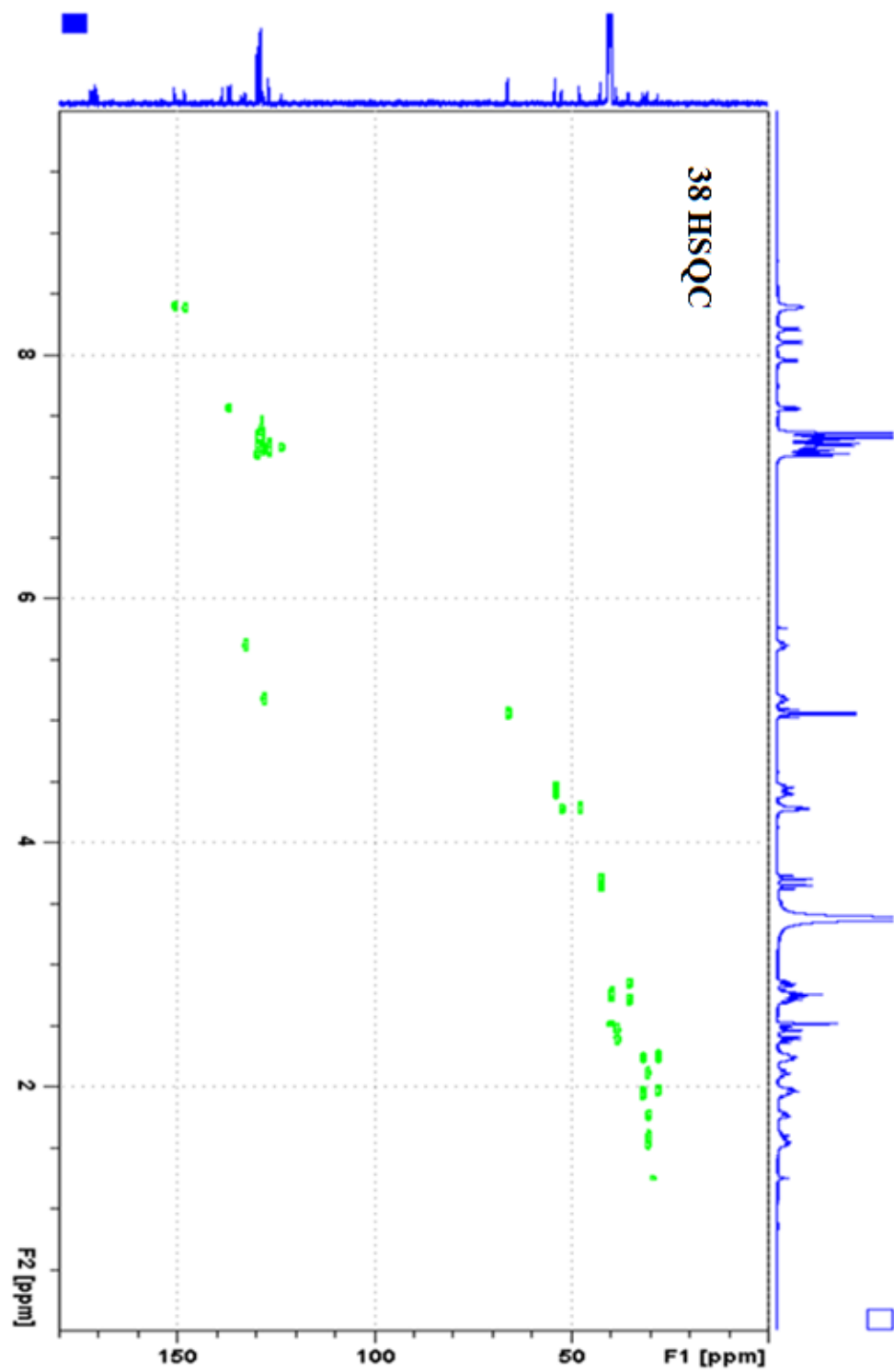
151.01
149.57
148.89
148.78
148.76
148.05
147.54
147.47
132.67
132.74
132.94
132.94
132.94
132.94
132.94
132.94
132.94
132.94
132.94
132.94
132.94
132.94
132.94
132.94
132.94

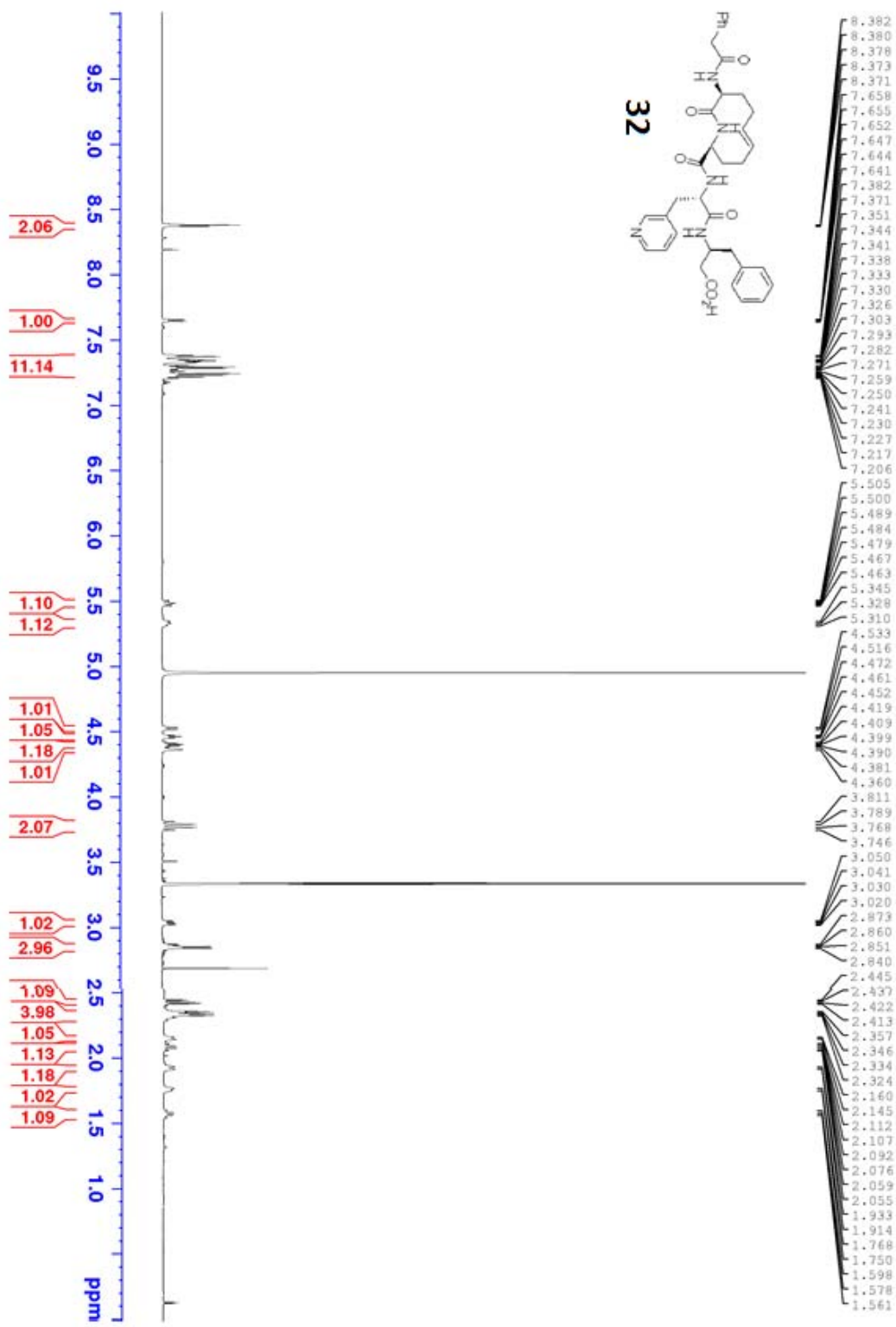
11.99

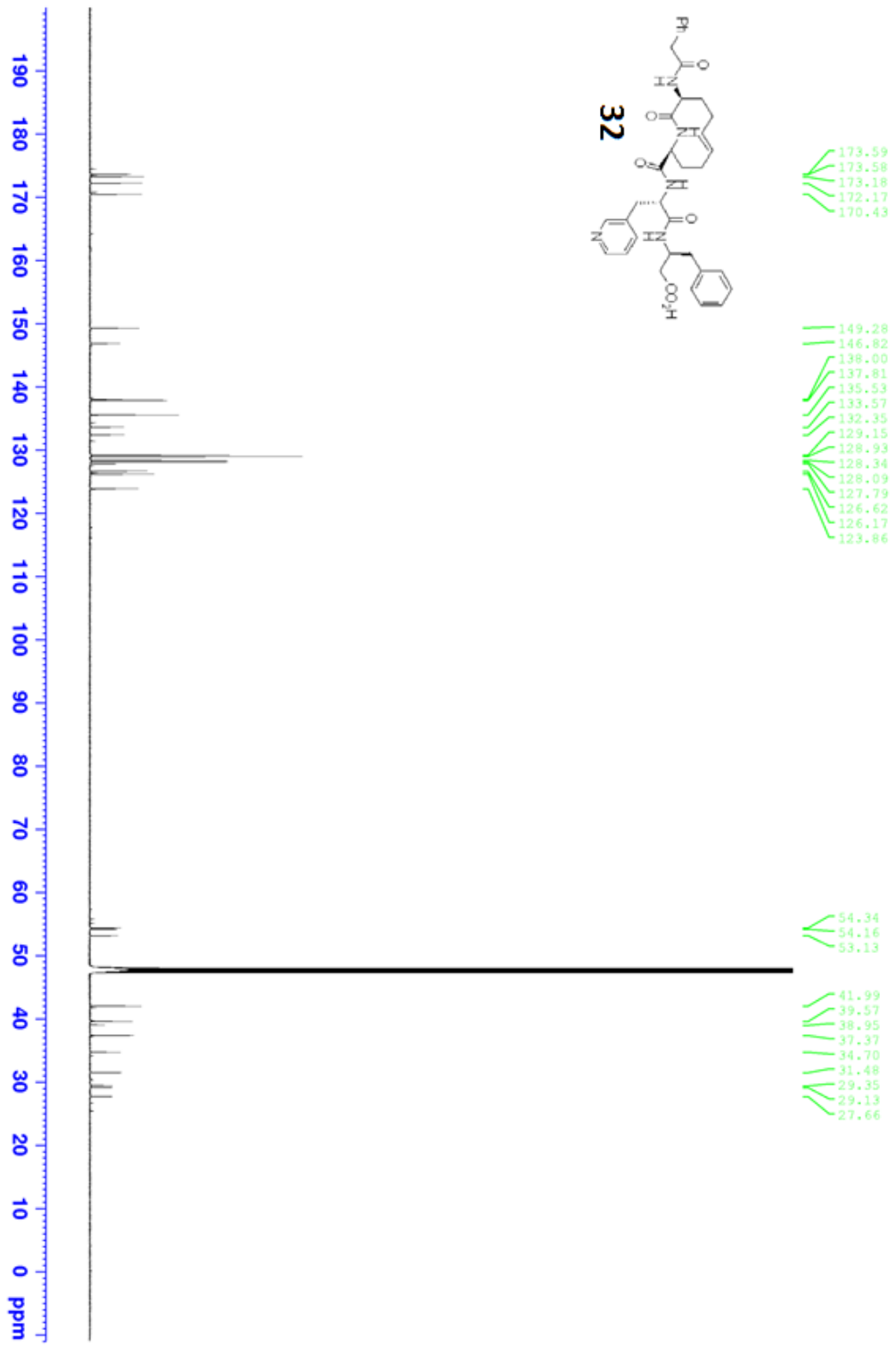
50.48
52.48
58.17

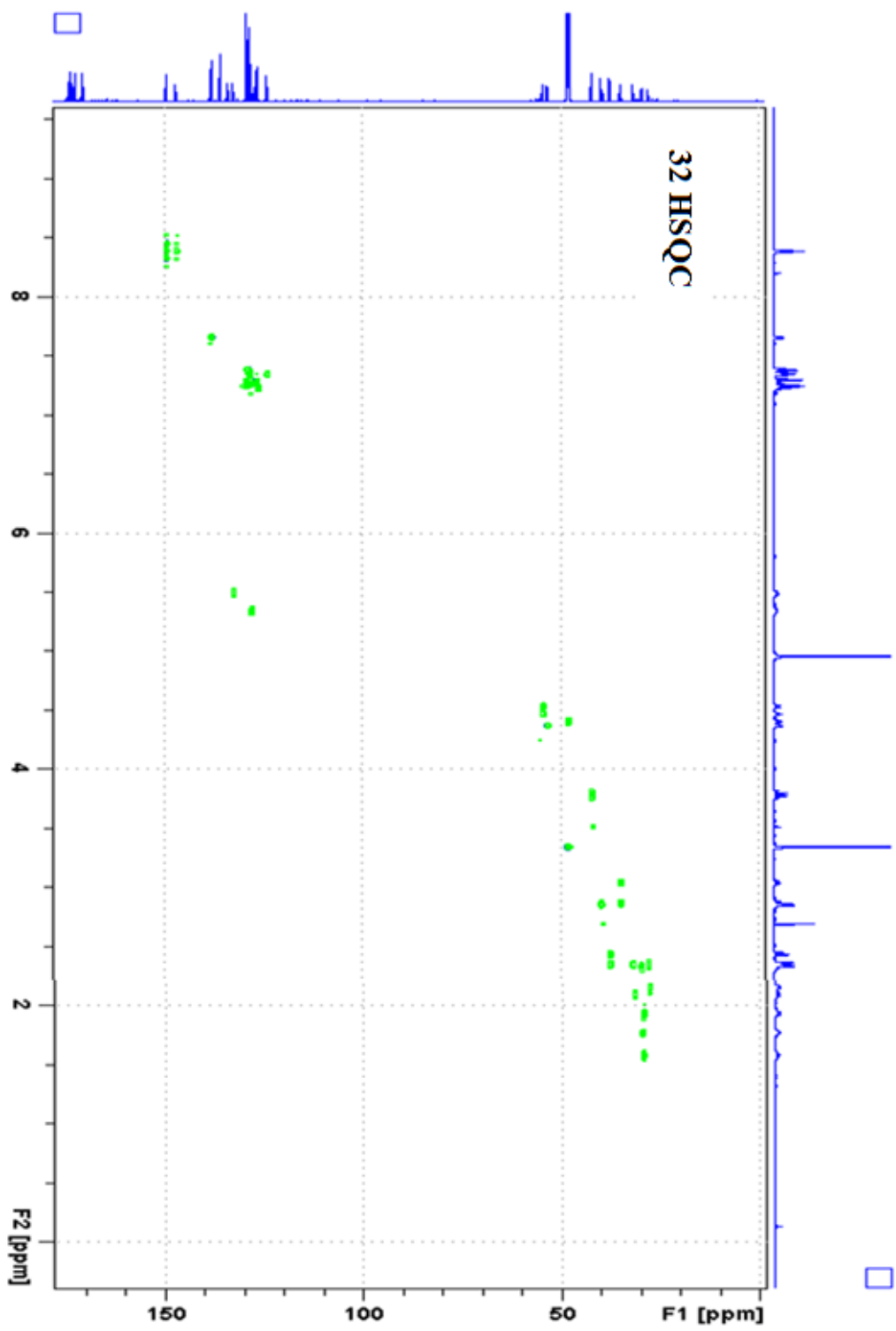
42.58
42.65
38.47
35.47
31.91
31.71
30.49
28.88



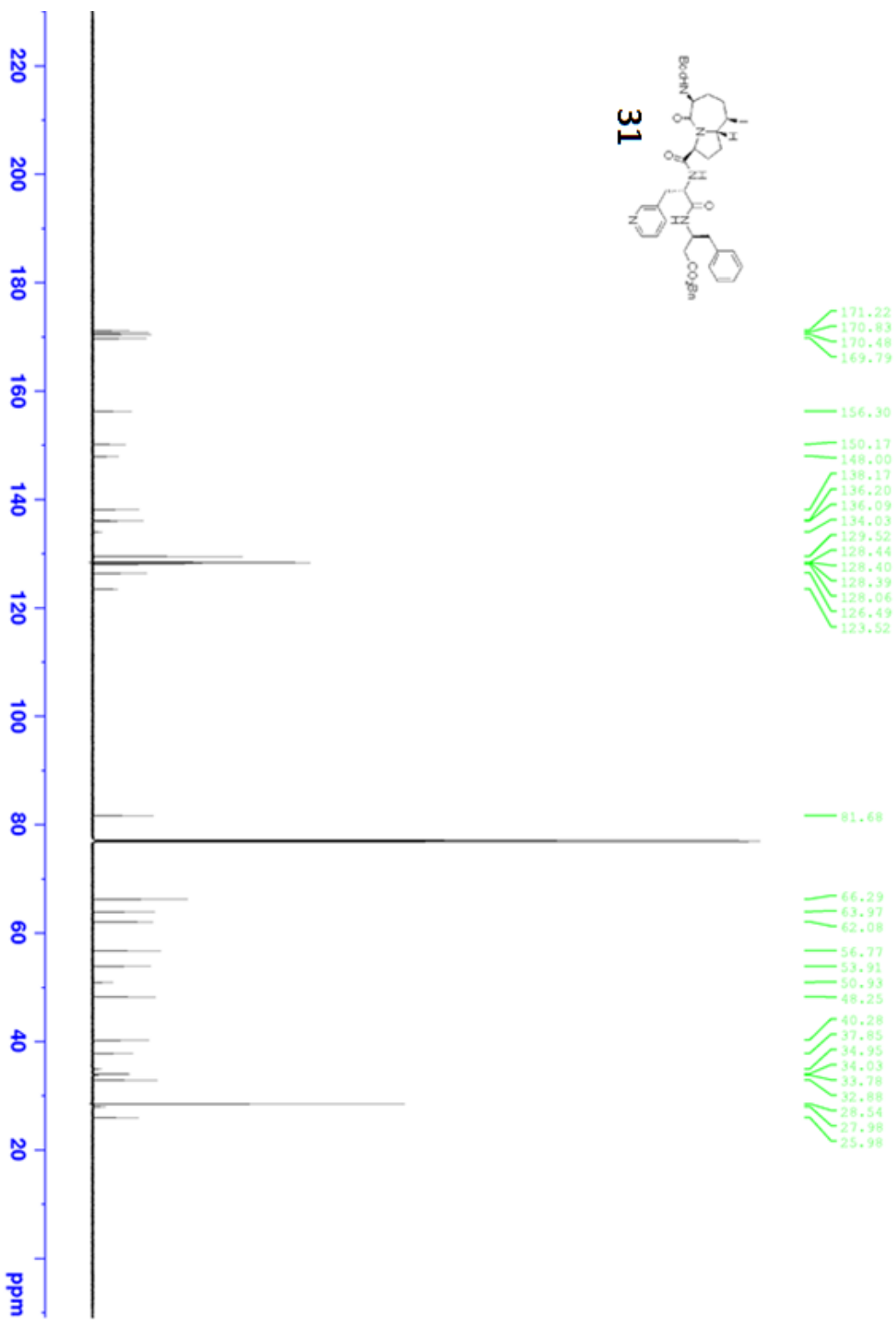
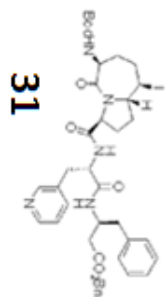


