Collège Doctoral du Languedoc-Roussillon

THÈSE

Pour obtenir le grade de Docteur

Délivré par l'École Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier

Préparée au sein de l'école doctorale Sciences Chimiques Balard (ED459)
Et de l'unité de recherche UMR 5253

Spécialité : **Chimie organique, minérale, industrielle**

Présentée par **Jean-Simon Suppo**

Développement d'une nouvelle stratégie de synthèse peptidique inversée

Soutenue le 9 décembre 2015 devant le jury composé de :

Dr. Vincent Aucagne, Chargé de Recherche, Université d'Orléans	Rapporteur
Pr. Anthony Romieu, Professeur des Universités, Université de Bourgogne	Rapporteur
Pr. Laurence Feray, Professeur des Universités, Aix-Marseille Université	Examinateur
Pr. Sandrine Ongeri, Professeur des Universités, Université Paris-Sud	Examinateur
Pr. Gilles Subra, Professeur des Universités, Faculté de pharmacie de Montpellier	Examinateur
Pr. Jean-Marc Campagne, Professeur des Universités, ENSCM	Directeur de thèse
Dr. Renata Marcia de Figueiredo, Chargé de Recherche, ENSCM	Encadrante de thèse

ENSCM CHIMIE Montpellier

Remerciements

A mon papy Jeannot...

A mon fils Louka

A ma filleule Loanne

Remerciements

Je remercie Monsieur Vincent Aucagne, chargé de recherche au CNRS à l'Université d'Orléans, Monsieur Anthony Romieu, Professeur des Universités à l'Université de Bourgogne, Madame Laurence Feray, Professeur des universités à l'Université d'Aix-Marseille et Madame Sandrine Ongeri, Professeur des Universités à l'Université Paris-Sud pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail, en acceptant de le juger.

Cette thèse a été réalisée au sein de l'équipe "Architectures Moléculaires et Matèriaux Nanostructurés" de l'UMR 5253 à l'Institut Charles Gerhardt de Montpellier sous la direction du Professeur Jean-Marc Campagne et du Docteur Renata Marcia de Figueiredo avec la collaboration du Professeur Gilles Subra de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron. J'aimerais les remercier pour leur encadrement, leurs encouragements et leurs conseils. Jean-Marc et Renata, merci de ne pas avoir fermé à clé les portes de vos bureaux suite à mes nombreux passages pour des questions. Merci donc pour votre disponibilité et la bonne humeur avec laquelle vous m'avez toujours accueilli. Je confirme aujourd'hui la véracité de la fameuse phrase du début de thèse: "tu verras, 3 ans, ca passe vite" et vous y avez largement contribué. Je tiens cependant à corriger une inexactitude prononcée par Jean-Marc lors du discours de fin de soutenance: Non, mes victoires récurrentes au baby-foot ne sont très certainement pas le fruit d'une quelconque bonté de ta part pour me faire plaisir.

Je tiens également à remercier Eric et Emmanuel pour leur soutien et leur sympathie. Ce fut toujours très agréable de discuter avec vous. Emmanuel, ton "orbitalophilie aigue" aura éclairé quelques-unes de mes interrogations chimiques.

Merci du fond du coeur à mes trois associés du laboratoire: Camille, Sammy et Mélanie. Merci Camille pour ton aide précieuse au laboratoire, merci d'avoir supporté mon "bordel organisé" (mais bordel quand même). N'oublie pas qu'il n'y a qu'un seul Olympique, c'est celui de Marseille. Merci Sammy, le roi de l'addition 1,4 (et plus si affinités: 1,6, 1,8..?), pour ta gentillesse et nos nombreuses discussions dont quelques-unes qu'il est difficile d'aborder ici. Merci également pour ton expertise médicale, je te dois deux jours de fièvre pour un maudit vaccin. Merci pour le temps que tu as consacré à la lecture de mon manuscrit, c'est bientot ton tour et tu vas tout déchirer cette dernière année ;) Ma petite soeur, Mélanie, je te remercie pour tout, la liste est longue, et elle peut commencer par le fait de m'avoir supporté pendant 6 ans. Merci de me rappeller depuis trois mois qu'il faut s'inscrire au chômage. Sans toi, j'aurai soutenu ma thèse sans les papiers officiels, merci de l'avoir évité. Sans toi, j'aurai aussi rédigé mon manuscrit à la main, merci de m'avoir donné quelques