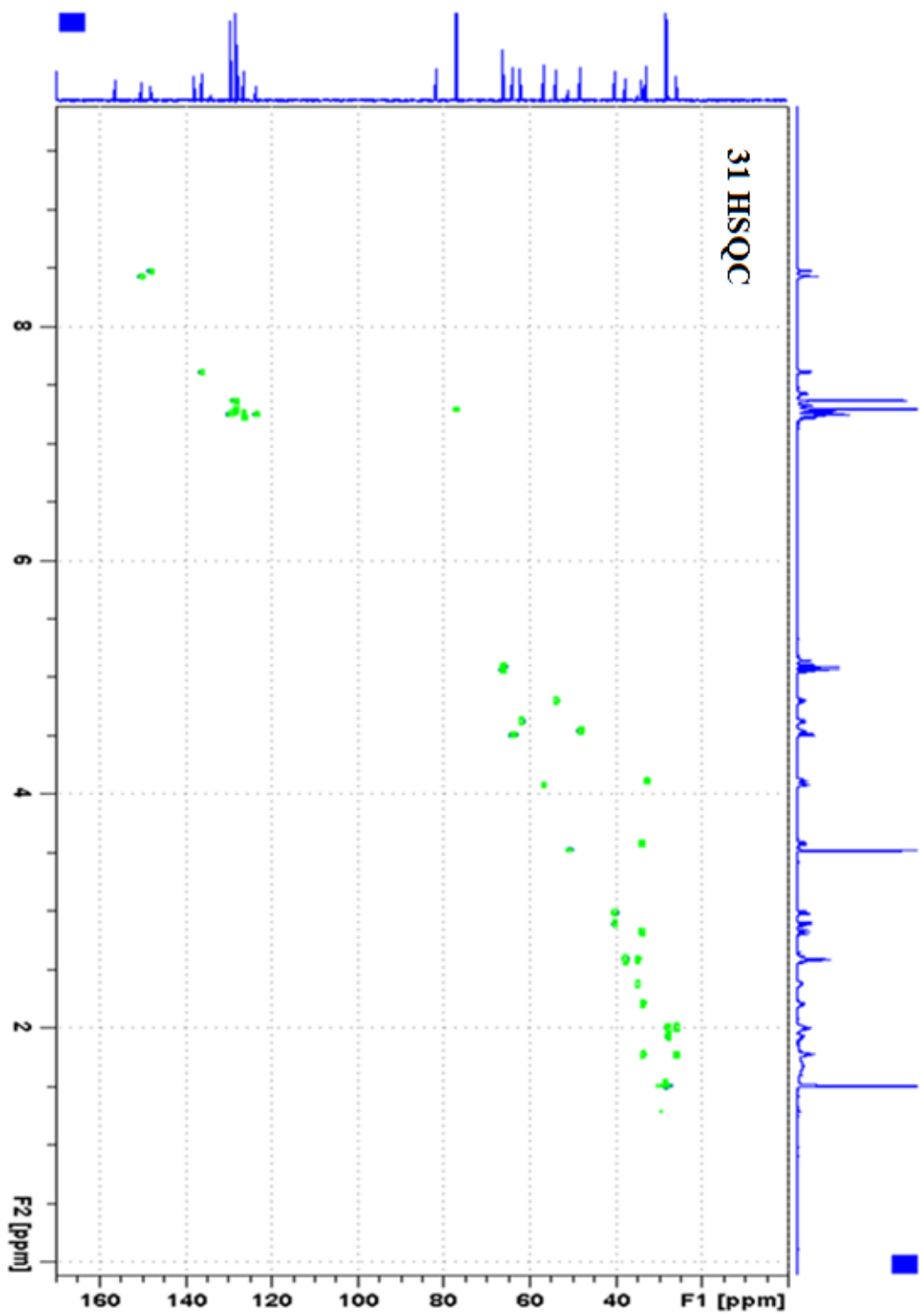


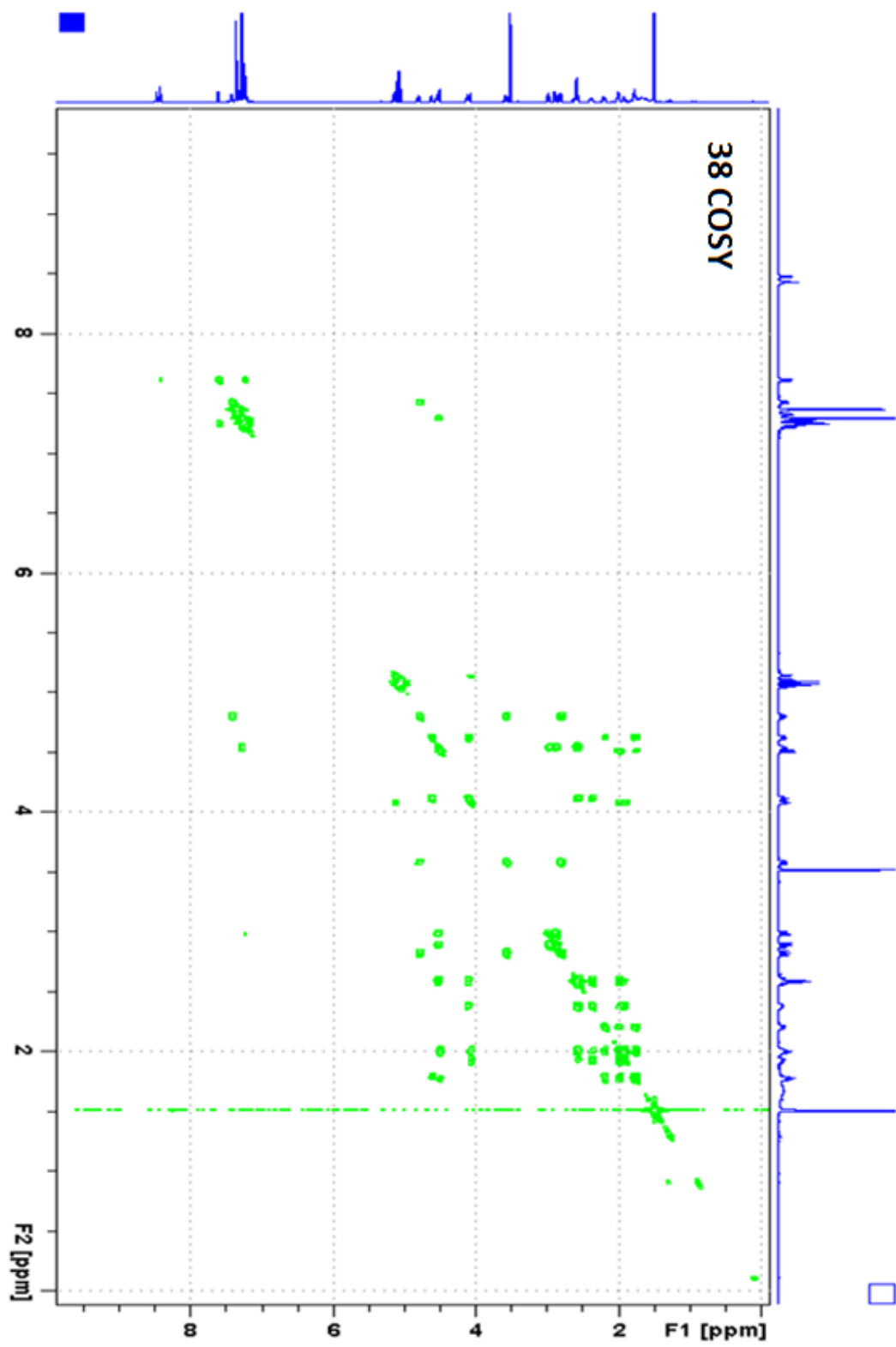


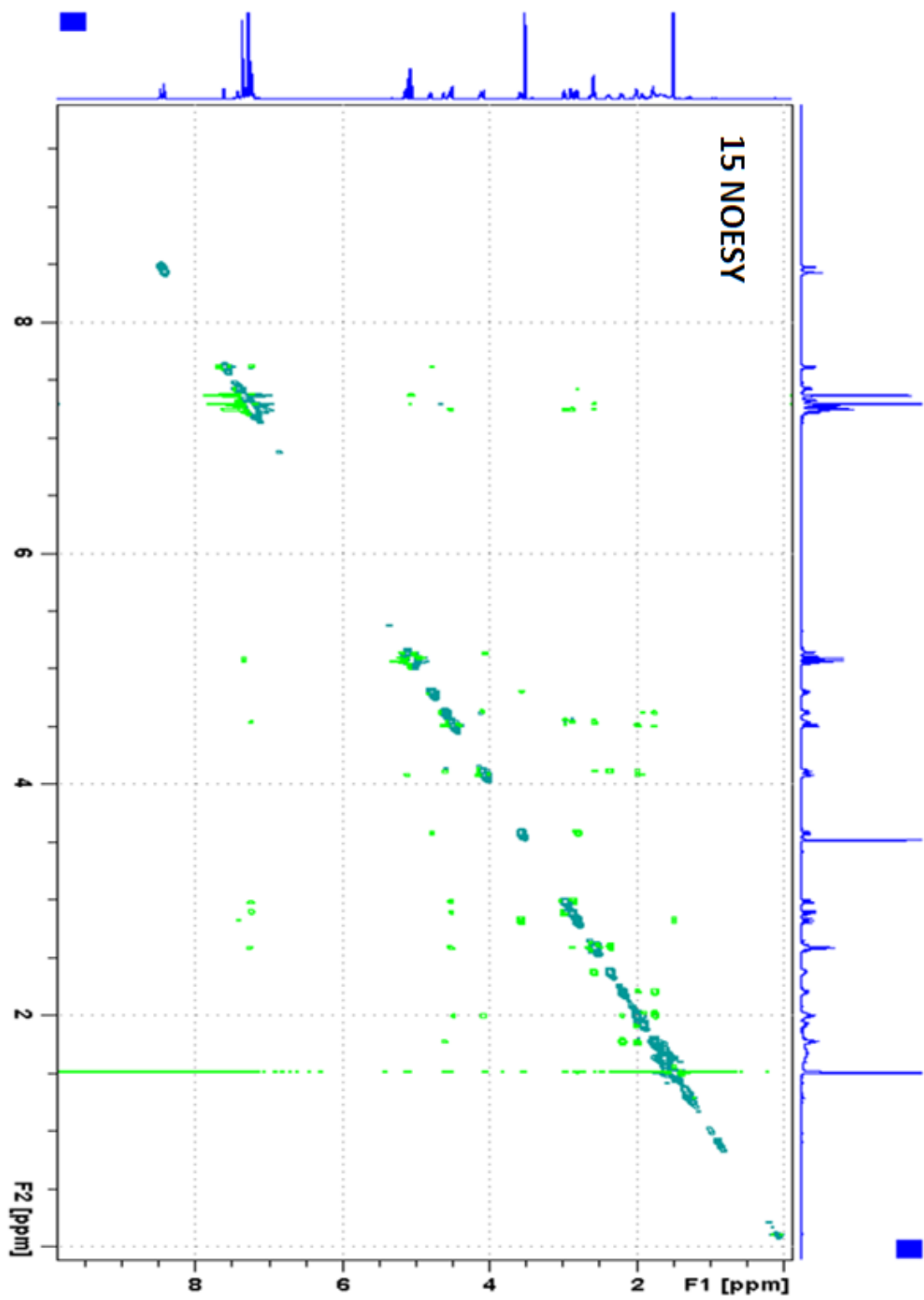


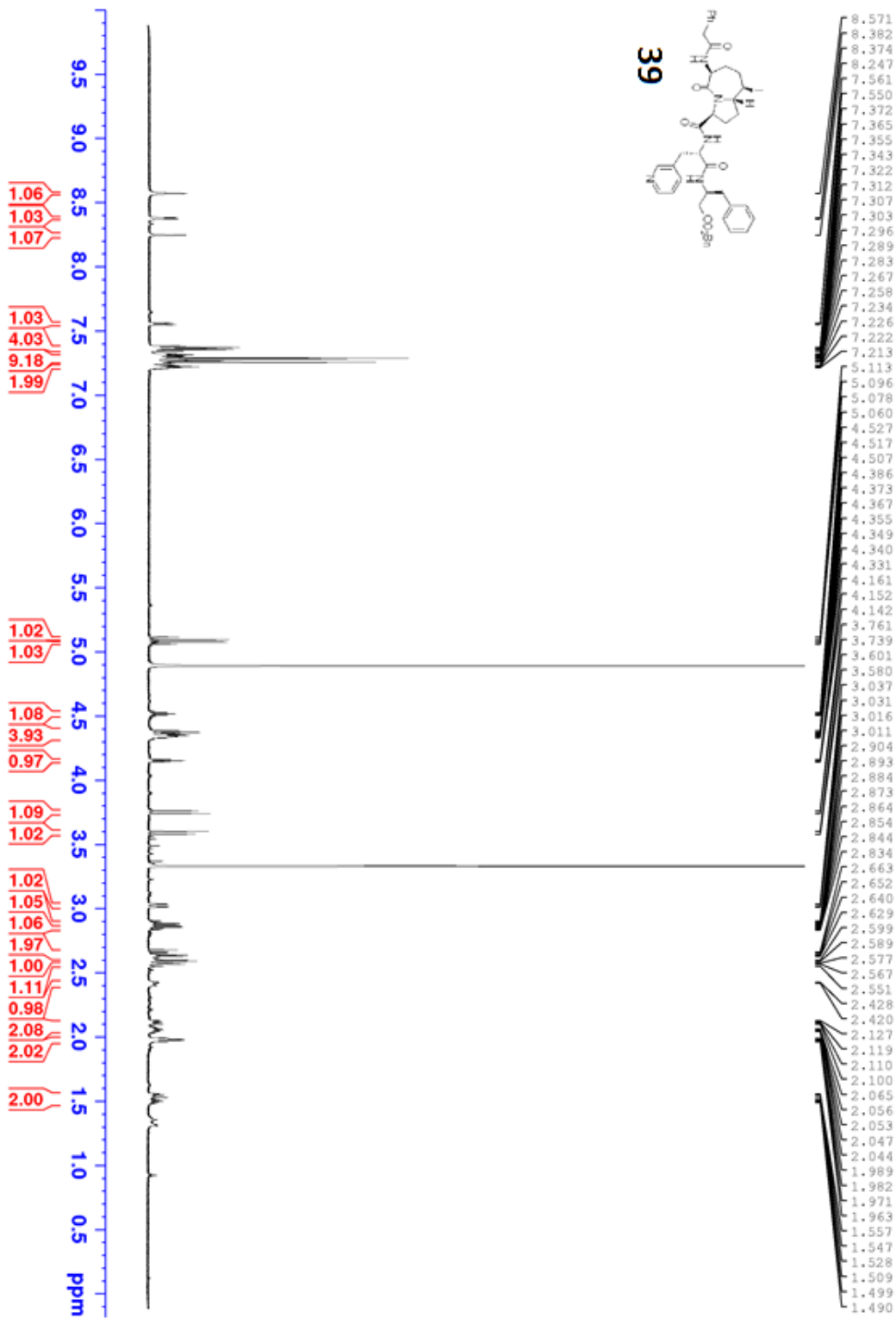


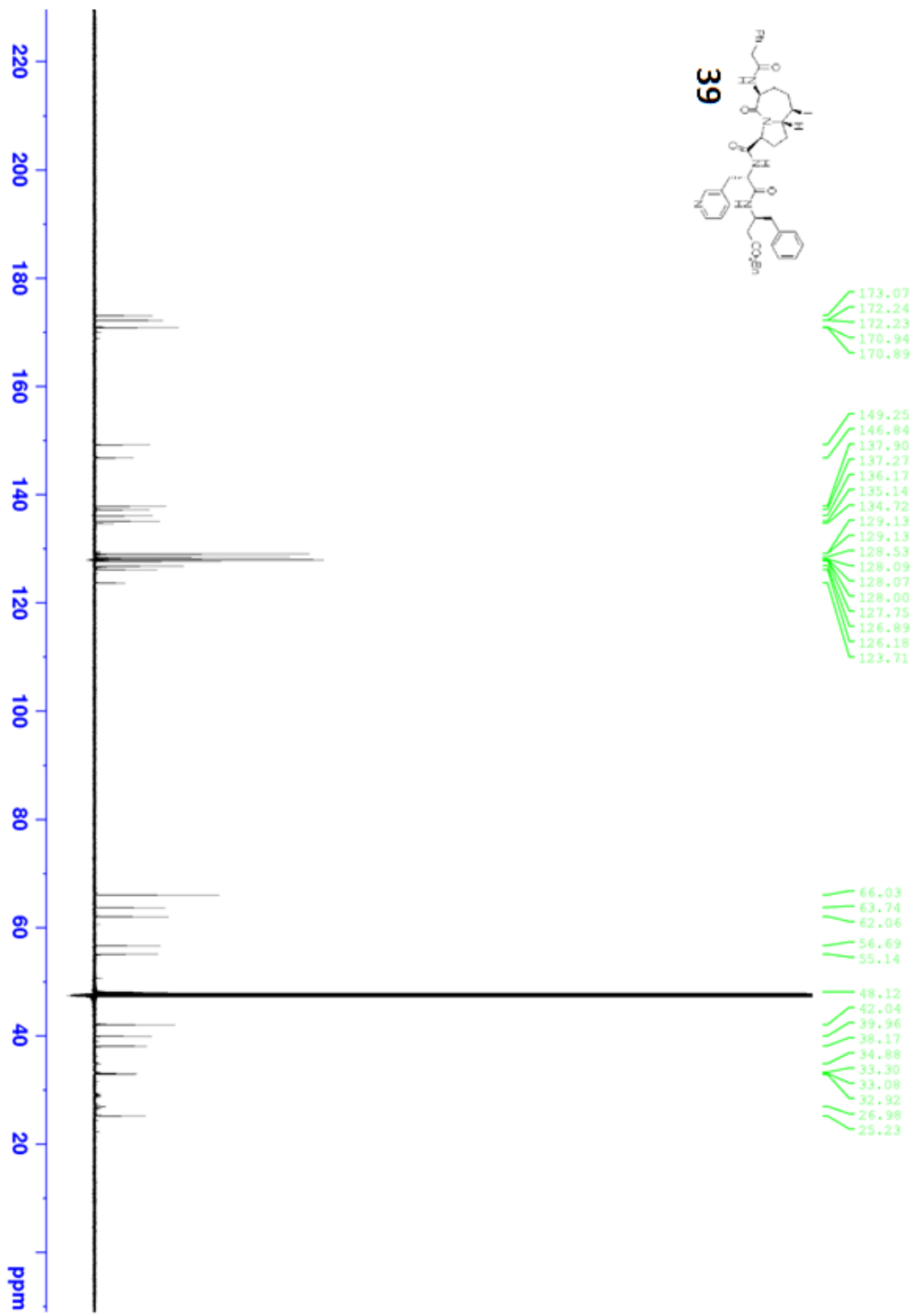


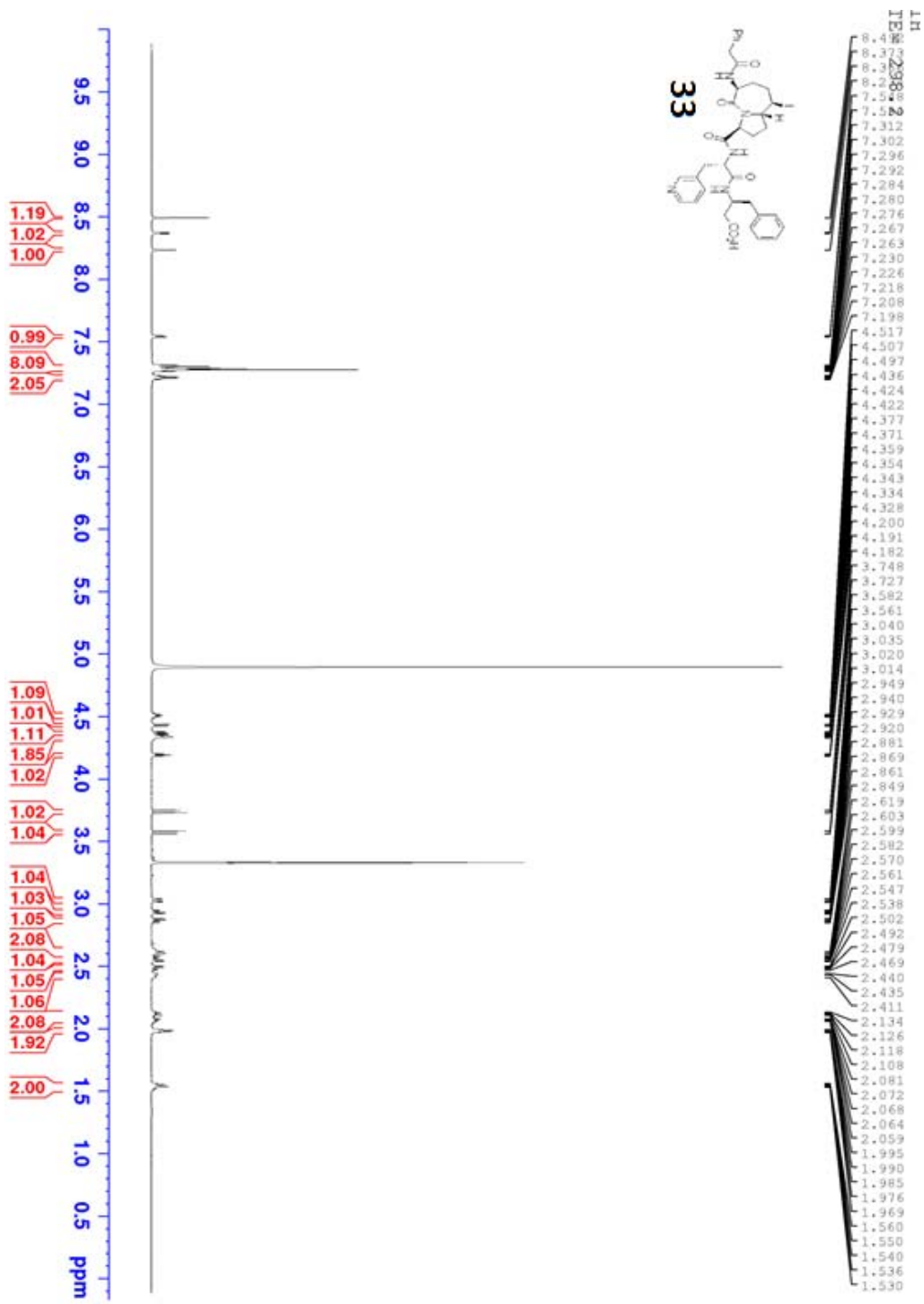