ficelles concernant l'utilisation de Word. Plus sérieusement, merci pour ton amitié infaillible, je t'assure qu'elle est réciproque.

Je souhaite exprimer mes plus chaleureux remerciements à Pascale Guiffrey pour son aide au laboratoire, plus particulièrement en ce qui concerne la partie analytique. Je suis arrivé au laboratoire en survetement et j'en repars en jean, merci. Merci aussi pour ta sympathie et pour l'aide que tu as apportée à ma petite famille, je t'en serai toujours reconnaissant. Cependant, ton goût exacerbé pour le pincement de tétons me surprendra toujours (t'es rouge hein?).

J'exprime ma plus GROSSE...gratitude à Lionel Sauvigné pour sa gentillesse et son humour auquel il m'a quelque peu converti. Mes sincères remerciements pour les nombreux et très agréables moments que l'on a pu passer ensemble. Paradoxalement à ton boulot, ce fut toujours un grand plaisir de te voir « débouler » au labo.

Je souhaiterais également remercier les doctorants de l'équipe Campagne, Pierre « le chef » et Kim (ton cadeau de thèse sera un drapeau) pour les bons moments que nous avons passés au laboratoire.

Merci à tous les membres du laboratoire AM2N: Julien, Vincent, Rémi, Damien, Nicolas, Camille, Nasser, Yvette, Tahar, David, Florian, Claire (meme si elle n'est pas AM2N) pour tous les repas du midi, les apéros et pour leur gentillesse.

Merci également aux Marseillais (Cyrielle, Francois, Hugo et Domi) pour m'avoir fait l'immense plaisir d'assister à ma soutenance.

Je tiens à remercier mes amis qui ne sont pas chimistes, plus particulièrement Thomas pour ses encouragements tout au long de ces trois années. Je remercie également mes amis, ou plutôt ma famille, Pascal et Marine pour la confiance, la joie qu'ils m'apportent et pour le lien qui nous unit Samantha, Louka, Loanne, vous et moi. Merci à ma filleule, Loanne, que l'avenir te sourit et te soit radieux.

Mes pensées se tournent également vers ma famille, qui malgré l'éloignement géographique, a toujours été près de moi et m'a toujours soutenu dans mes études. Merci pour tout.

Merci à toi, Samantha, pour le bonheur que tu m'apportes au quotidien. Merci pour ta patience et ton soutien dans les moments difficiles. Merci d'être la, merci d'être toi...C'est une joie, une fierté,

un plaisir immense que de partager ta vie. Je ne te remercierai jamais assez pour ce que tu m'apportes et pour m'avoir donné le plus beau cadeau du monde. Mon fils, merci de nous combler de bonheur et de faire de ta mère et moi les parents les plus fiers et heureux du monde...Merci pour la famille que l'on forme, je vous aime...

Abbréviations

Å : ångström

Ac : acétate

ACN : acétonitrile

Act : activation

APTS : acide para-toluènesulfonique

aq : aqueux

Ar : aryle

Bn : benzyle

Boc : tert-Butoxycarbonyle

BOP : (Benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate

Bu : butyle

Bz : benzoyle

Cat. : catalyseur

Cbz : carboxybenzyle

CCM : chromatographie sur couche mince

CDI : *N*,*N*'-carbonyldiimidazole

COD : cyclooctadiène

Cy : cyclohexyle

DCA : *N*,*N*-dicyclohexylamine

DCE : 1,2-dichloroéthane

DCM : dichlorométhane

DFT : density dunctional theory

DIC : *N*,*N*'-diisopropylcarbodiimide

DIPA : Diisopropylamine

DIPEA: *N*,*N'*-Diisopropyléthylamine

DKP : dicétopipérazine

DMA : *N,N*-dimethylacetamide

DMAP : 4-diméthylaminopyridine

DMF : *N,N*-diméthylformamide

DMSO : diméthylsulfoxyde

E : énergie

EDCI : 1-éthyl-3-[3 (diméthylamino)propyl]carbodiimide

ee : excès énantiomérique

éq. : équivalent

Et : éthyle

ESI : electrospray ionization

Fm : 9-fluorénylméthoxycarbonyle

GP : groupement partant

GSH/GSSG : glutathione redox system

HATU : 1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate

HGF : Hepatocyte growth factor

HMPA : hexaméthylphosphoramide

HOBt : 1-Hydroxybenzotriazole

HPLC : high performance liquid chromatography

HRMS : high-resolution mass spectrometry

Hz : hertz

IR : infrarouge

J : constante de couplage

K_a : constante d'acidité

KAHA : α-ketoacid-hydroxylamine

KAT : potassium acyltrifluoroborate

kJ : kilojoules

LA/AL : acide de Lewis

LC/MS : liquid chromatography/mass spectrometry

M : métal

M : masse moléculaire

Me : méthyle

MOM : méthoxyméthyle

mp : melting point

MPAA : 4-mercaptophenylacetic acid

NBS : *N*-bromosuccinimide

NCA : *N*-carboxyanhydride

NCL : native chemical ligation

Abbréviations

NHC : *N*-hétérocyclique

NIPS : new inverse peptide synthesis

NIS : *N*-iodosuccinimide

p*: *para

P : groupement protecteur

Pent : pentane

PBS : phosphate buffered saline

Ph : phényle

pH : potentiel hydrogène

Phta : phtaloyle

$pK_a = -\log K_a$

PS : polystyrène

PyBOP : benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate

Pyr : pyridine

Quant. : quantitatif

Rdt. : rendement

RMN : résonance magnétique nucléaire

RX : rayons X

SEA : bis(2-sulfanylethyl)amino

SEM : 2-(Trimethylsilyl)ethoxymethyl

SN : substitution nucléophile

SN_{Ar} : substitutition nucléophile aromatique

SPPS : solid phase peptide synthesis

t. a. : température ambiante

*t*Bu : tert-butyle

TCEP : tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride

T_{eb} : température d'ébullition

Tf : triflate

TFA : acide trifluoroacétique

THF : tétrahydrofurane

TIS : triisopropylsilane

THF : tétrahydrofurane

TIPS : triisopropylsilyle

TM : tamis moléculaire

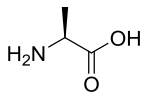
Tol : toluène

Tr : trityle

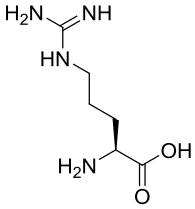
Ts : tosyle

UV : Ultraviolet

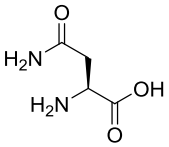
Les acides α-aminés



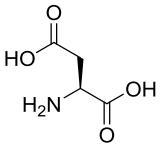
Ala (A)



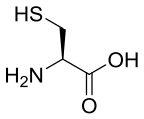
Arg (R)



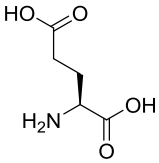
Asn (N)



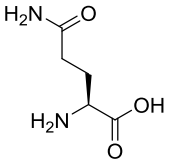
Asp (D)



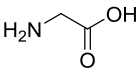
Cys (C)



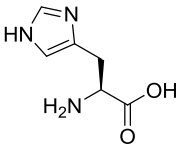
Gly (E)