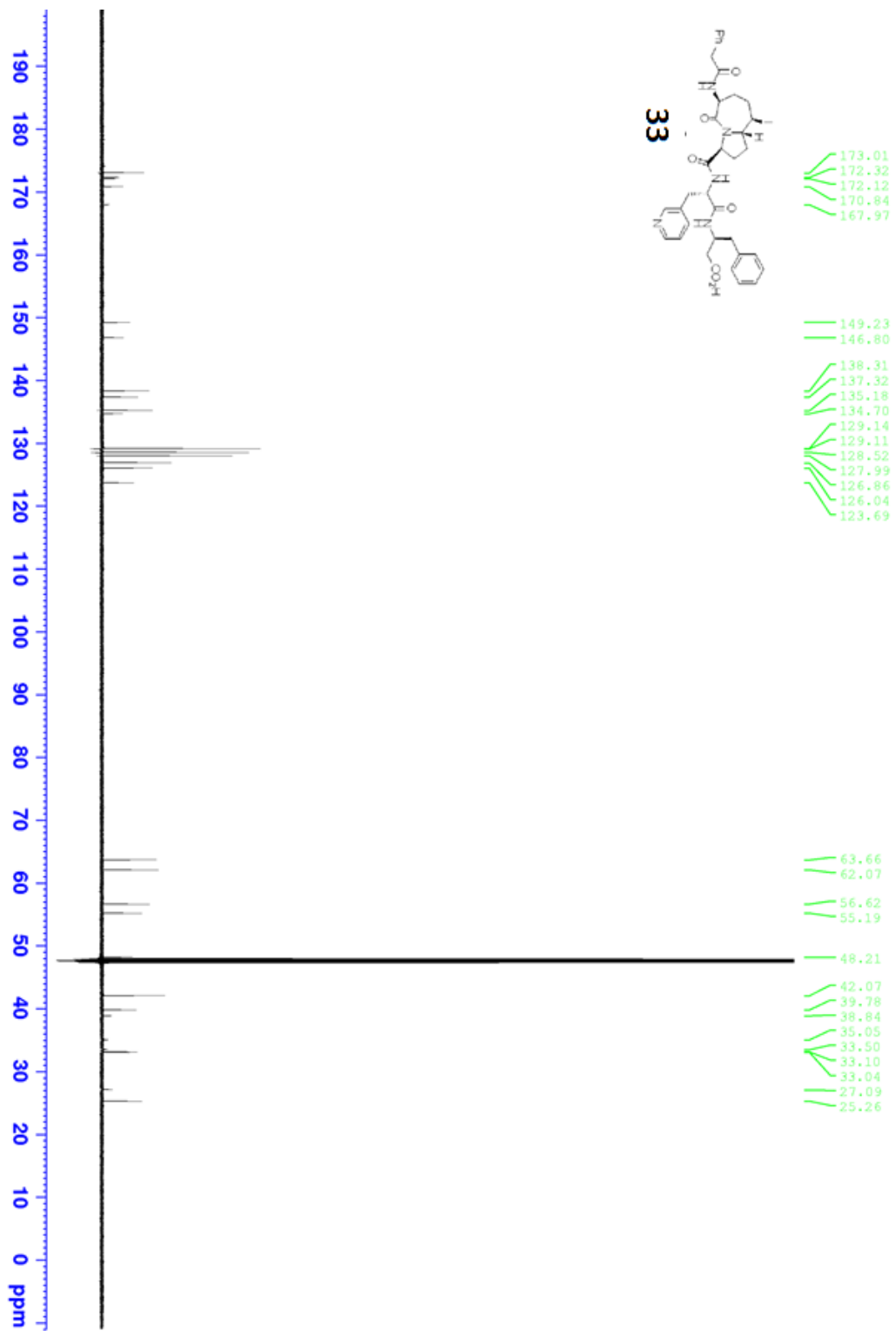


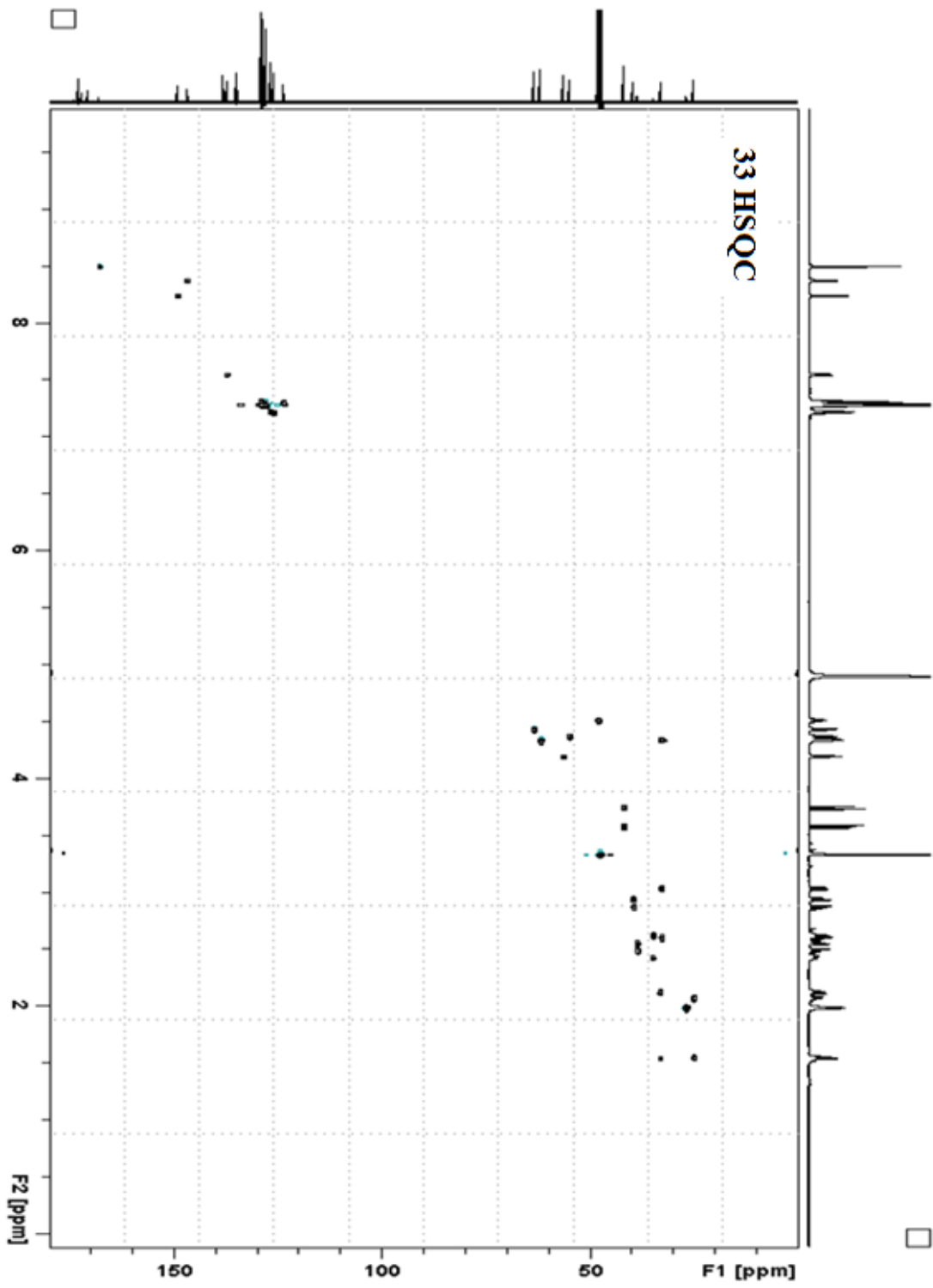


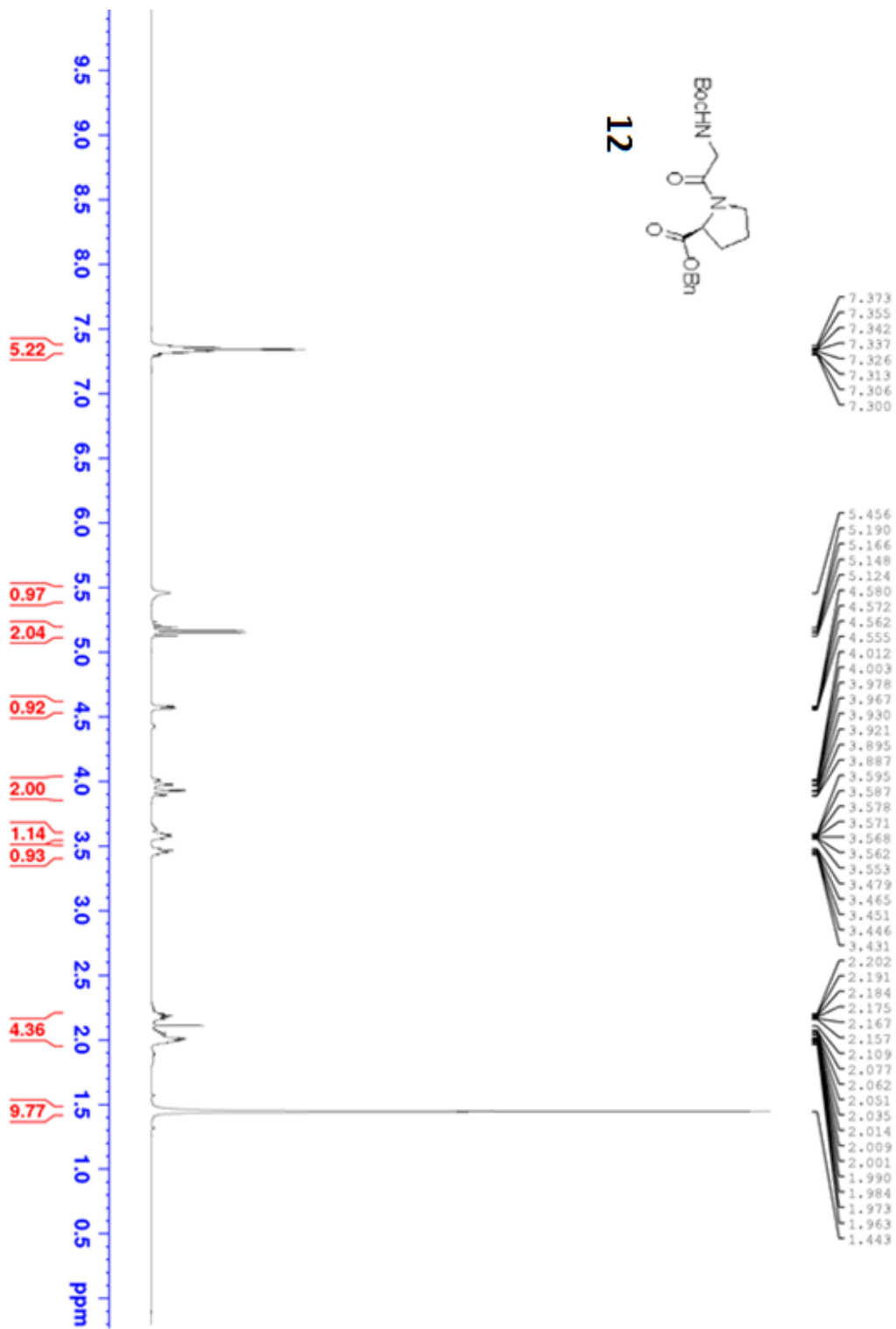
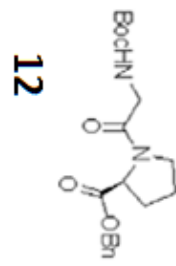


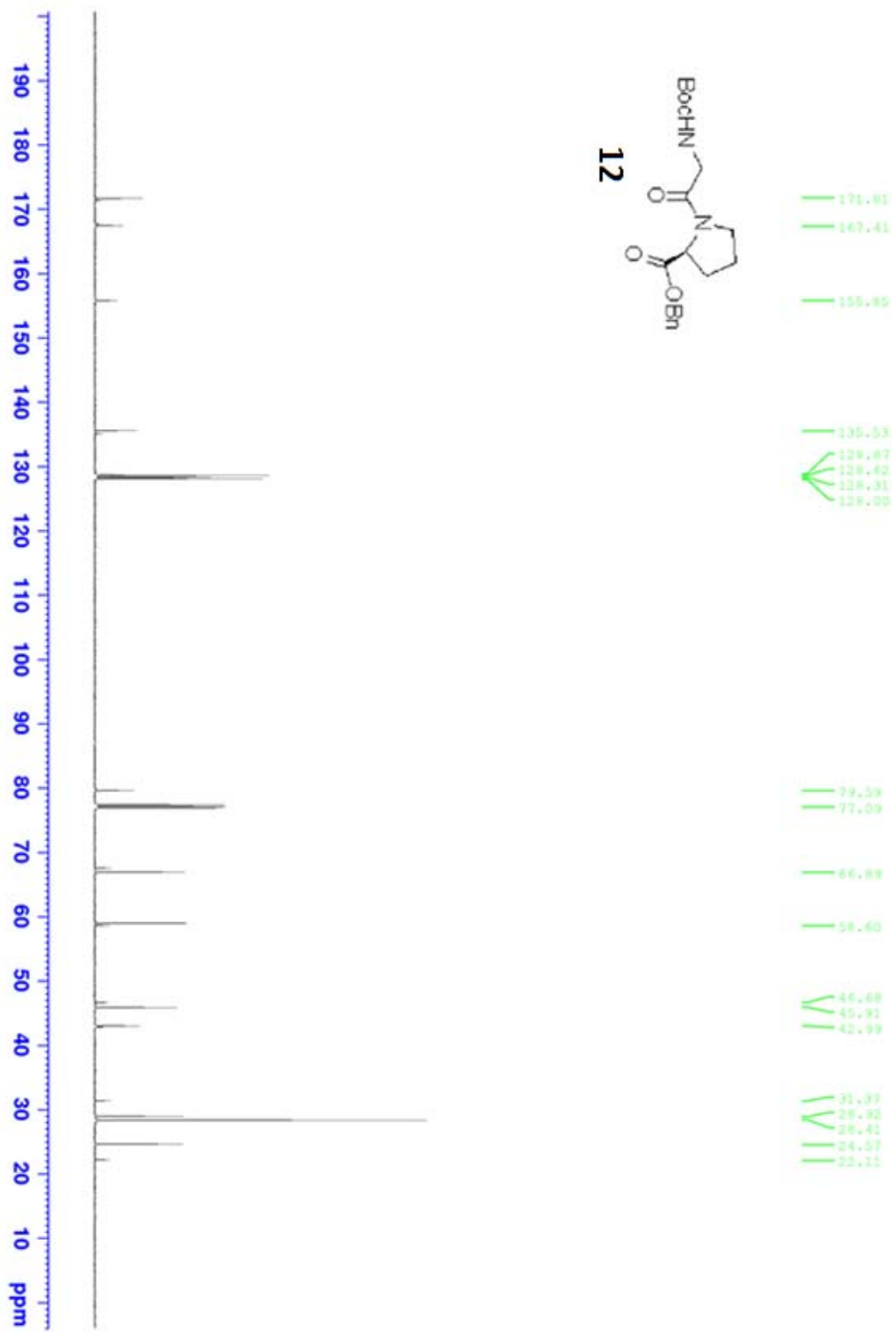


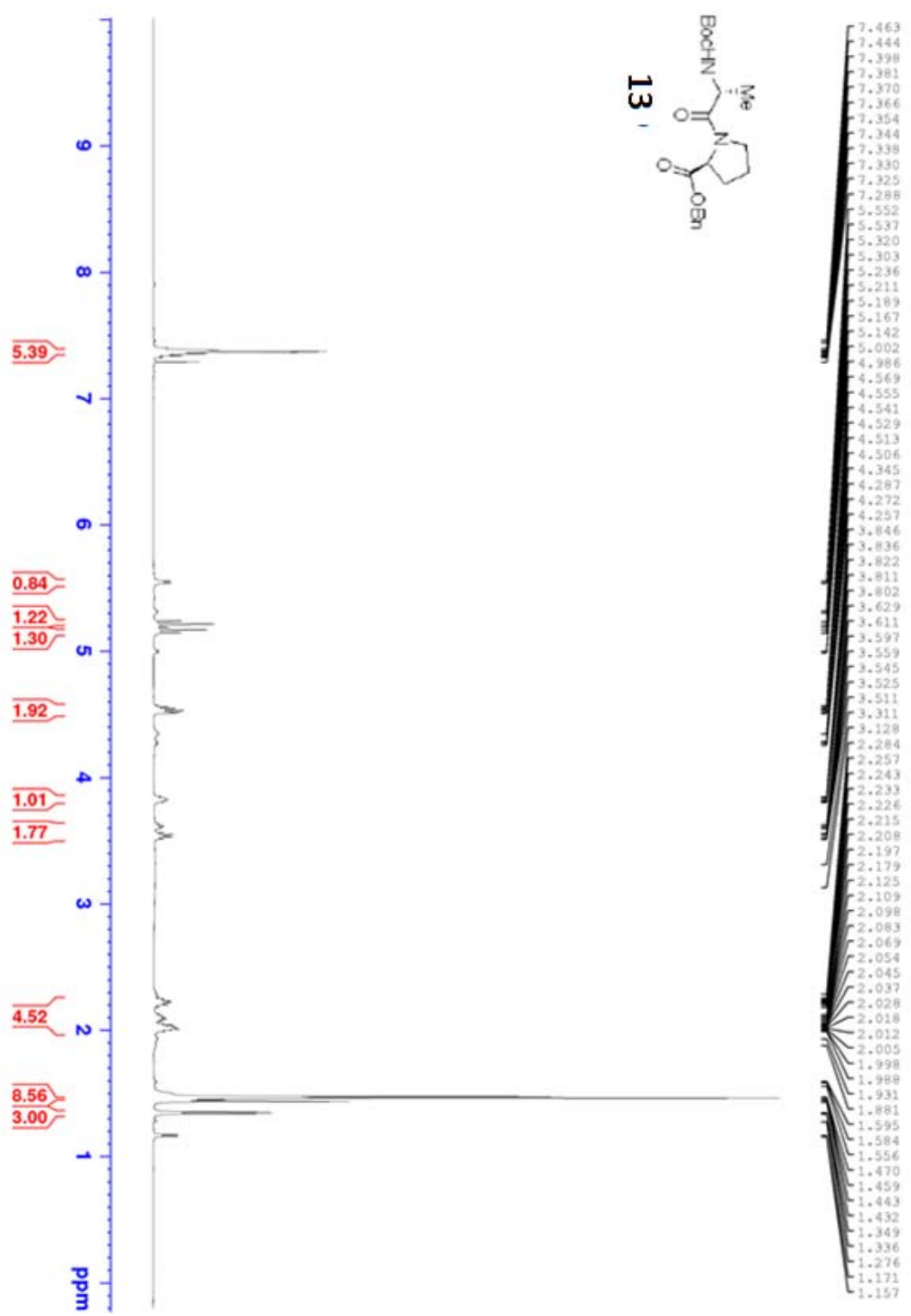
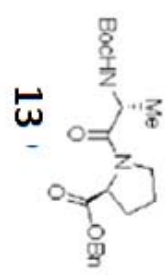