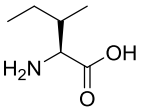
Gln (Q)



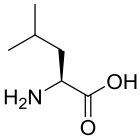
Gly (G)



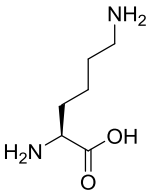
His (H)



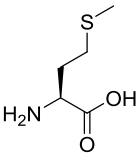
Ile (I)



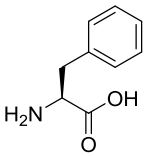
Leu (L)



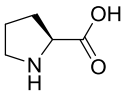
Lys (K)



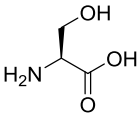
Met (M)



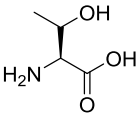
Phe (F)



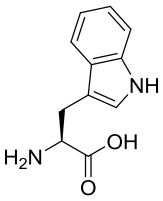
Pro (P)



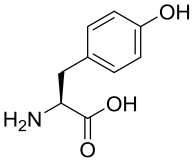
Ser (S)



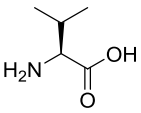
Thr (T)



Trp (W)



Tyr (Y)



Val (V)

Chap. I : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. La synthèse peptidique 3

I.1 Synthèse peptidique en solution: Généralités 3

I.2 Formation de la liaison peptidique 4

II. Les méthodes de couplage dites « classiques » 5

II.1 Les agents de couplage peptidique 6

II.1.1 La racémisation 8

III. Les méthodes d'amidation dites « non-classiques » 14

III.1 Création de liaisons peptidiques 15

III.1.1 Native Chemical Ligation (NCL) 15

III.1.2 KAHA Ligation 22

III.1.3 KAT Ligation 27

III.1.4 Ligation de Staudinger 30

III.1.5 Conclusion 35

III.2 Création de liaisons amides « simples » 35

III.2.1 Amidation catalytique d'acides carboxyliques 36

III.2.2 Amidation oxydante d'alcools catalysée par les métaux 44

III.2.3 Stratégie umpolung 50

III.2.4 Dérivés isocyanates 57

IV. Conclusion 62

I. Projet NIPS (New Inverse Peptide Synthesis) 63

I.1 Concept du projet : activation de l'amine 63

I.2 Activation de l'amine : les intérêts potentiels 63

I.3 Activation de l'amine : de quelle manière ? 66

II. Rappels bibliographiques 67

II.1 Conclusion 75

I. Résultats préliminaires : travaux antérieurs du laboratoire 76

I.1 Recherche d'un réactif capable d'activer l'amine 76

I.1.1 Utilisation du chloroformate de paranitrophénol 76

I.1.2 Utilisation du *N*, *N*' Carbonyldiimidazole (CDI) avec iodométhane 77

I.1.3 Conclusion 81

II. Utilisation du *N*, *N*' Carbonyldiimidazole (CDI) sans iodométhane 82

II.1 Introduction 82

II.1.1 Rôle de l'iodométhane 82

II.1.2 Tentatives de couplage en l'absence d'iodométhane 83

II.1.3 Étendue et limites de la réaction 85

II.1.4 Conclusion 95

II.1.5 Étude de la racémisation 97

II.1.6 Synthèse d'un tétrapeptide dans le sens naturel (N→C) 105

II.1.7 Synthèse à plus grande échelle 112

II.1.8 Essais de couplages par fragments 117

II.1.9 Développement d'une réaction monotope 120

II.1.10 La synthèse sur support solide (SPPS) 124

II.1.11 Aspect mécanistique de la réaction 138

I. Protection de l'acide carboxylique sous forme d'ester silylé 154

I.1. Introduction 154

I.2. Essais préliminaires 155

I.3. Étendue de la réaction 158

- **Synthèse d'esters silylés O-SEM :** 158
- **Synthèse d'esters silylés O-TIPS :** 159

II. Stabilité des composés O-SEM et O-TIPS dans les conditions de déprotection de la fonction amine en synthèse peptidique 160

III. Etude de la déprotection des esters silylés O-SEM et O-TIPS 163

IV. Application en synthèse peptidique 165

V. Conclusion 168

Sommaire

General informations..... 174

Introduction générale

La multitude de molécules présentes dans la nature et les êtres vivants regorge de différents groupements fonctionnels. Parmi ces derniers, la fonction amide, omniprésente, elle est notamment la fonction constitutive des peptides et protéines. Ces molécules sont constituées d'acides α-aminés reliés entre eux par une liaison peptidique (amide).

Les peptides présentent un intérêt particulier en chimie médicinale, tant leur toxicité est faible et leur spécificité bonne. De plus, il a été montré que la création de liaisons amides représente 16% des réactions utilisées en chimie médicinale, ce qui fait d'elle la plus utilisée.[1] Au-delà de l'intérêt thérapeutique porté aux peptides, ces derniers sont également utilisés dans les hydrogels[2] et la conception de soie artificielle.[3] Par conséquent, ils présentent un intérêt certain pour les industriels[4] et la « formation de liaison amide avec économie d'atomes » a été considérée comme une aire de recherche prioritaire.[5] Ces dernières décennies, les peptides et la synthèse peptidique ont connu un essor considérable.[6]

Traditionnellement, une liaison peptidique est construite à partir de l'acide carboxylique d'un premier acide α-aminé et l'amine d'un second acide α-aminé. Formellement, cette réaction ne produit qu'un équivalent d'eau, mais la faible réactivité de l'acide carboxylique vis-à-vis de l'amine nécessite son activation. De nombreux travaux ont été réalisés dans ce sens permettant l'émergence d'une multitude d'agents de couplages peptidiques.[7] Malgré leur très grande efficacité, ces derniers sont dotés d'une masse moléculaire élevée et par conséquent les réactions sont à faible économie d'atomes.[8] De plus, l'utilisation de cette stratégie d'activation induit le sens de la synthèse peptidique de la fonction acide carboxylique terminale vers la fonction amine terminale afin d'éviter les phénomènes d'épimérisation.

Dans ce contexte, différentes alternatives ont été développées pour permettre la création de liaisons amides tout en s'affranchissant de l'activation de l'acide carboxylique.

Le travail présenté dans ce manuscrit concerne le développement d'une nouvelle méthodologie de synthèse peptidique innovante mettant en jeu l'activation de la fonction amine devant non seulement permettre la synthèse de peptides dans le sens ribosomal (de l'amine terminale vers

---

[1] S. D. Roughley, A. M. Jordan, *J. Med. Chem*. **2011**, 54, 3451-3479.
[2] R. P. Nagarkar, J. P. Schneider, *Methods Mol. Biol*. **2008**, 474, 61.
[3] Y. Hidaka, K. I. Kontani, R. Taniguchi, M. Saiki, S. Yokoi, K. Yukuhiro, H. Yamaguchi, M. Miyazawa, *Biopolymers (Peptide Science)*, **2011**, 96, 222-227.
[4] a) « Therapeutic peptides under the spotlight »: C. Pichereau, C. Allary in *European Biopharmaceutical Review (EBR)*, January **2005**; b) P. Verhaert, *EuPA Open Proteomics* **2014**, 4, 58-69.
[5] D. J. C. Constable, P. J. Dunn, J. D. Hayler, G. R. Humphrey, J. L. Leazer, R. J. Linderman, K. Lorenz, J. Manley, B. A. Pearlman, A. Wells, A. Zaks, T. Y. Zhang, *Green Chem*, **2007**, 9, 411-420.
[6] T. Kimmerlin, D. Seebach, *J. Peptide. Res*. 65, **2005**, 229-260.
[7] A. El-Faham, F. Albericio, *Chem. Rev*. **2011**, 111, 6557-6602.
[8] B. M. Trost, *Science* **1991**, 254, 1471-1477.

l'acide carboxylique terminal), mais également de s'affranchir, au moins en partie, des inconvénients inhérents au mode d'activation classique.