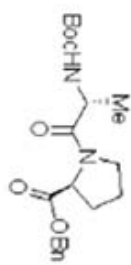




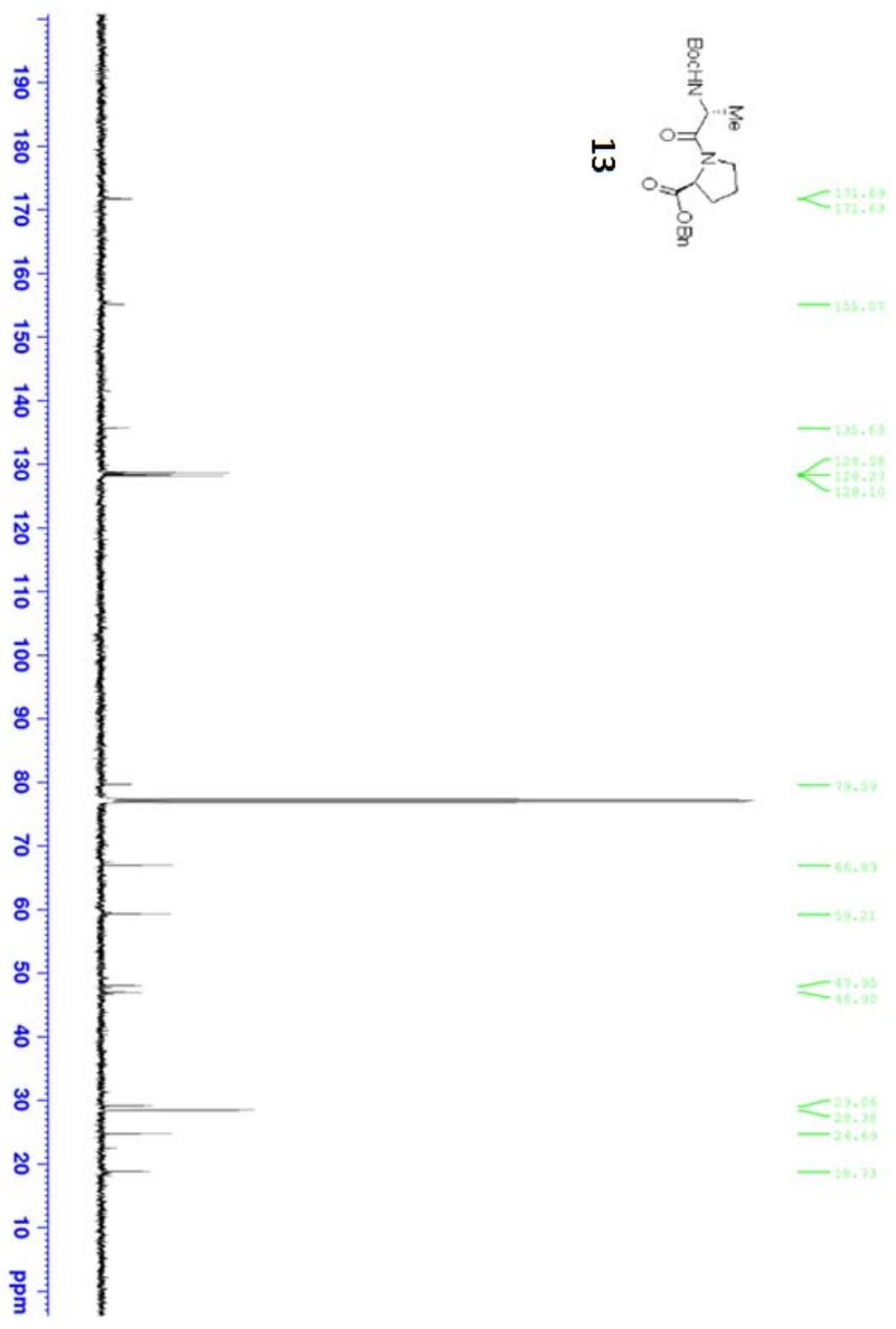


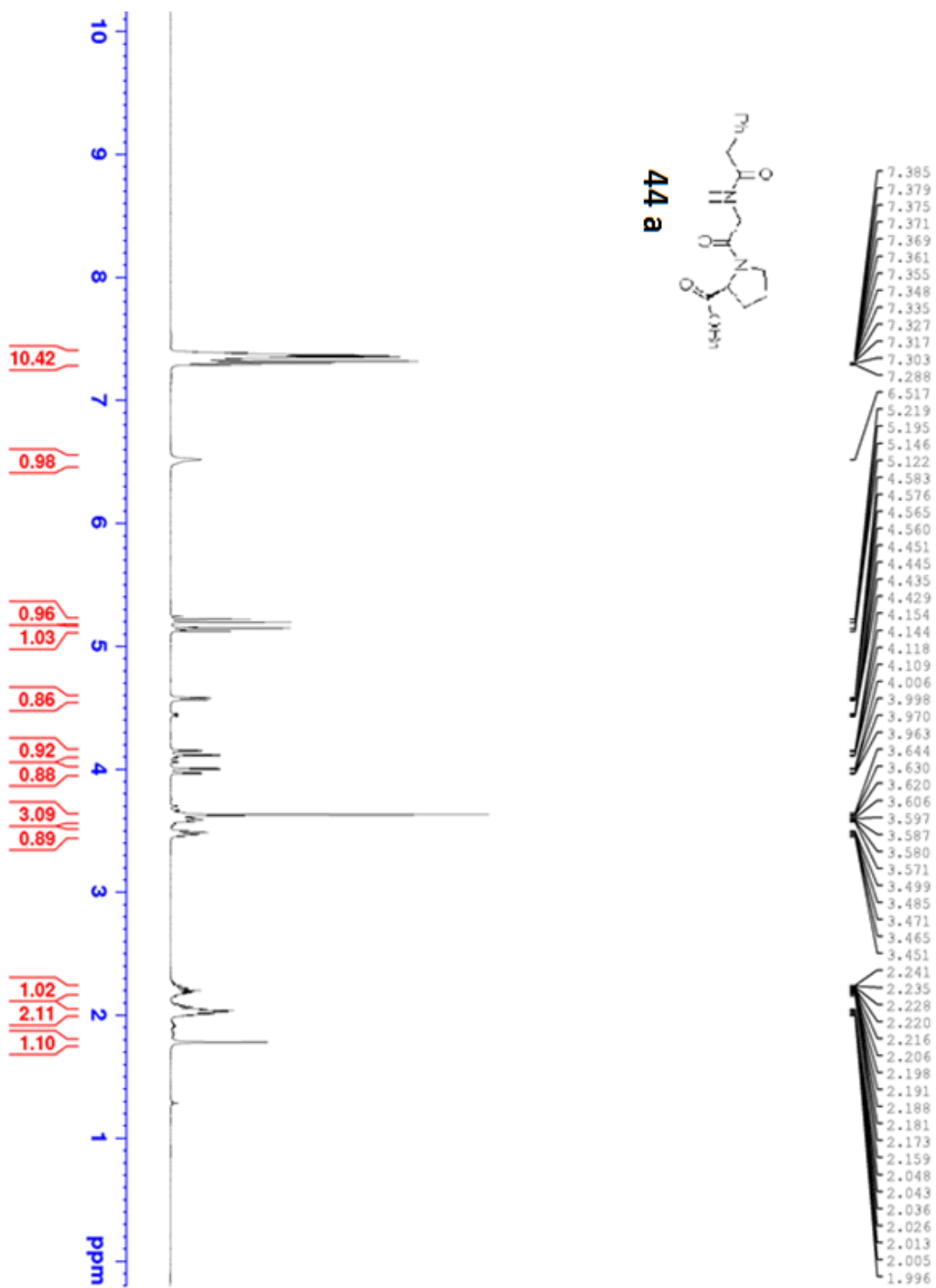


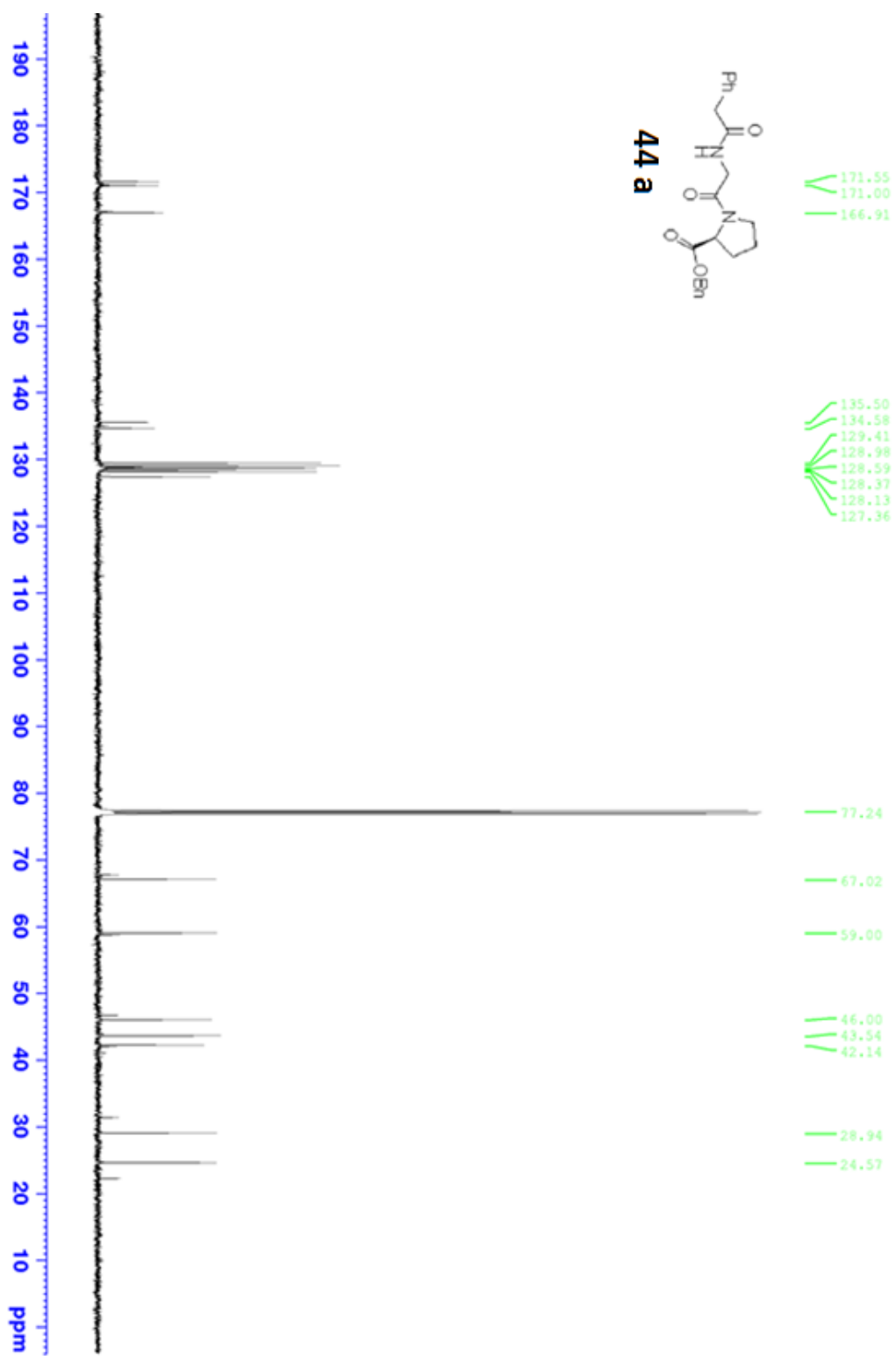


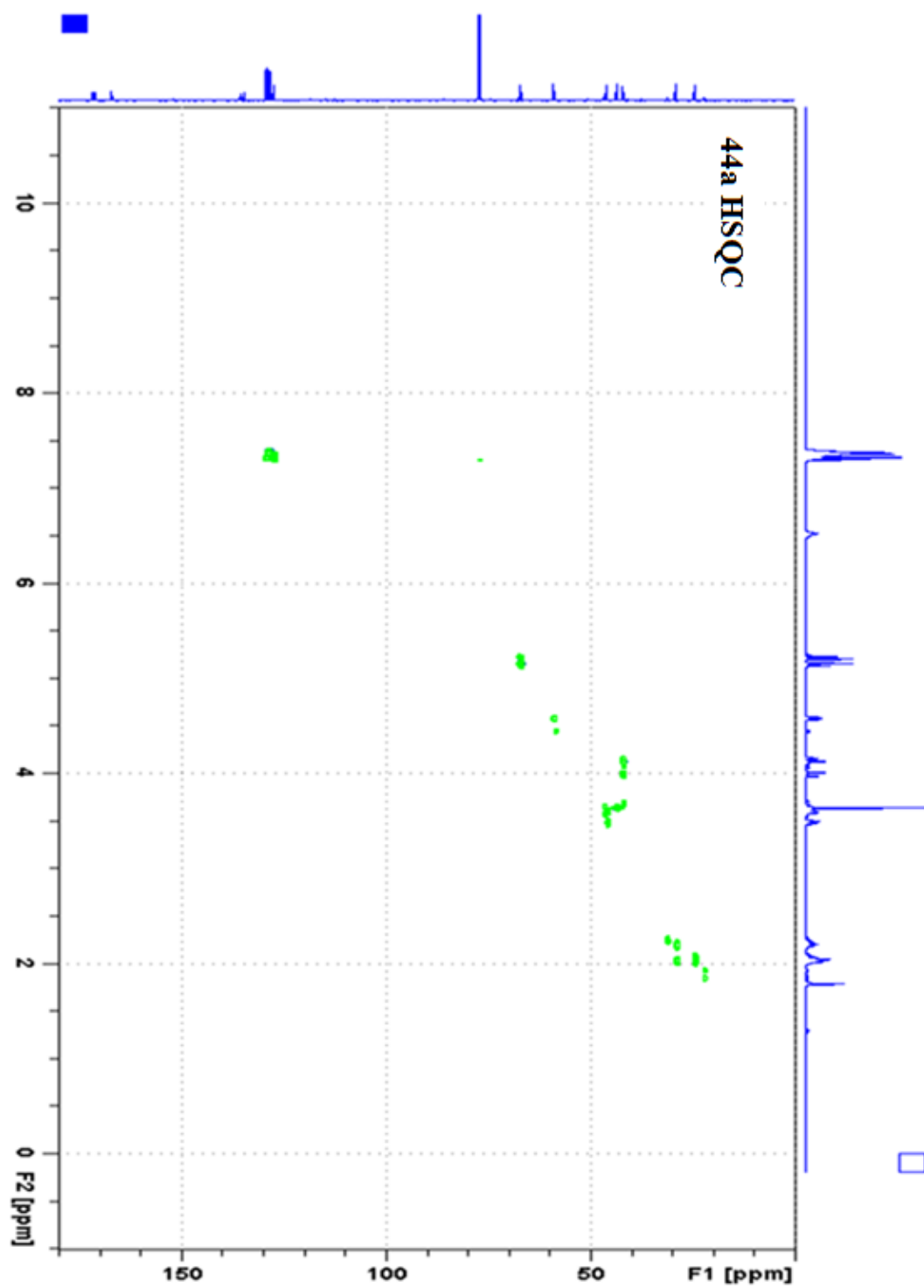


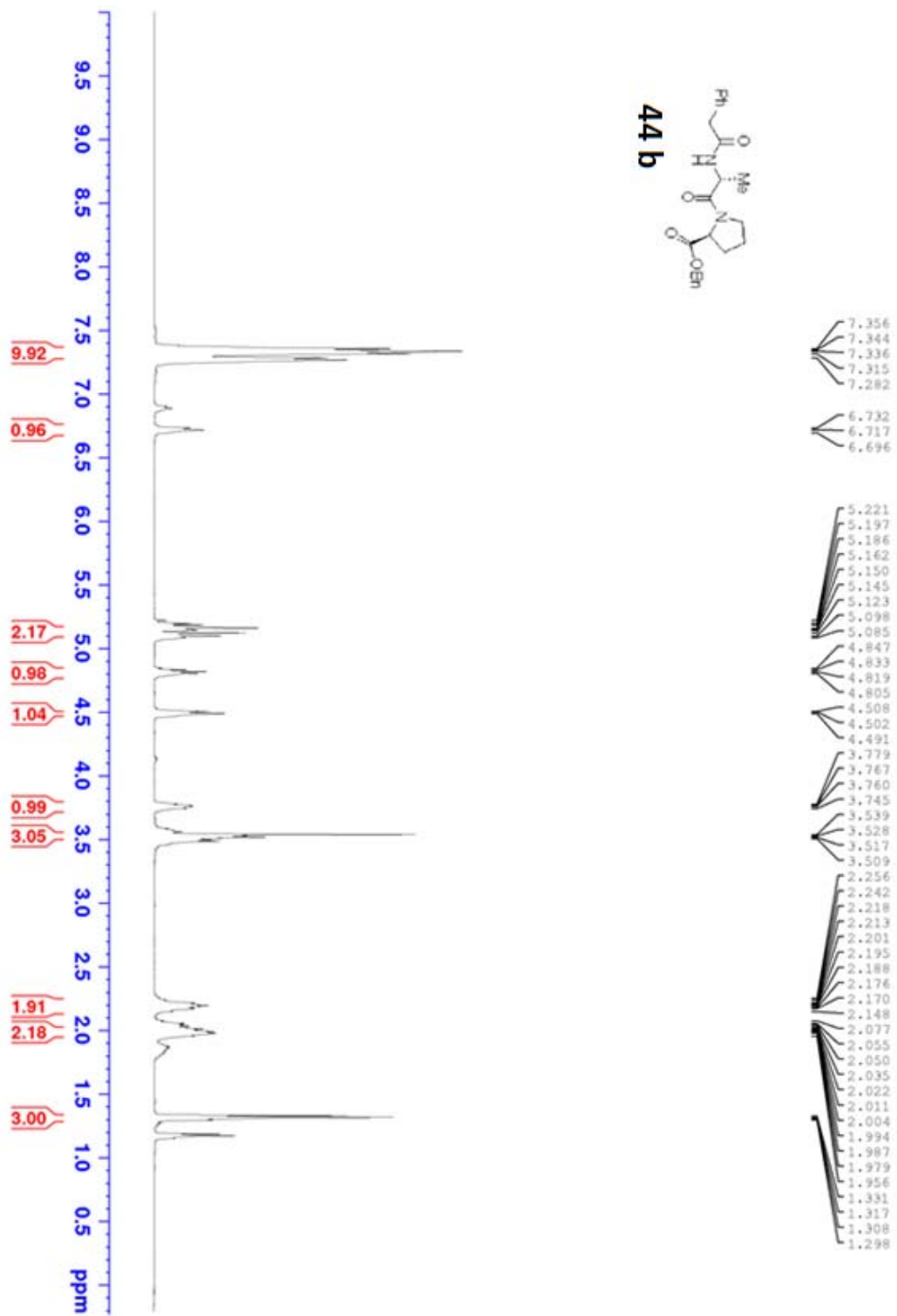
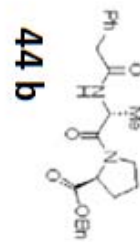
13

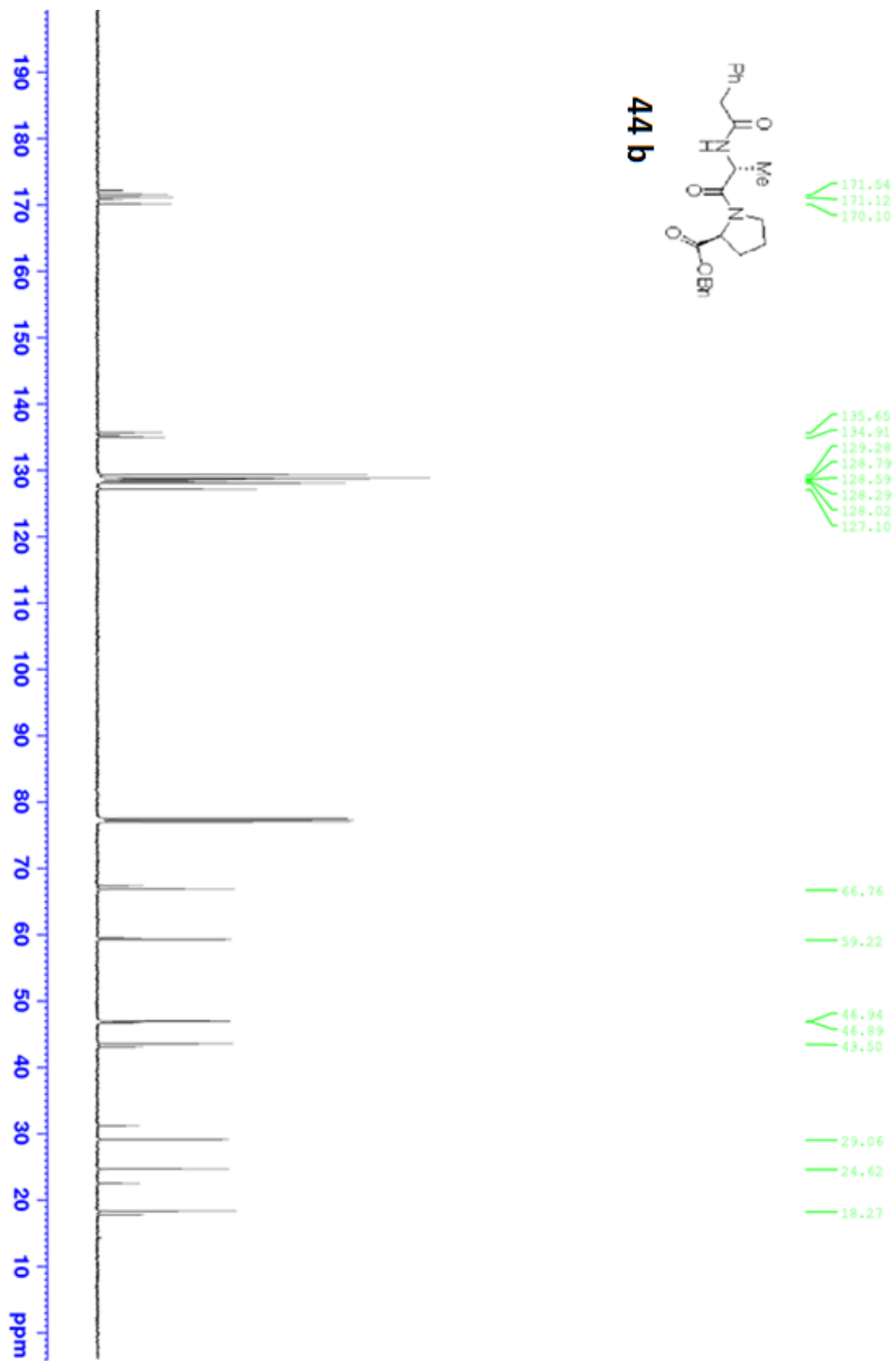
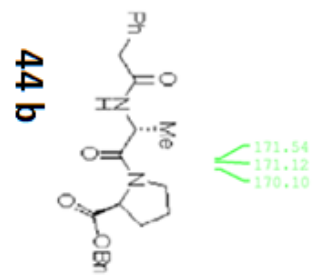


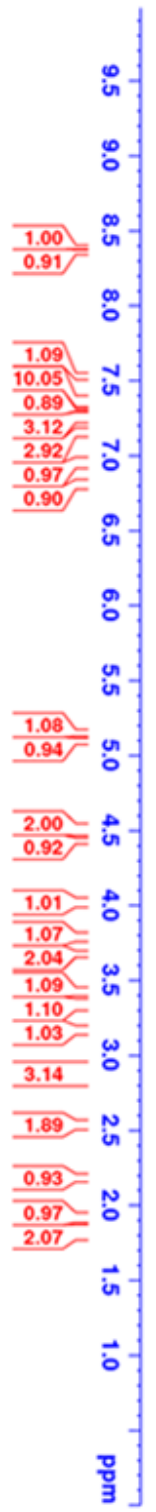
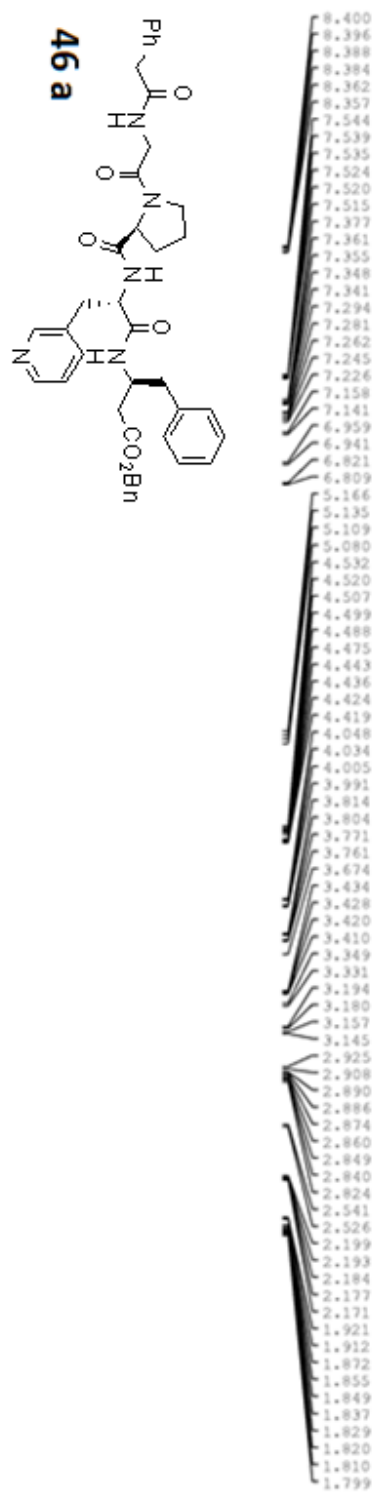


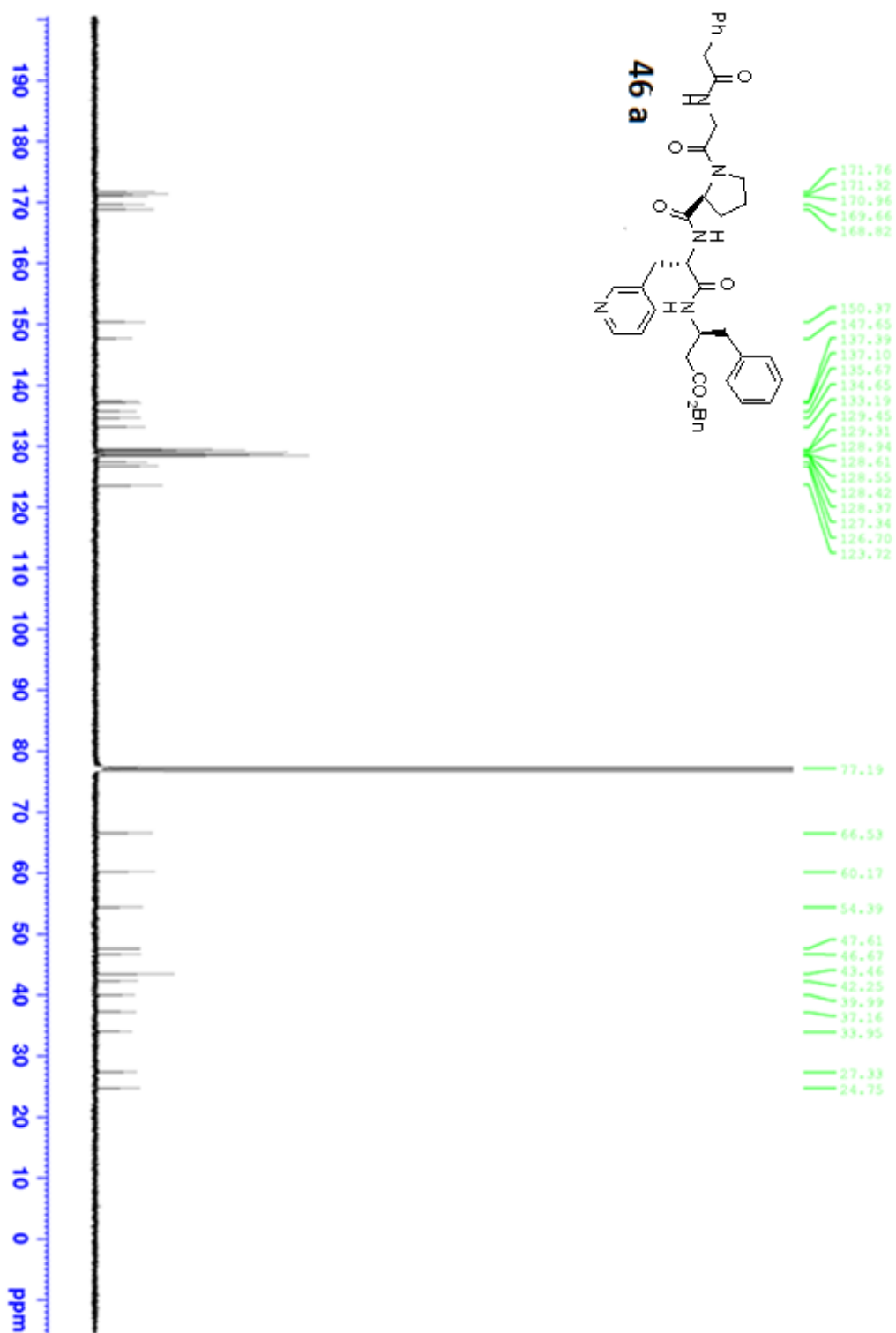


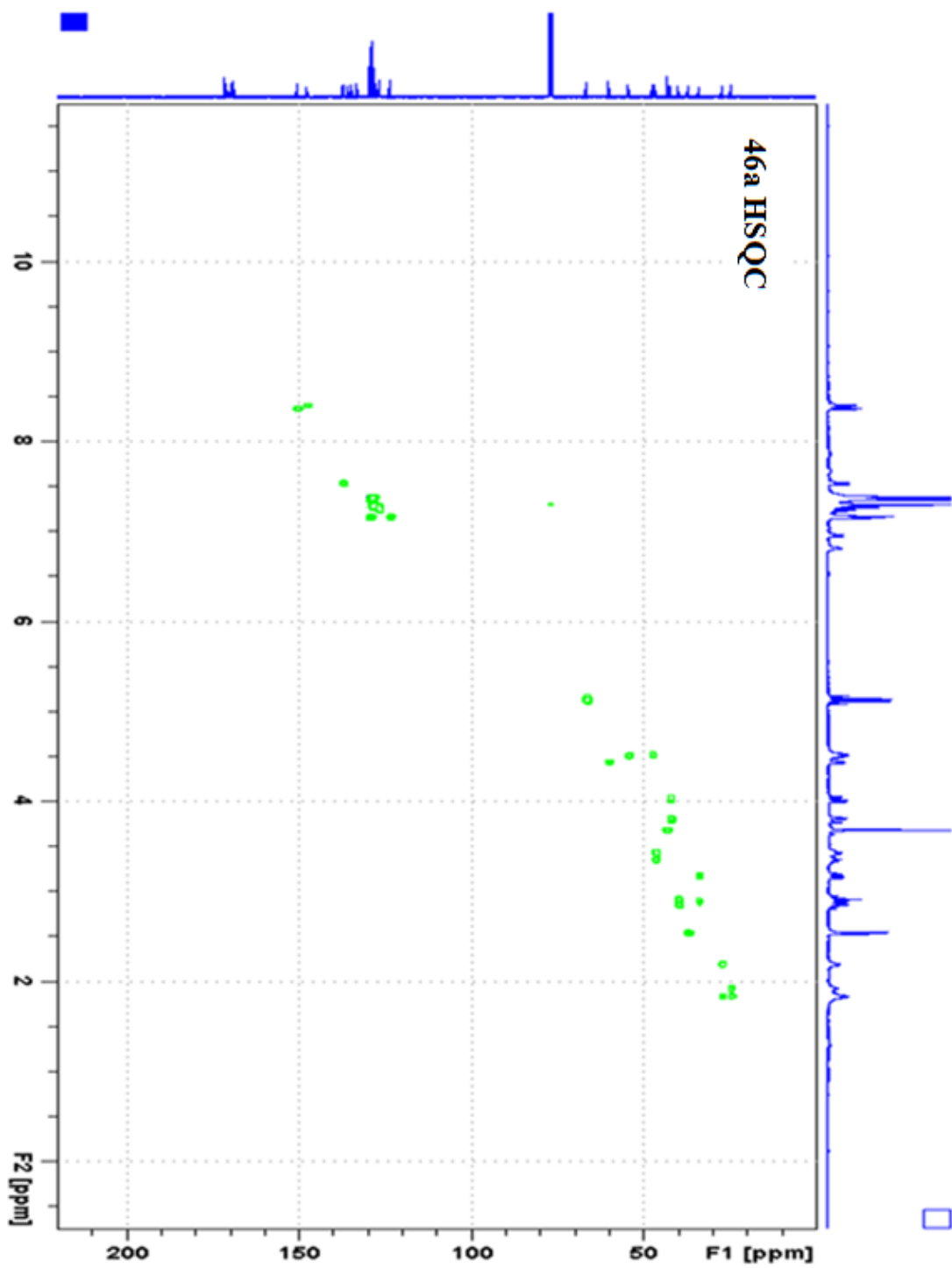


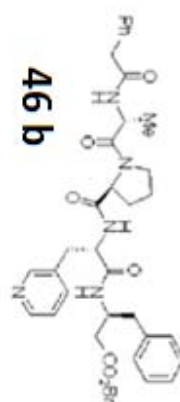


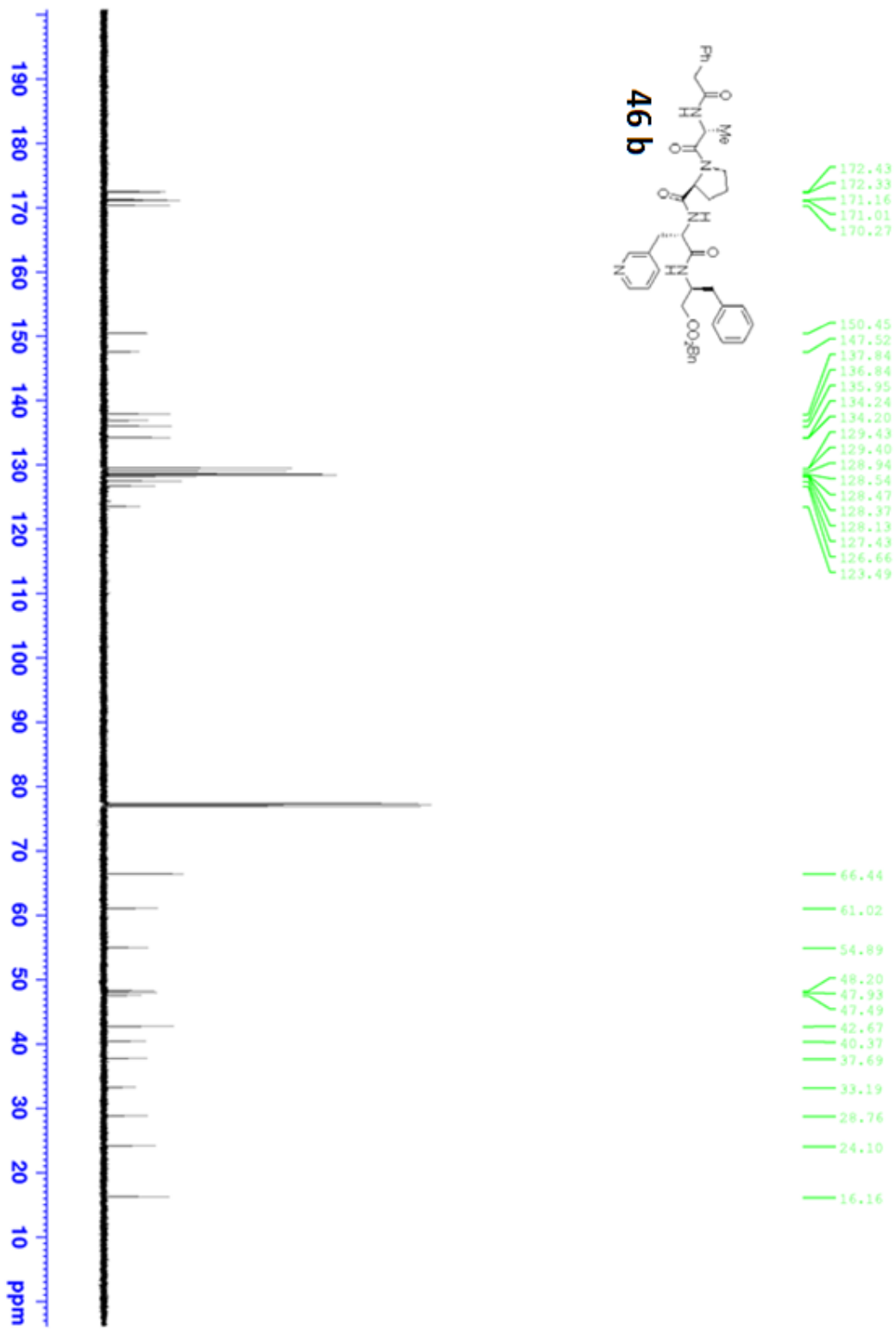


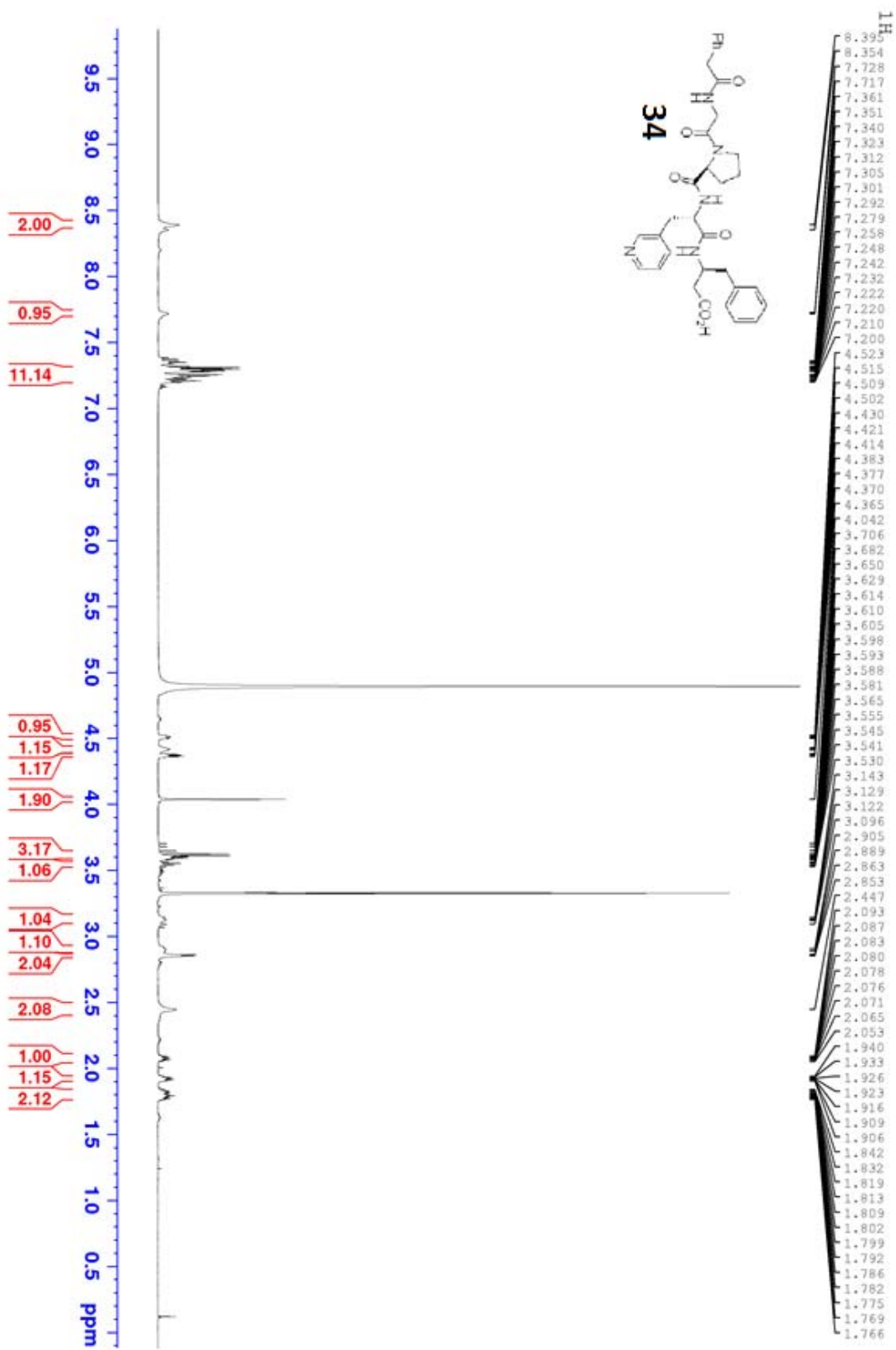


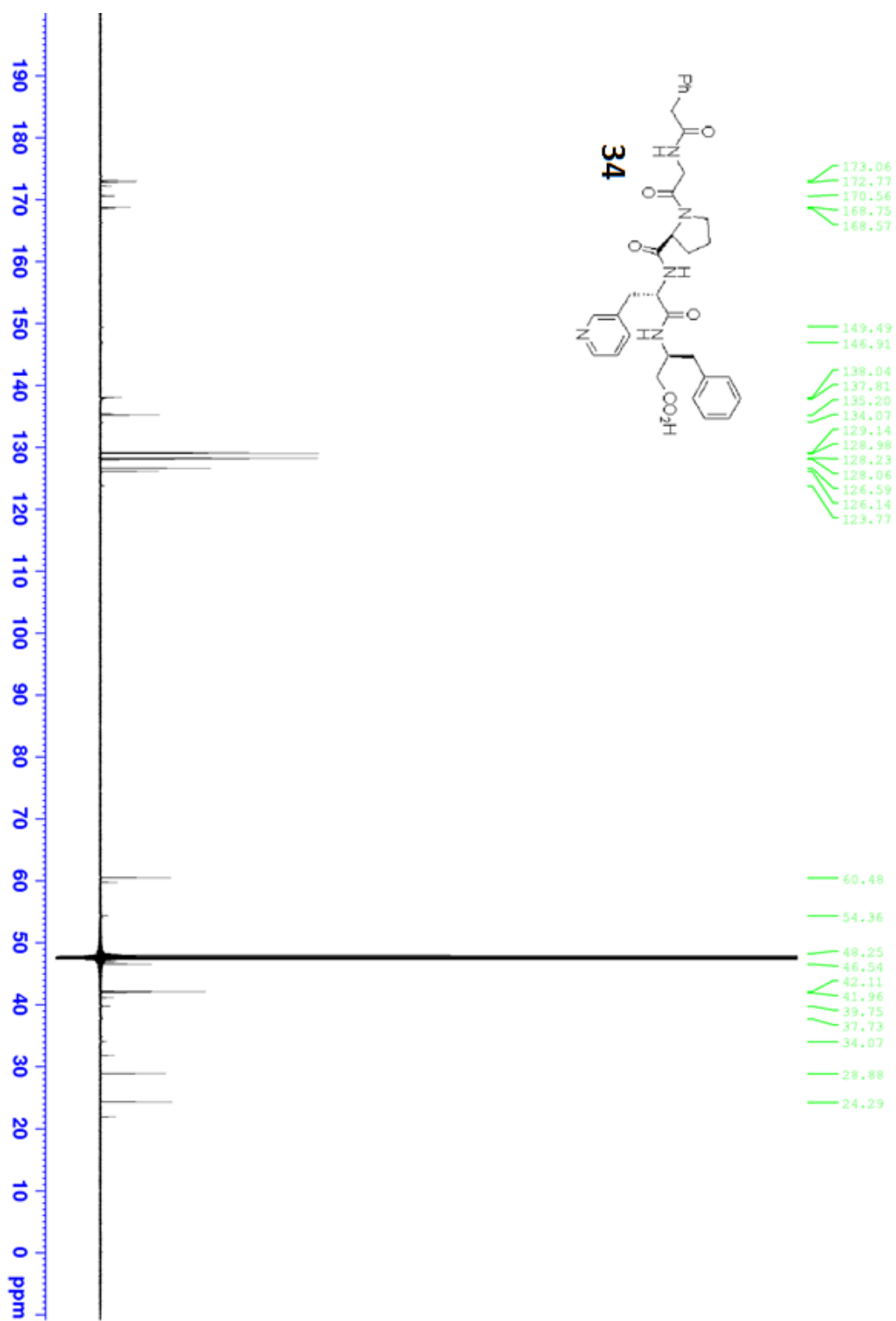


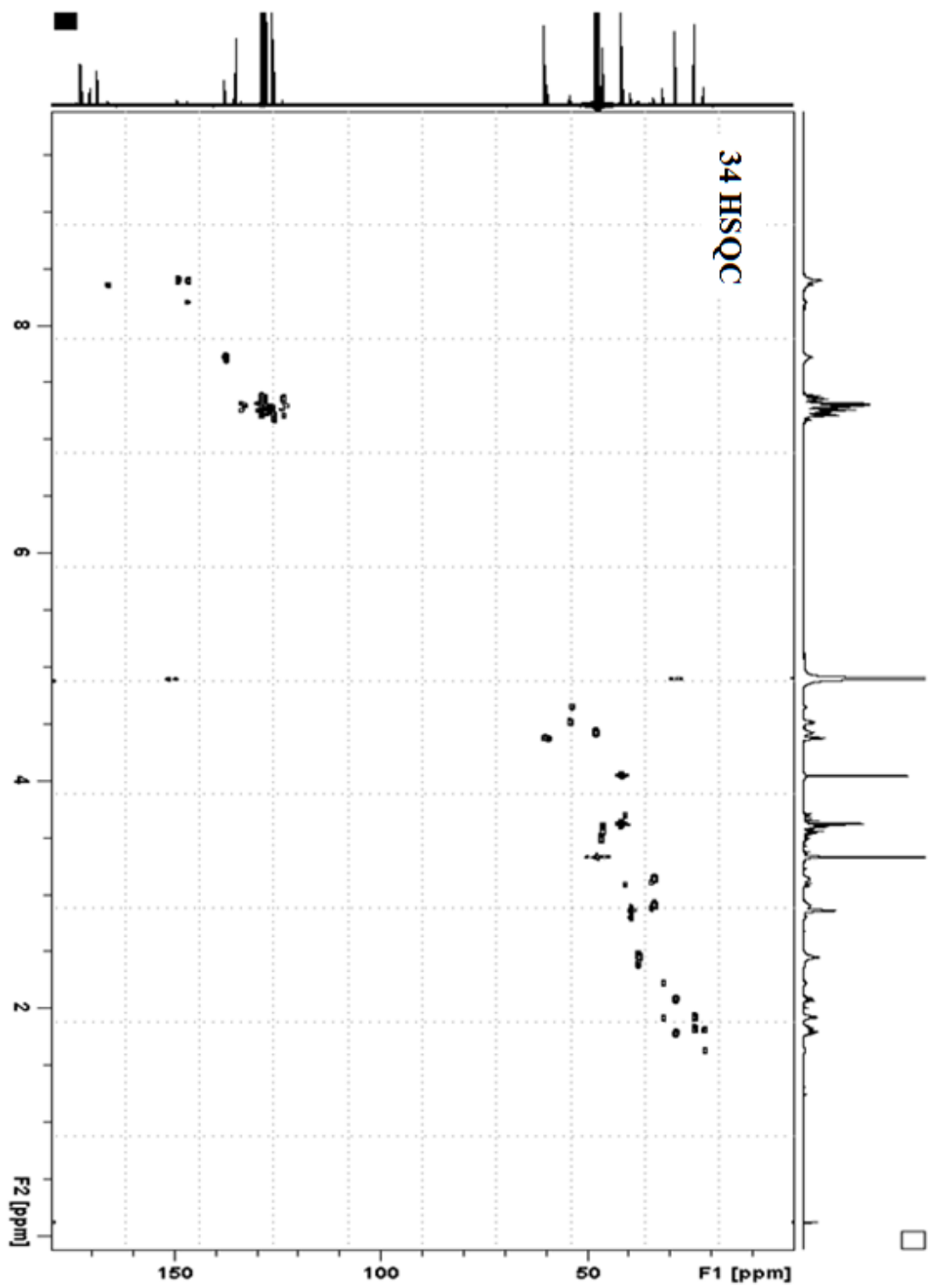


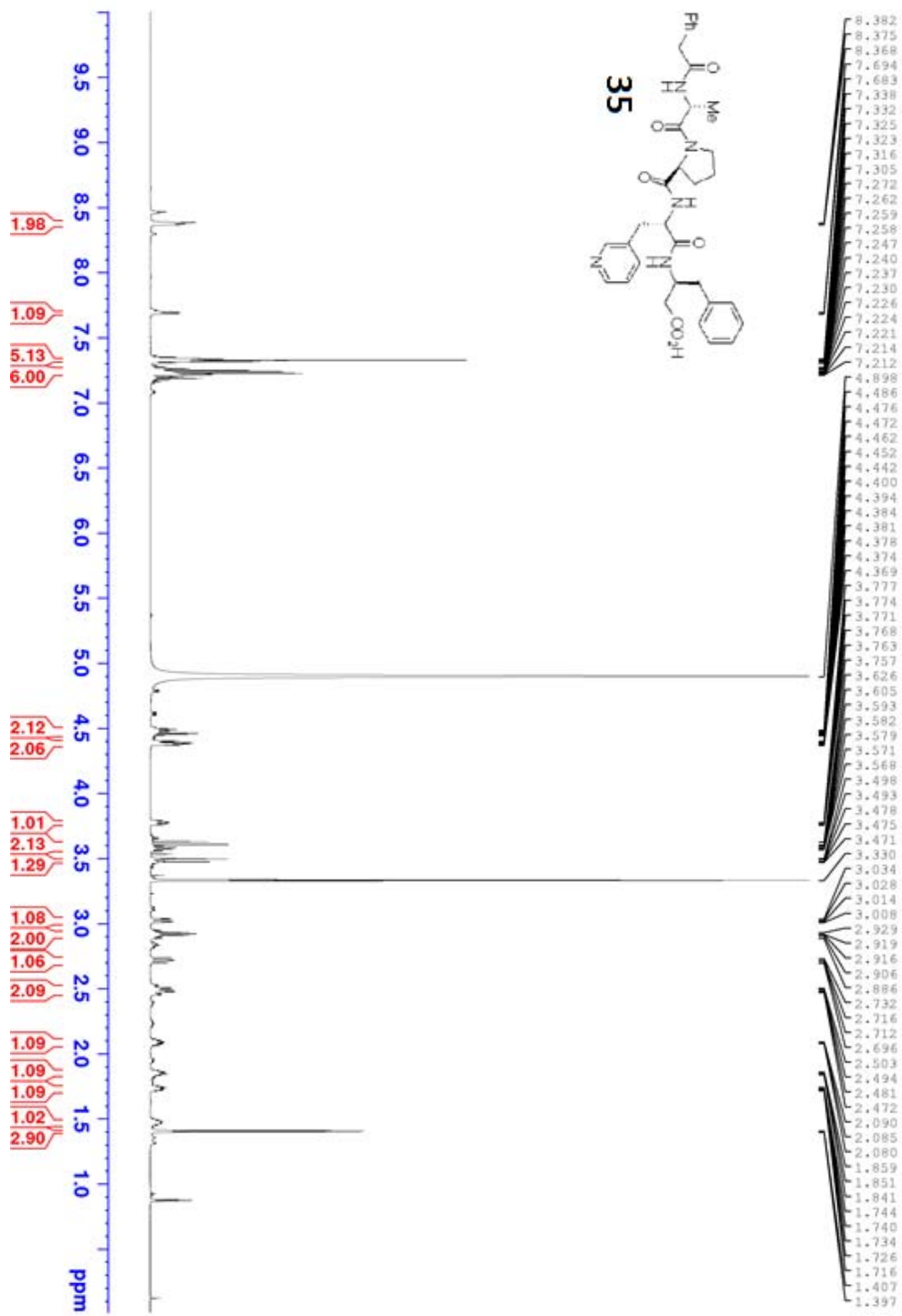


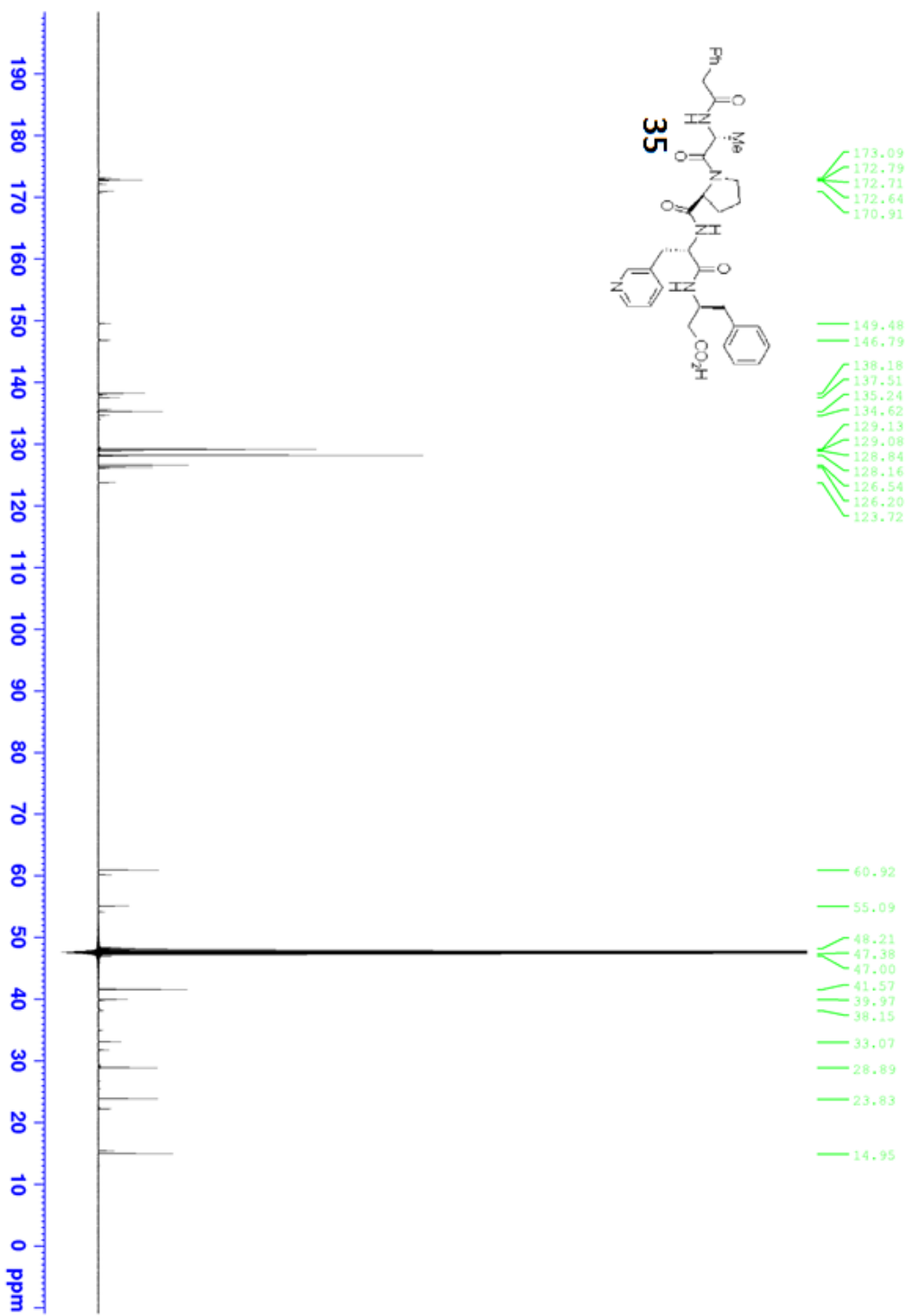


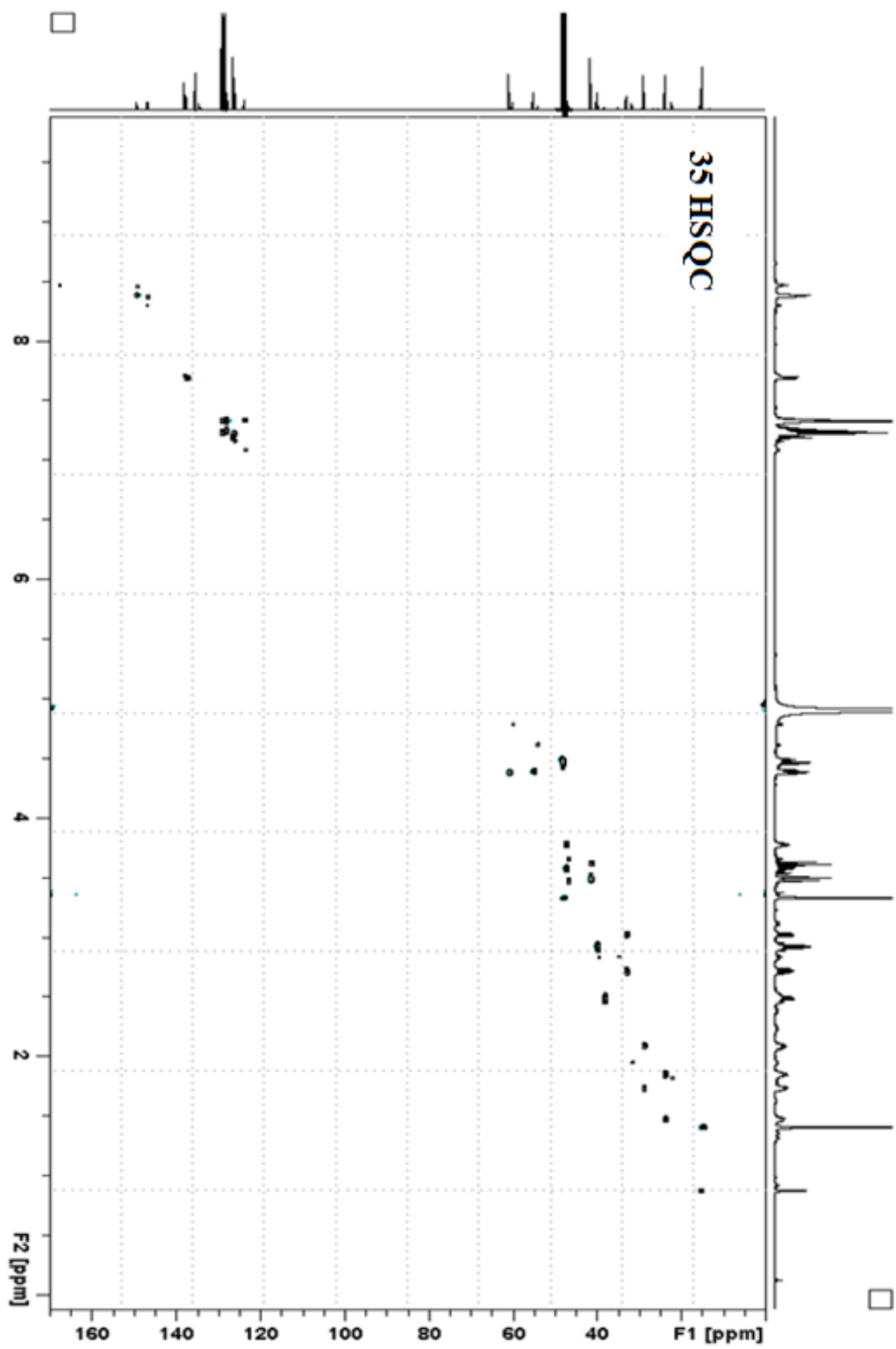


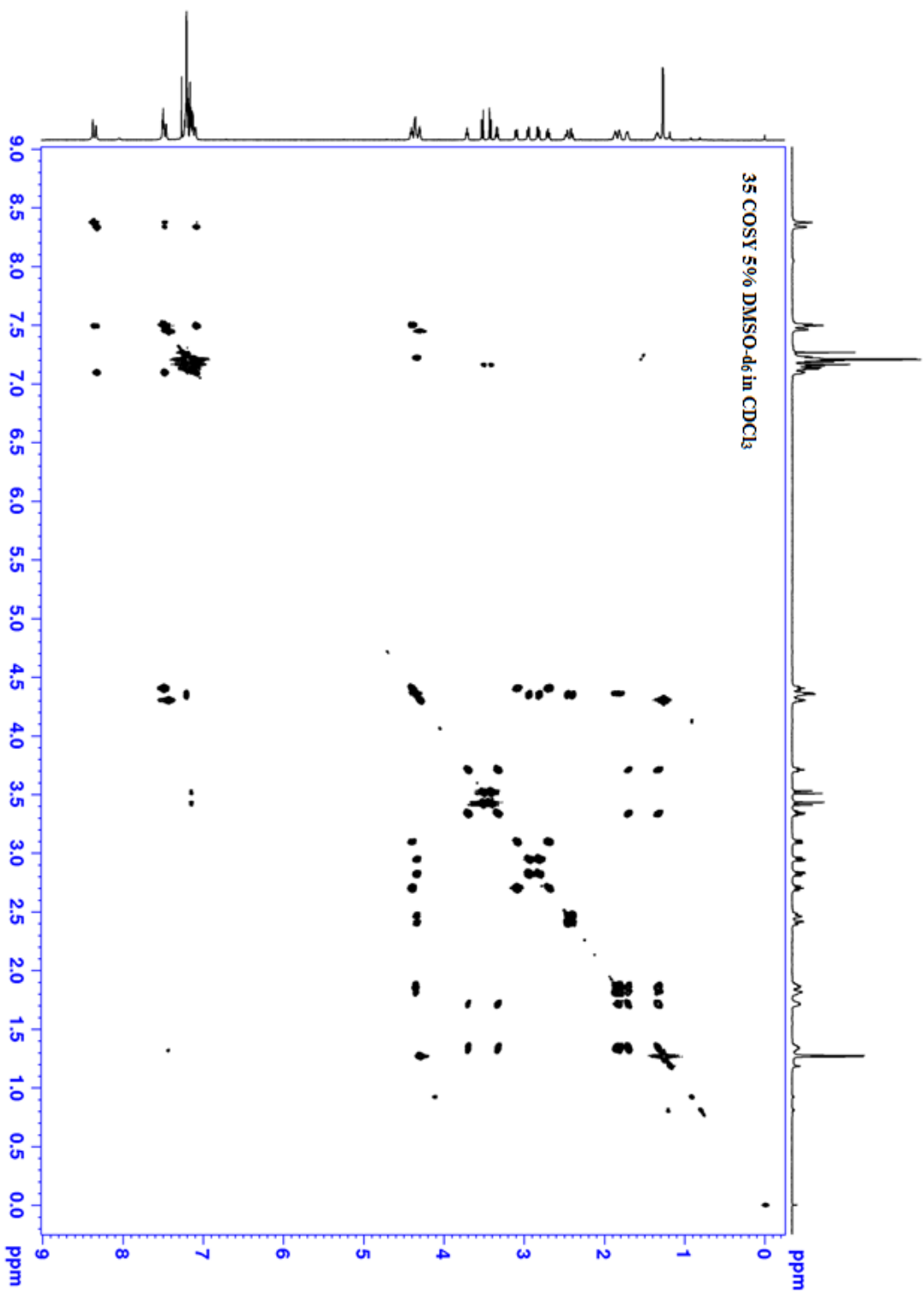


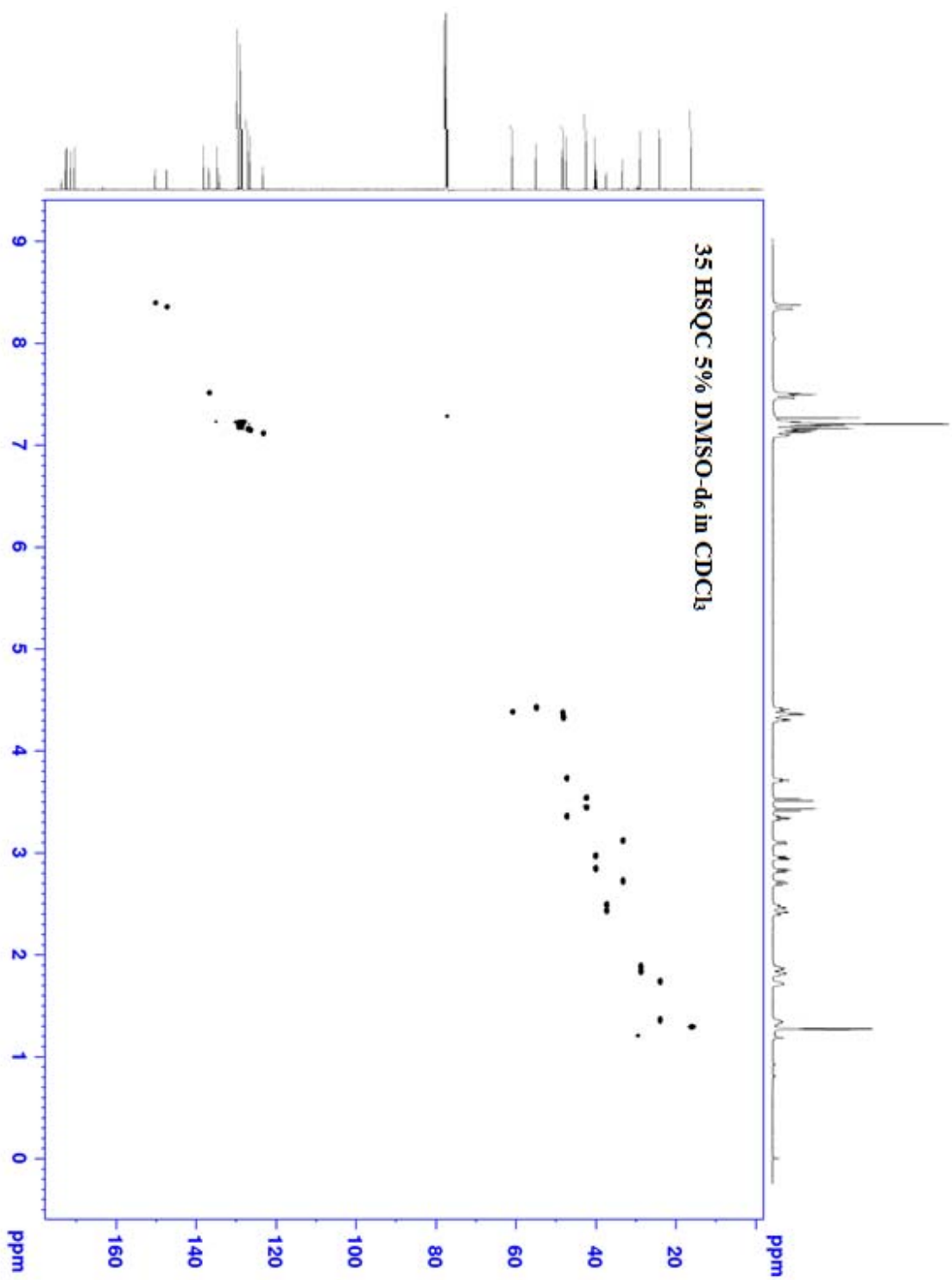




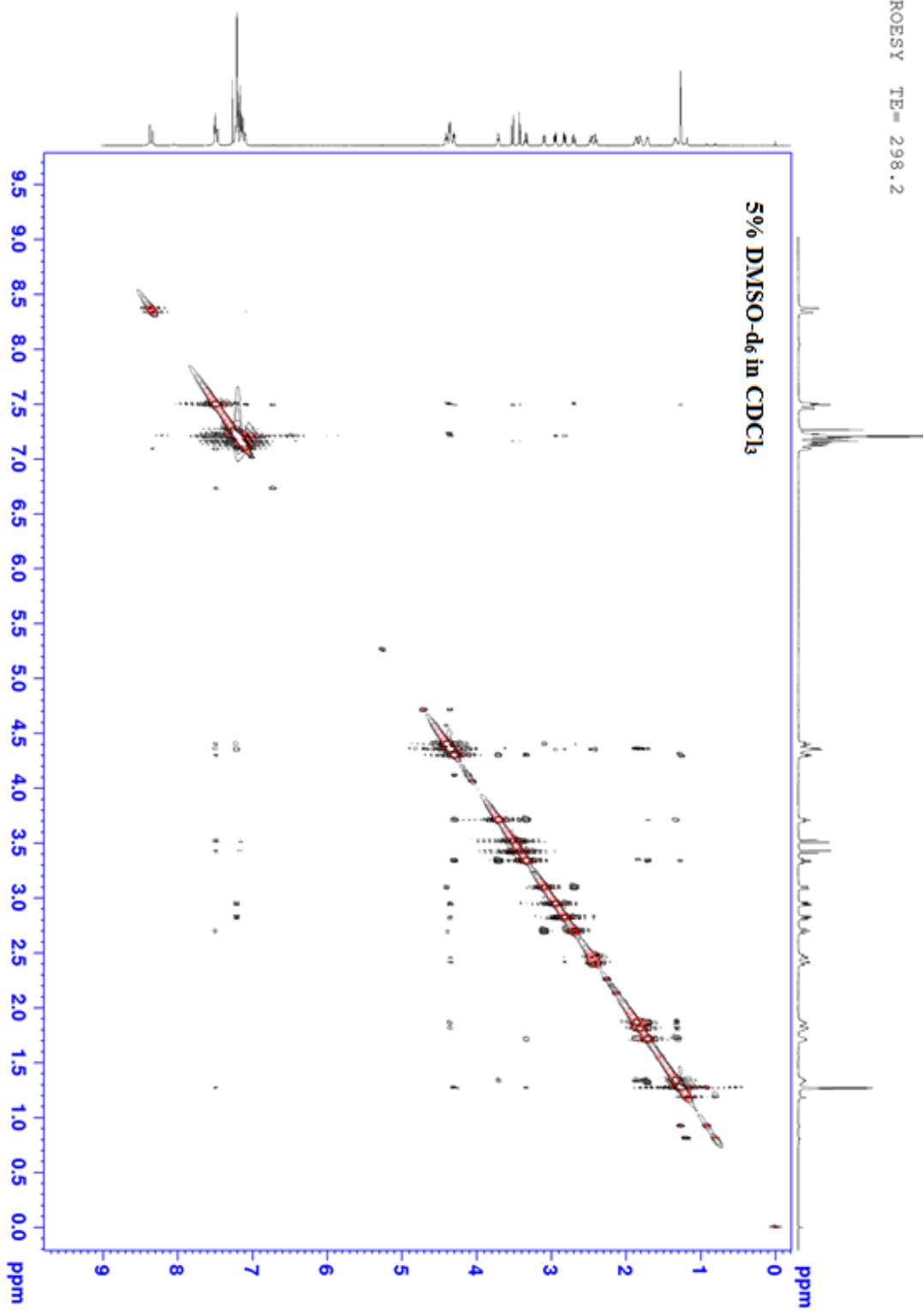


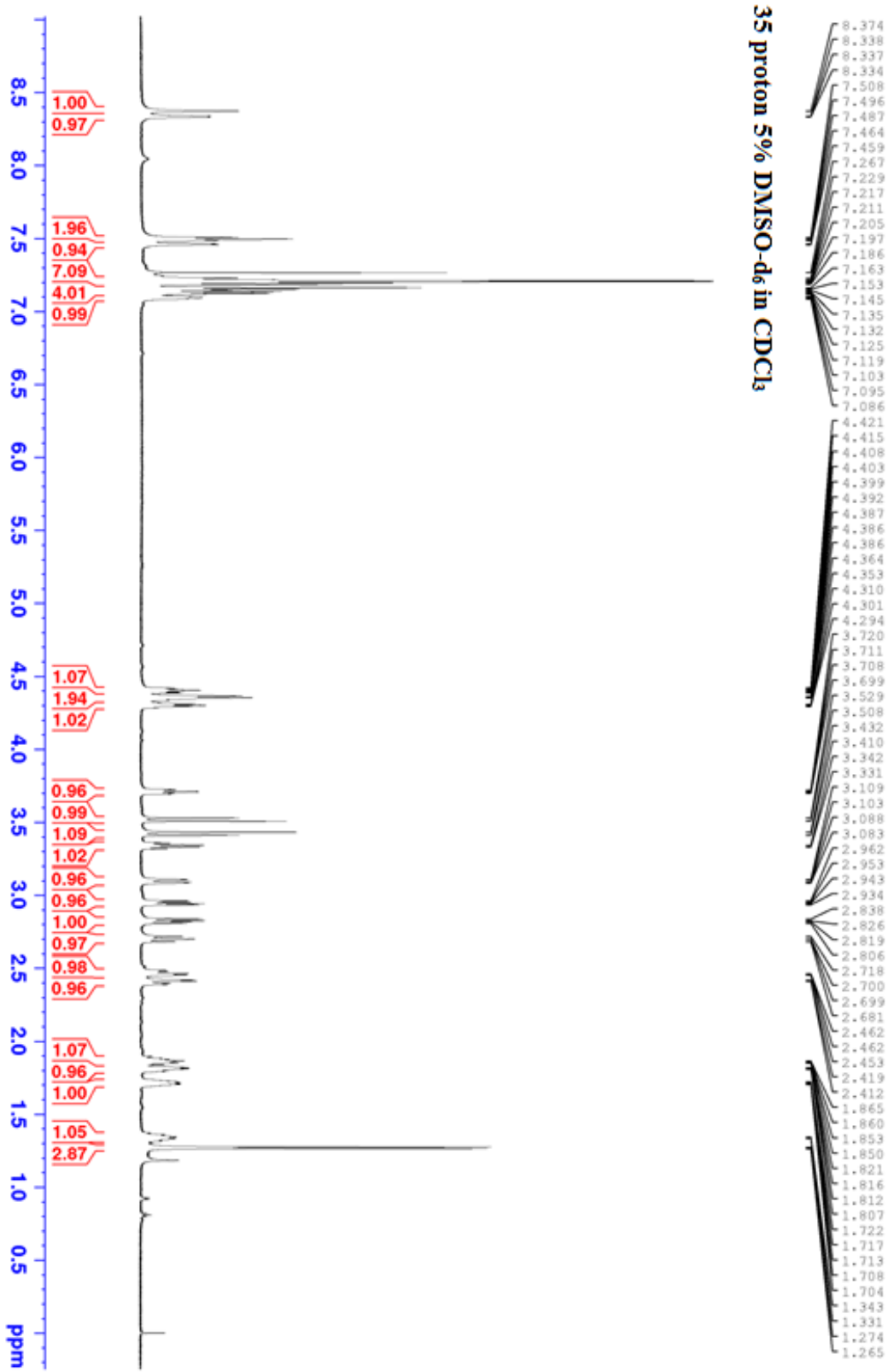


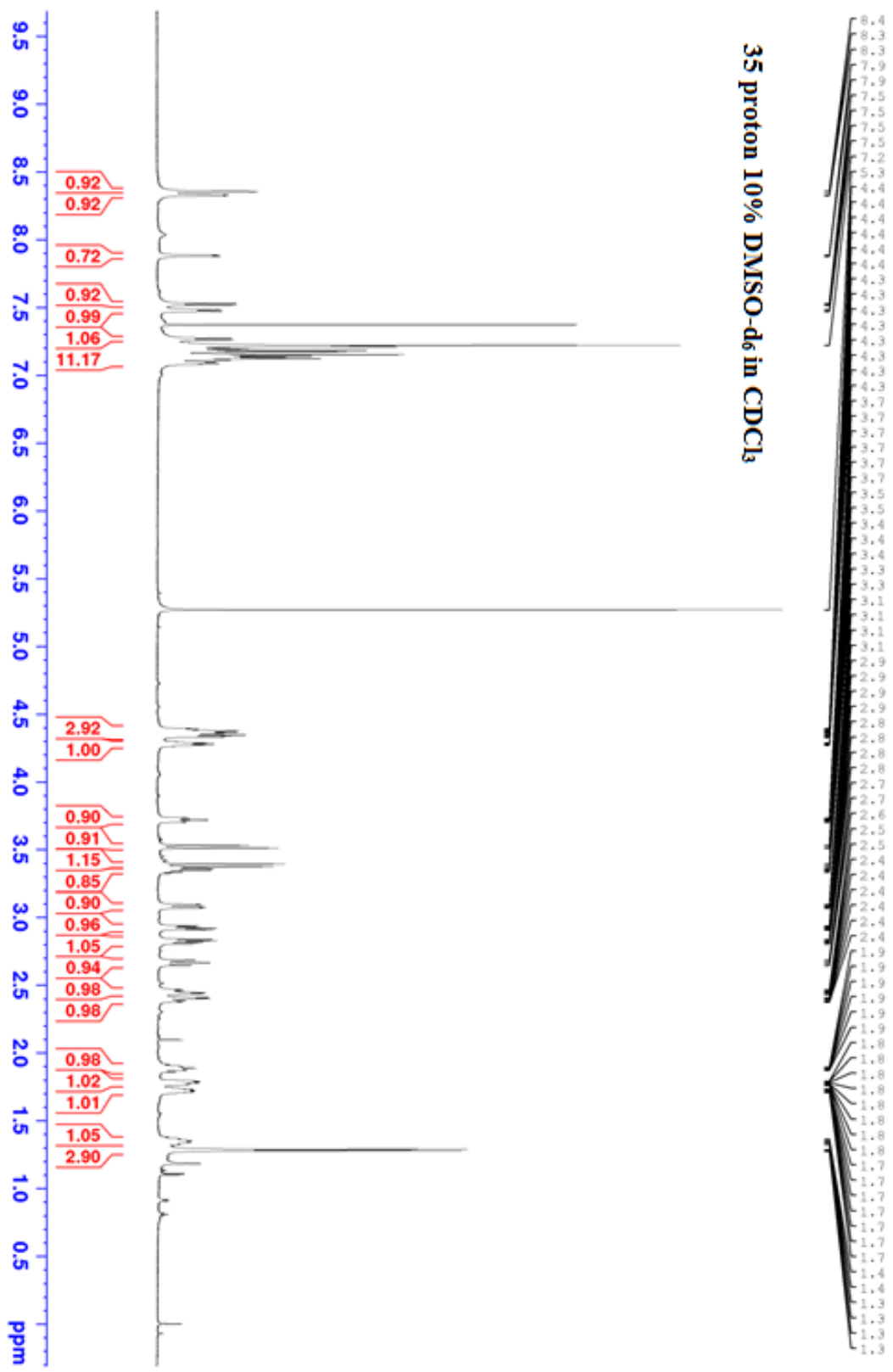