I. La synthèse peptidique

En 1901, Fisher décrit la préparation du premier dipeptide glycine-glycine par hydrolyse acide de la dicétopipérazine (DKP) correspondante.[9] Il réussira quelques années plus tard, en 1907, à effectuer la synthèse de composés contenant plus de 10 acides α-aminés.[10] Ces travaux marquent le départ de la synthèse peptidique, l'émergence de différentes stratégies de protection[11] et de nouveaux agents de couplage. Par ailleurs, l'apparition en 1963, de la méthode de synthèse sur support solide élaborée par Merrifield (prix Nobel en 1984) a révolutionné la synthèse peptidique, en permettant la synthèse de longs peptides (jusqu'à 50 acides α-aminés) tout en s'affranchissant des étapes intermédiaires de purification.[12]

Depuis, la chimie peptidique n'a cessé d'évoluer et la synthèse de très longs peptides ainsi que des petites protéines est aujourd'hui possible.

I.1 Synthèse peptidique en solution: Généralités

La synthèse peptidique repose sur la formation répétitive d'une liaison amide impliquant différents acides α-aminés. Pour ce faire, de nombreux paramètres sont à prendre en considération, à savoir la nature des acides α-aminés (leurs chaînes latérales), la longueur du peptide à synthétiser... Ces paramètres vont ainsi déterminer la stratégie de synthèse à adopter (synthèse pas-à-pas, ligation, synthèse sur support solide…).

Le second point important en synthèse peptidique concerne la nature des groupements protecteurs à utiliser. Les fonctions chimiques portées par la chaîne latérale, si elles sont susceptibles de réagir de quelconque manière, doivent être rendues « non-réactives ». Par conséquent, les groupements protecteurs sont indispensables afin d'éviter l'obtention de produits non-désirés. De plus, ces derniers doivent être orthogonaux à ceux des fonctions acide carboxylique et amine de la chaîne principale de l'acide α-aminé.

[9] E. Fisher, *Beritche der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1901**, 34, 2868-2877.

[10] a) E. Fisher, *Beritche der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1907**, 40, 1754-1767. b) E. Fisher, *Beritche der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1907**, 40, 2048-2061. c) E. Fisher, *Beritche der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1907**, 40, 943-957.

[11] (a) M. Bergmann, *Beritche der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1932***,* 65B, 1192-1201. (b) L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc*. **1957**, 79, 4427-4430. (c) F. C. McKay, N. F. Albertson, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 4686-4690.

[12] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc*. **1963**, 85, 2149-2154.

I.2 Formation de la liaison peptidique

Idéalement, la formation d'une liaison peptidique s'effectue en présence d'une fonction acide carboxylique et d'une fonction amine en générant une molécule d'eau comme seul sous-produit de la réaction. Cependant, en conditions douces, cette réaction conduit seulement à la déprotonation de l'acide carboxylique par l'amine. Afin de franchir la barrière énergétique nécessaire à la formation de l'amide, de hautes températures sont nécessaires (>100 °C), rendant cette méthodologie inapplicable en synthèse peptidique (Schéma 1).