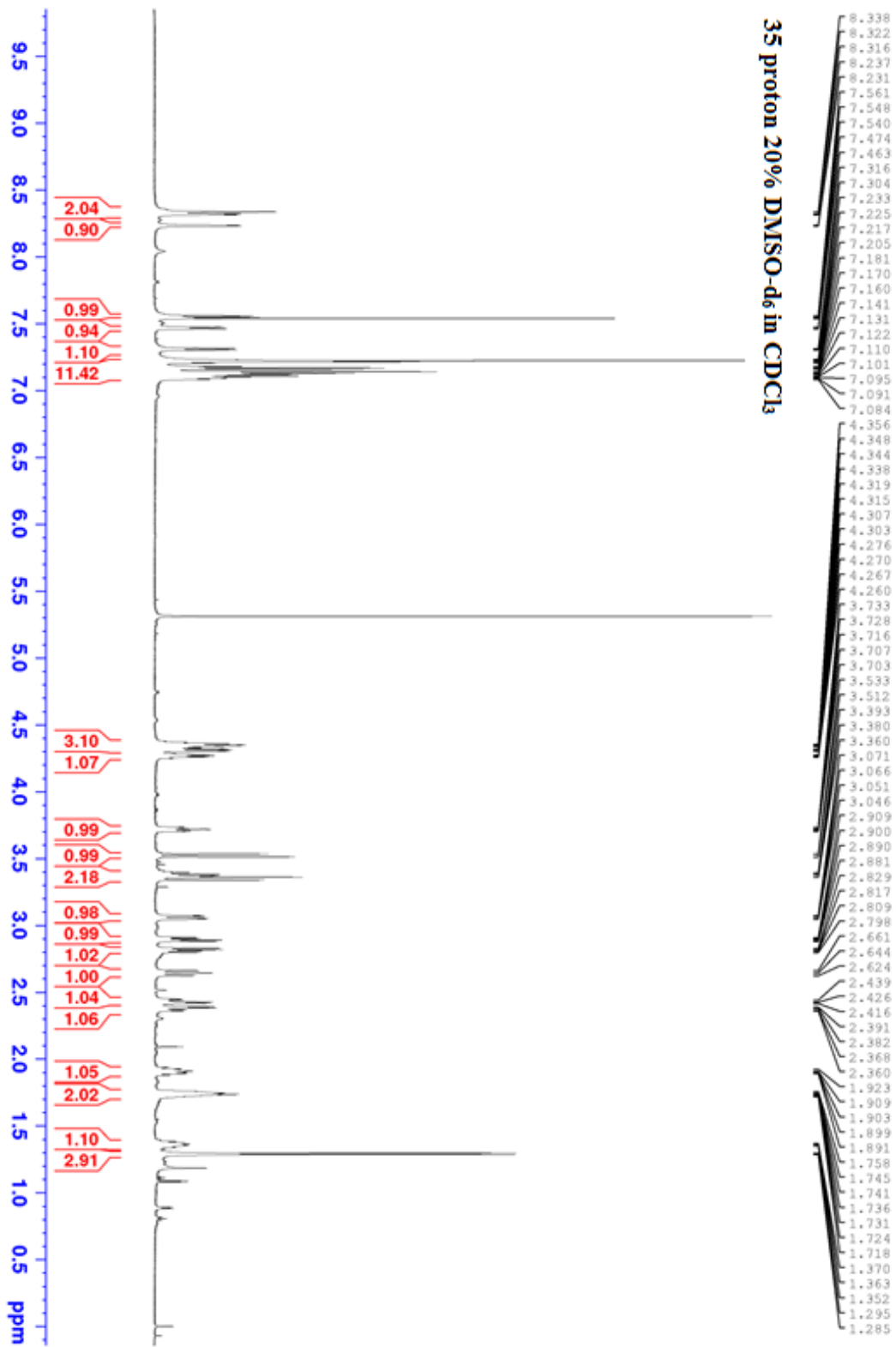


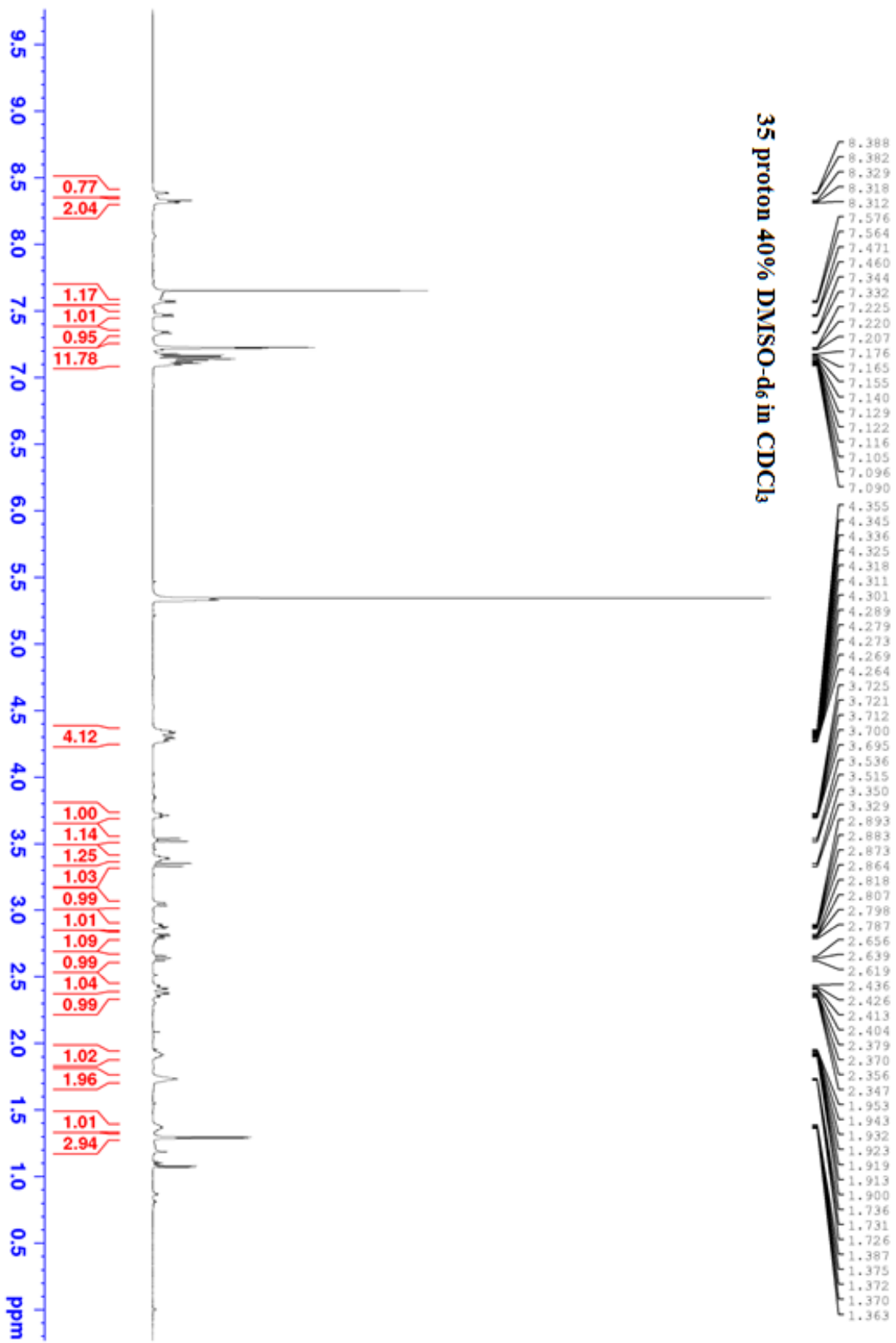
ROESY TE= 298.2

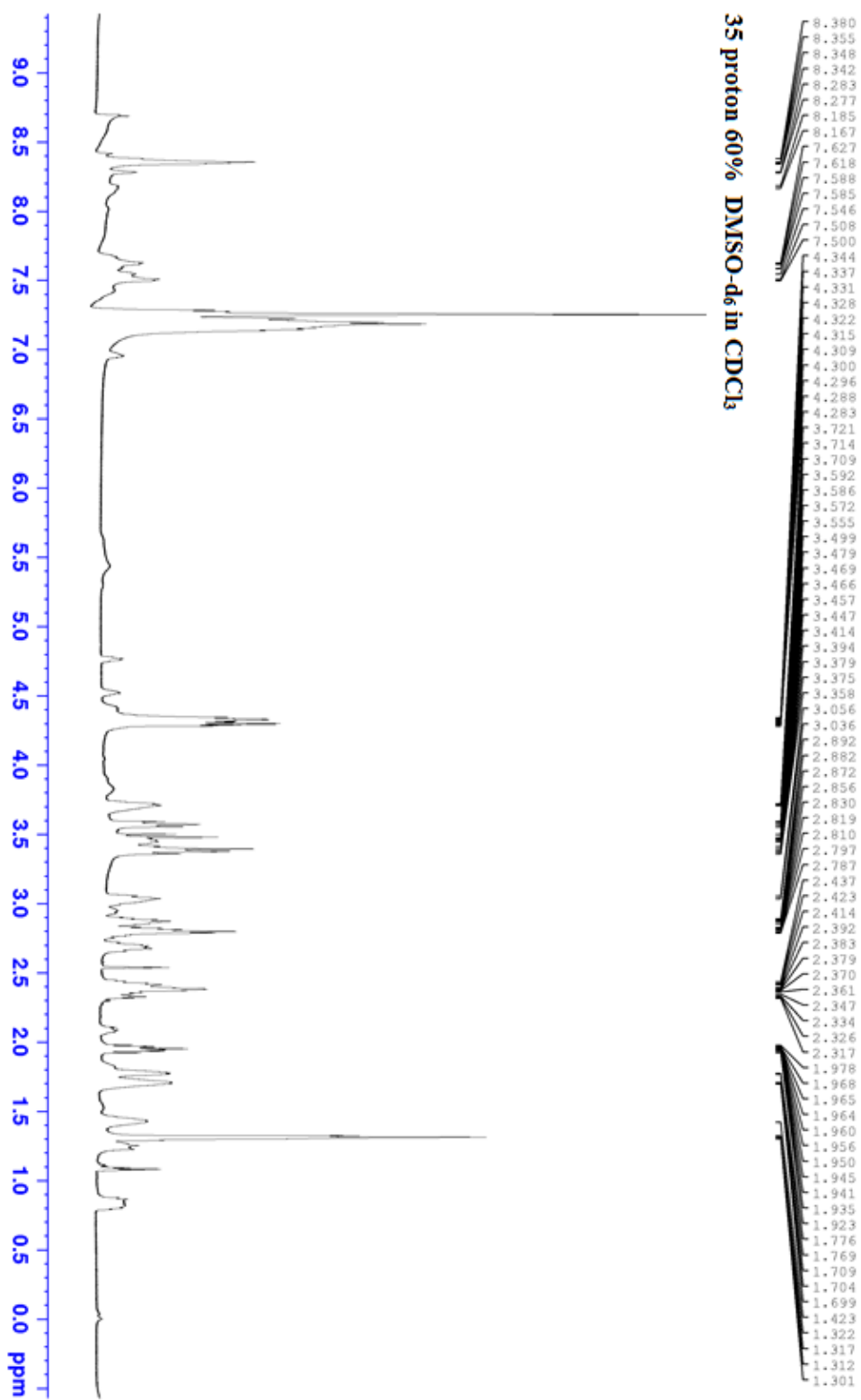


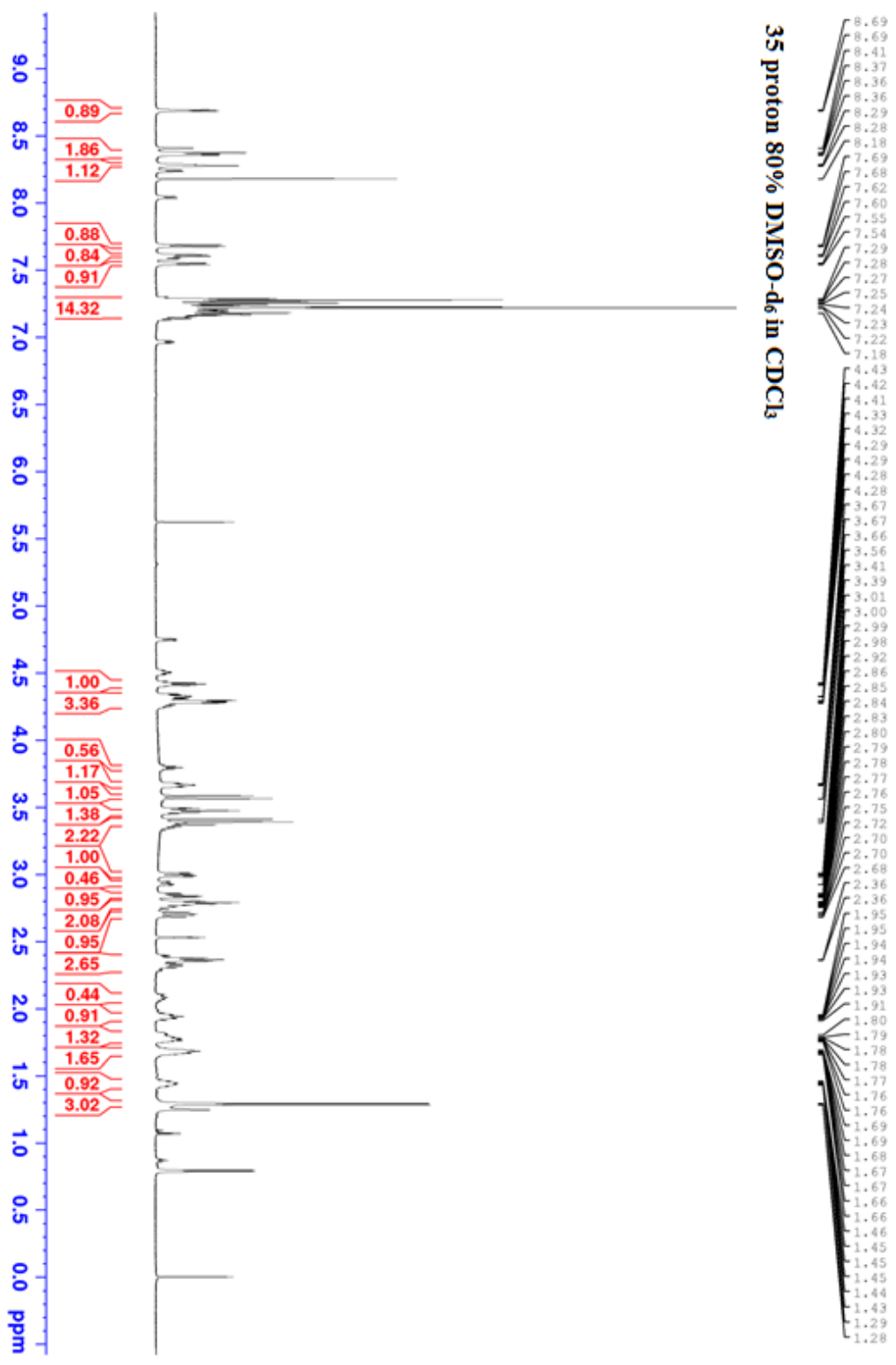


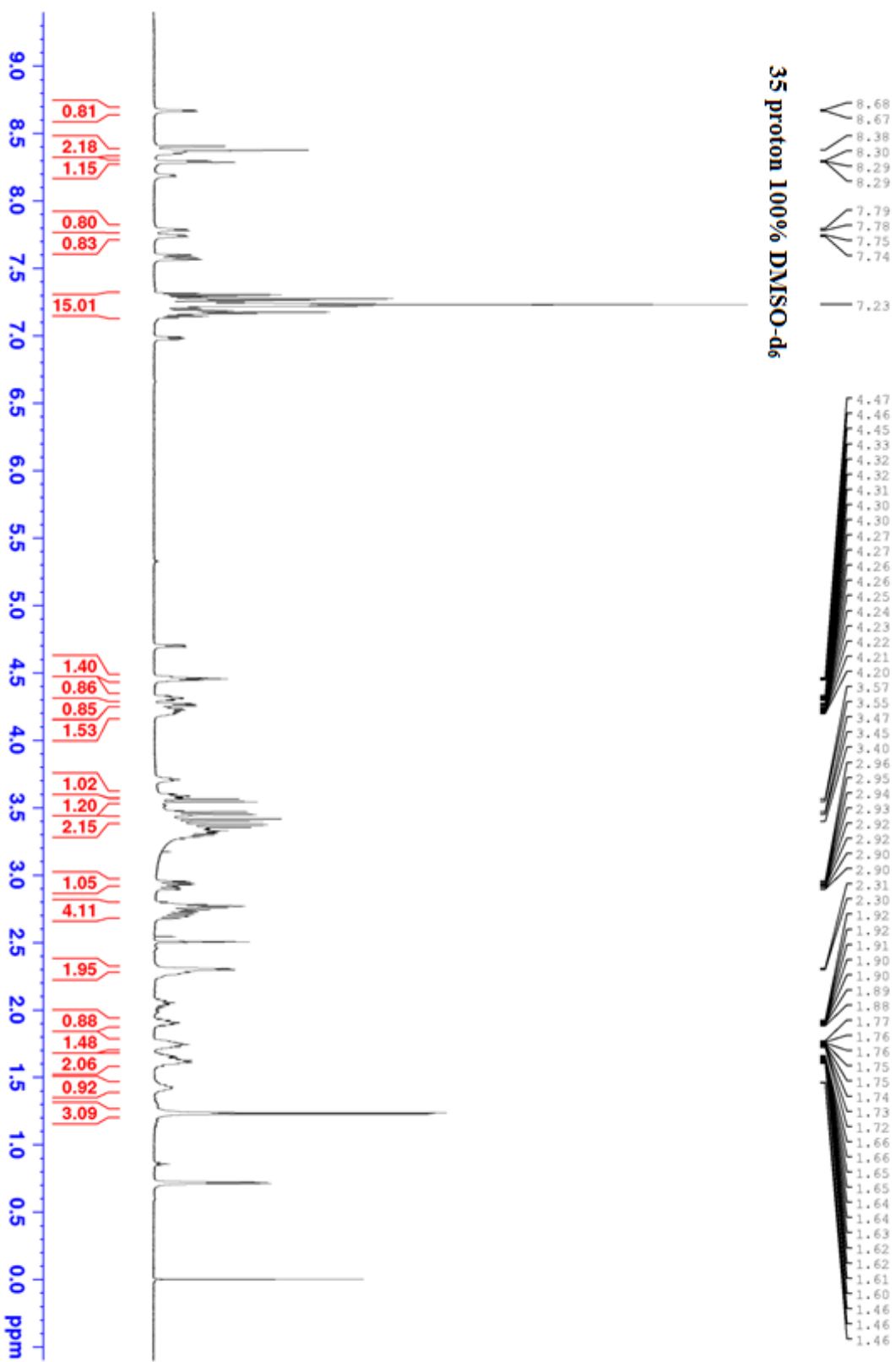




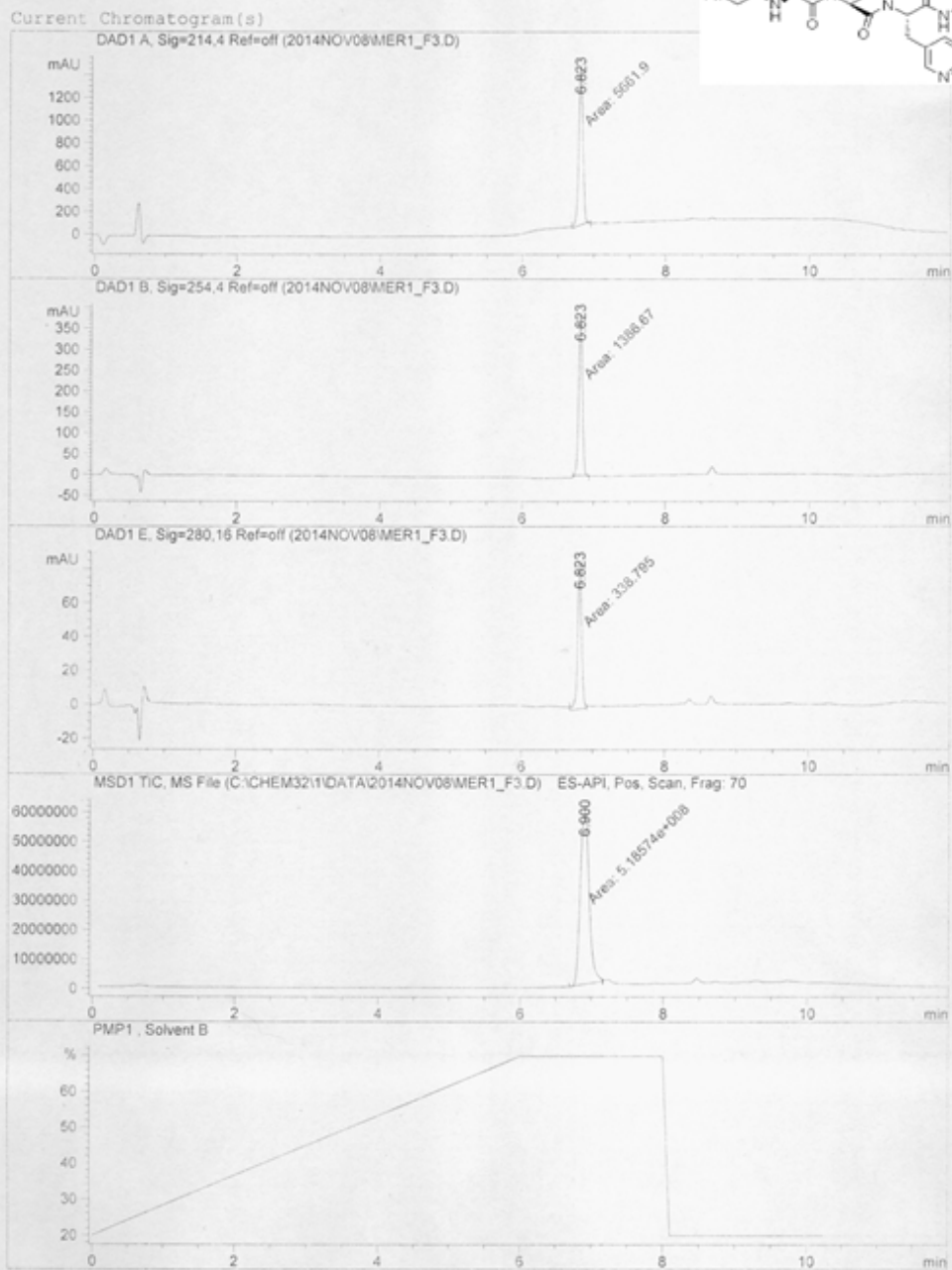
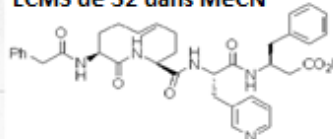




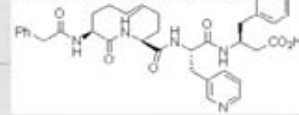




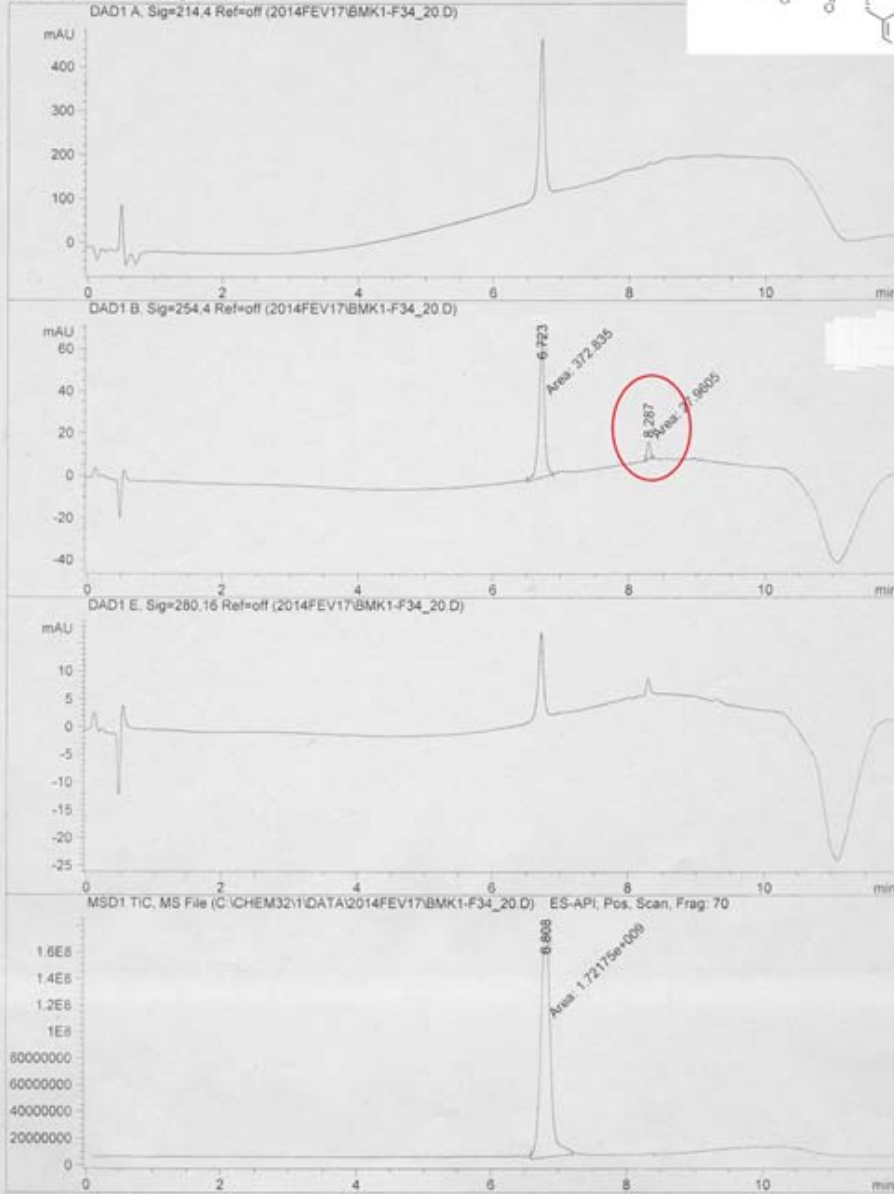
LCMS de 32 dans MeCN

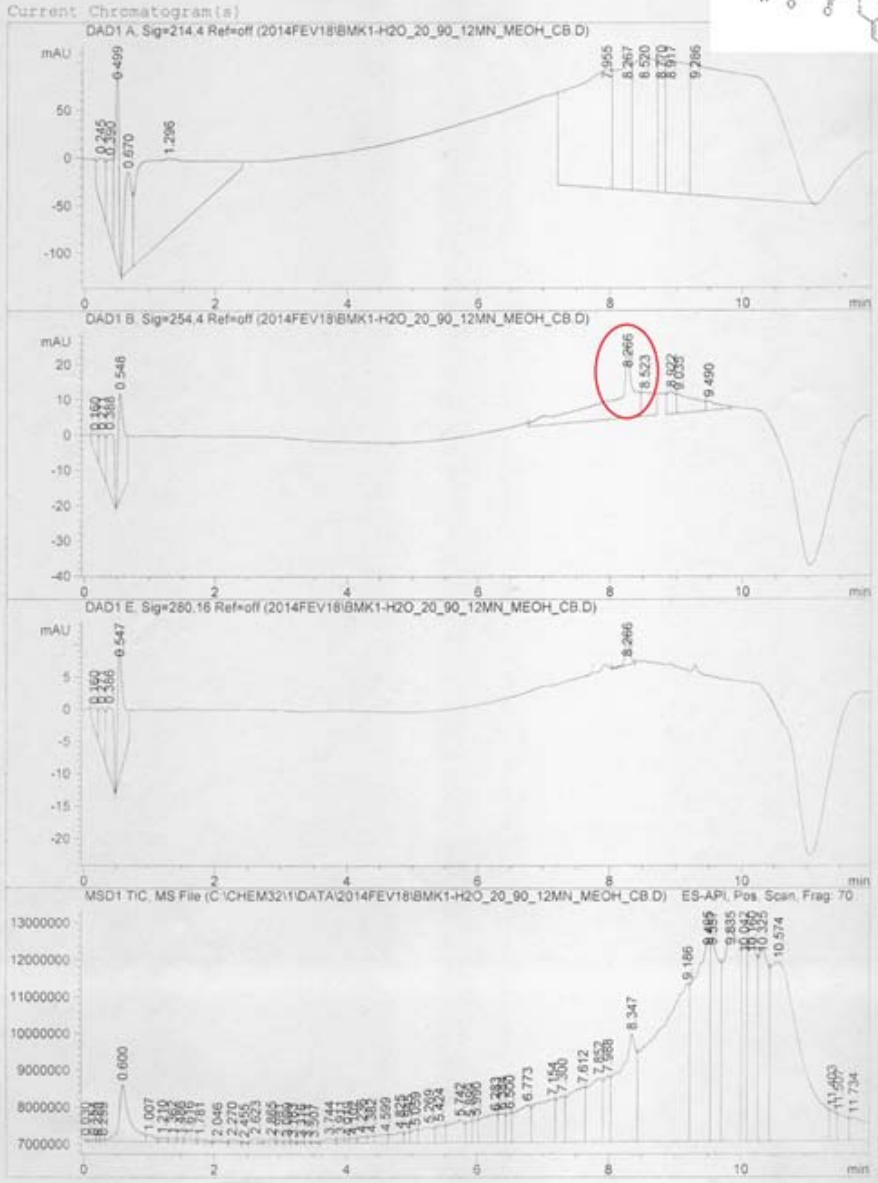
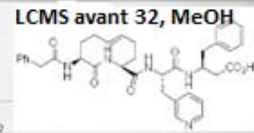


LCMS de 32 dans MeOH



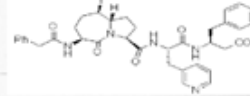
Current Chromatogram(s)



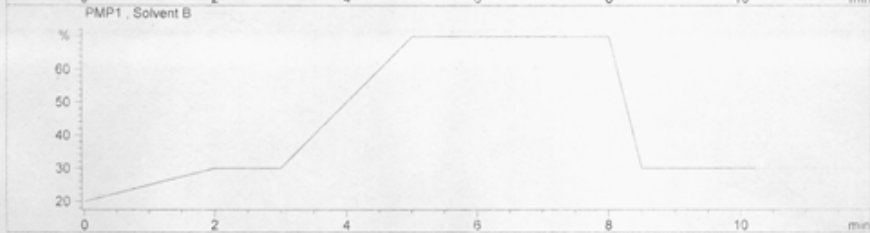
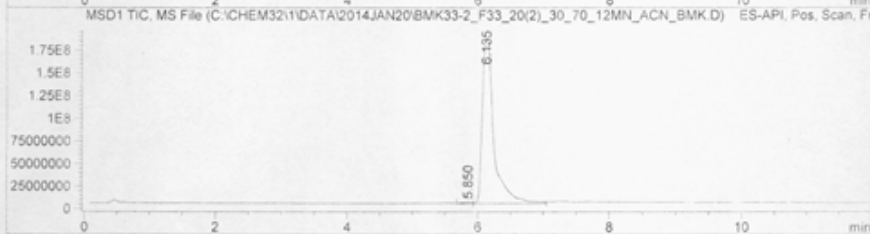
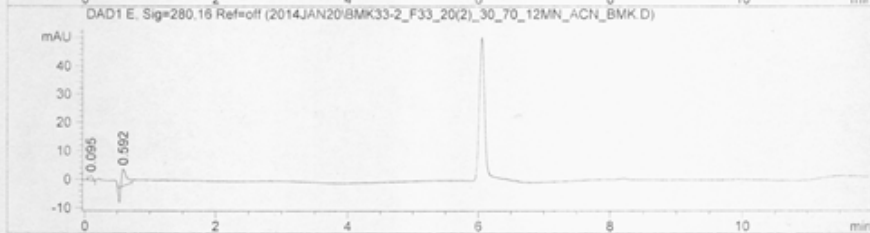
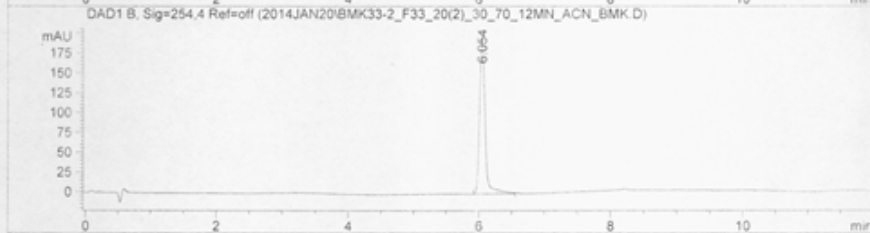
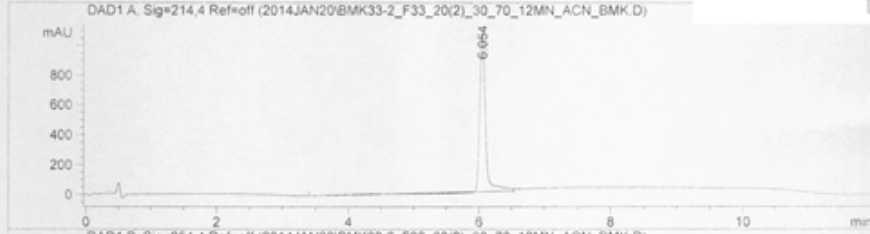


Print of window 38: Current Chromatogram(s)

LCMS de 33 dans MeCN

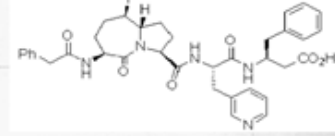


Current Chromatogram(s)

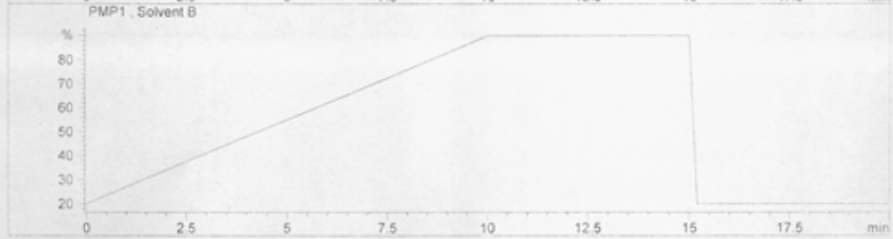
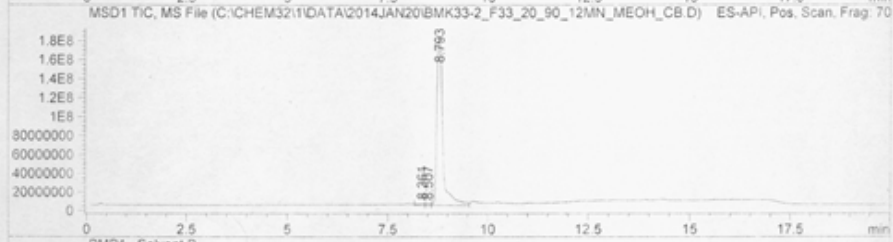
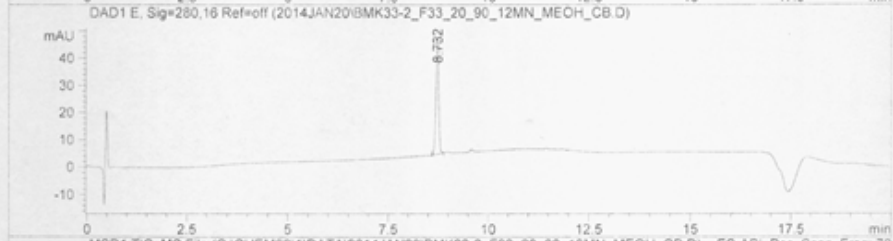
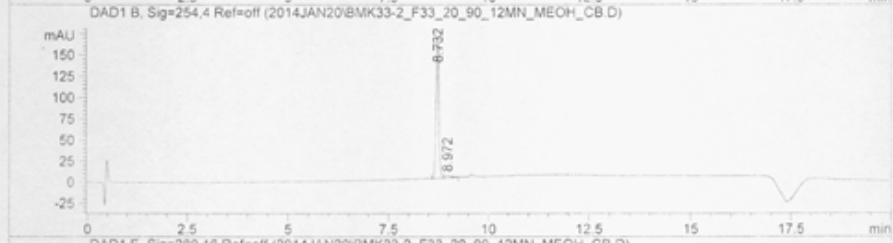
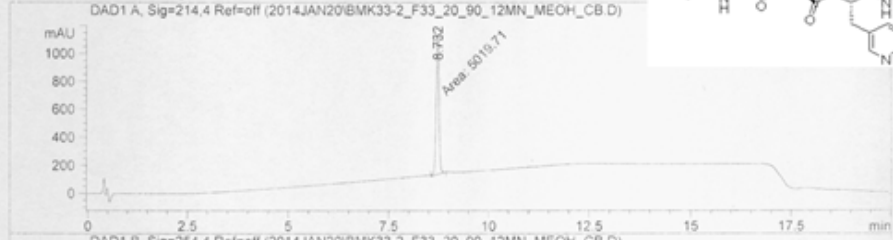


Print of window 38: Current Chromatogram(s)

LCMS de 33 dans MeOH

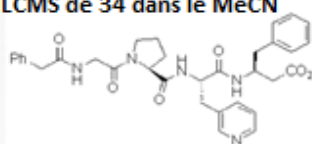


Current Chromatogram(s)



Print of window 38: Current Chromatogram(s)
 Data File : C:\CHEM32\1\DATA\2013OCT08\BMK26_43-ACN_10_50_12MN_DND.D
 Sample Name : BMK26

LCMS de 34 dans le MeCN



Acq. Operator : Seq. Line : 5
 Acq. Instrument : Instrument 1 Location : P2-B-03
 Injection Date : 10/10/2013 10:34:16 AM Inj : 1
 Inj Volume : 5 µl
 Actual Inj Volume : 2 µl
 Acq. Method : C:\CHEM32\1\METHODS\LC_10_50_12MN_ACN_D
 Last changed : 20/09/2013 6:16:22 PM by MARIAM
 Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\LC_00_20_15_MIN_MT.M
 Last changed : 19/12/2013 3:48:43 PM by carine

Current Chromatogram(s)