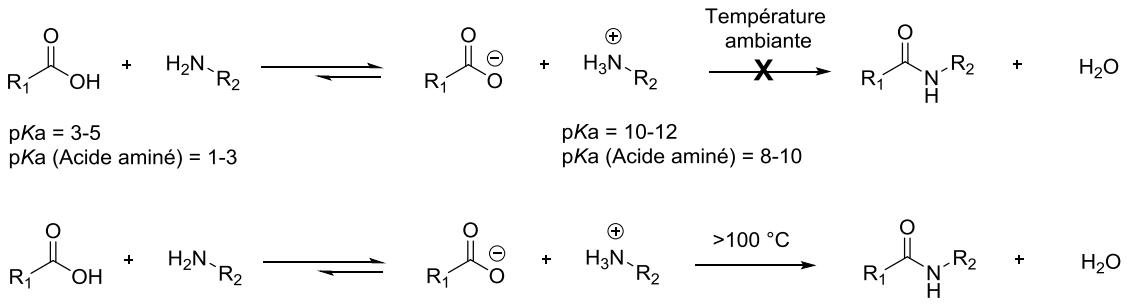


Schéma 1 : Condensation thermique d'une amine et d'un acide carboxylique

Afin de pallier ce problème, le passage par un acide carboxylique activé (ester activé, halogénure d'acide, anhydride…) est la méthode de choix pour permettre la formation de la liaison peptidique à température ambiante (Schéma 2).[7]

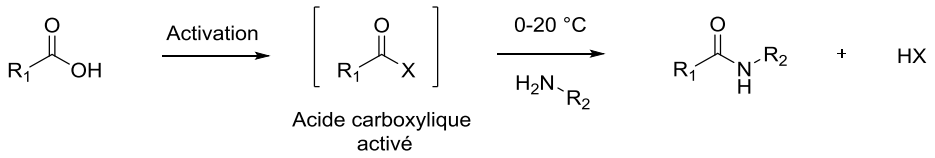
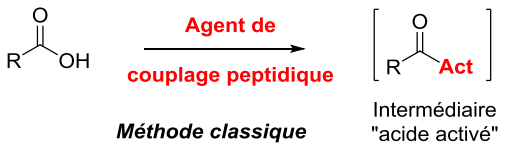


Schéma 2 : Formation d'un acide carboxylique activé



Dans ce chapitre bibliographique ne seront abordées que très brièvement les méthodes de couplage peptidique que nous appellerons « classiques » (impliquant la formation directe d'un équivalent d'acide carboxylique activé via l'utilisation d'un agent de couplage) pour s'intéresser plus spécifiquement aux méthodes dites « non classiques » de création de liaisons amides et peptidiques.

II. Les méthodes de couplage dites « classiques »

Les méthodes de couplage que nous considérons comme « classiques » reposent sur le principe présenté sur le Schéma 3. Elles consistent en l'activation de l'acide carboxylique d'un premier acide α-aminé par un agent de couplage peptidique afin de générer dans le milieu un équivalent d'acide carboxylique activé réactif vis-à-vis d'un nucléophile. L'addition nucléophile de l'amine du second acide α-aminé sur l'espèce réactive, suivie de l'expulsion du groupement activant conduit à la formation de la liaison peptidique.

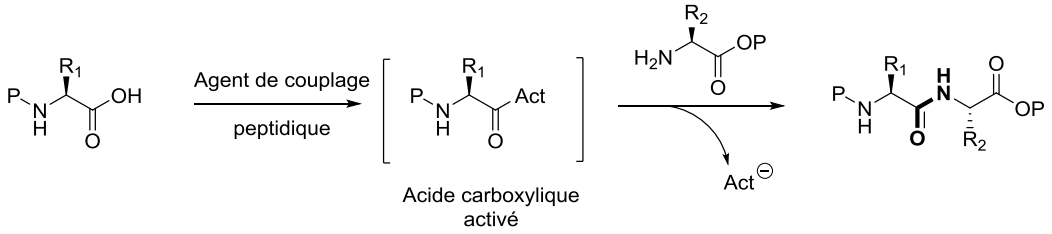


Schéma 3 : Méthodologie de couplage peptidique dite « classique »

Cette stratégie est facile à mettre en œuvre et est applicable à la globalité des acides α-aminés. Elle est utilisée pour la synthèse de polypeptides de manière itérative, jusqu'à 50 acides α-aminés.

De plus, les premiers travaux de Merrifield dans les années 1960 ont permis le développement de la synthèse peptidique sur support solide (Schéma 4).[12] Après avoir introduit le premier acide α-aminé sur le support, l'itération commence par la déprotection de la fonction amine du peptide en croissance, puis l'addition de l'acide α-aminé suivant. Ce peptide allongé d'un acide α-aminé peut alors être réengagé dans un cycle de déprotection/couplage. Lorsque le peptide désiré est assemblé, la chaîne principale et les chaînes latérales sont déprotégées et le produit est clivé du support pour libérer le peptide libre.

L'atout majeur de cette stratégie réside dans le fait qu'aucune étape de purification n'est réalisée entre l'ancrage du premier acide α-aminé sur la résine et le clivage terminal: un lavage du support solide permet d'éliminer les sous-produits de la réaction après filtration. Plus de détails concernant la synthèse peptidique sur support solide seront donnés dans le chapitre III, section II.1.10

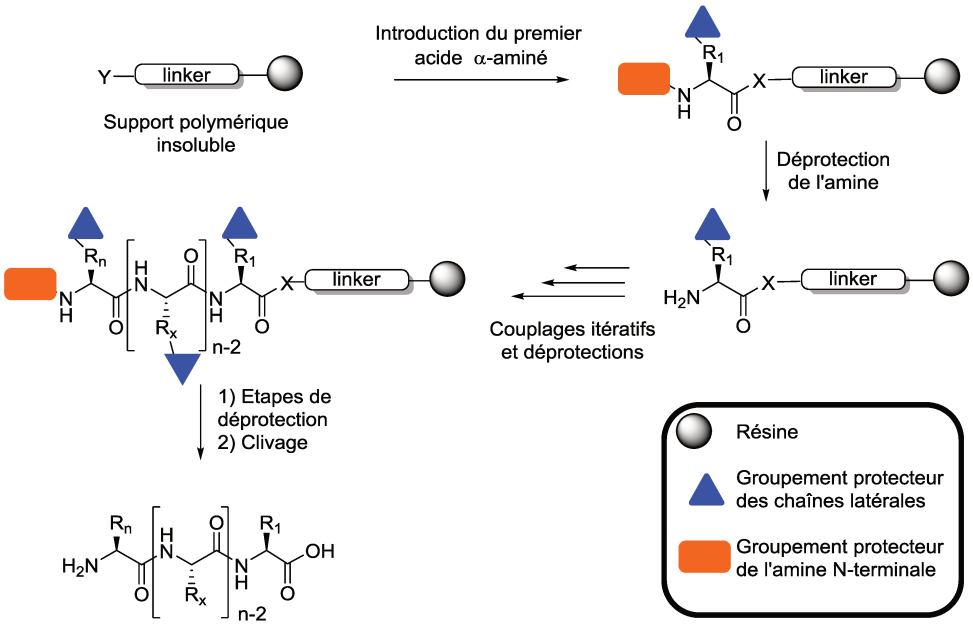


Schéma 4 : Stratégie de synthèse peptidique sur support solide

La nature répétitive de ces opérations a permis d'automatiser cette stratégie de synthèse. Il est aujourd'hui possible d'utiliser des synthétiseurs (figure ci-contre : photo issue du site internet www.cem.com) et de programmer la séquence peptidique que l'on désire. Le synthétiseur est muni de réservoirs contenant les différents acides α-aminés, l'agent de couplage… La séquence peptidique est alors programmée via un logiciel informatique.

II.1 Les agents de couplage peptidique

Cette stratégie d'activation de l'acide carboxylique décrite précédemment a donc nécessité de nombreux travaux pour le développement d'agents de couplages efficaces. De nos jours, il existe des dizaines d'agents de couplages peptidiques dont les plus couramment utilisés en laboratoire sont représentés sur la Figure 1.

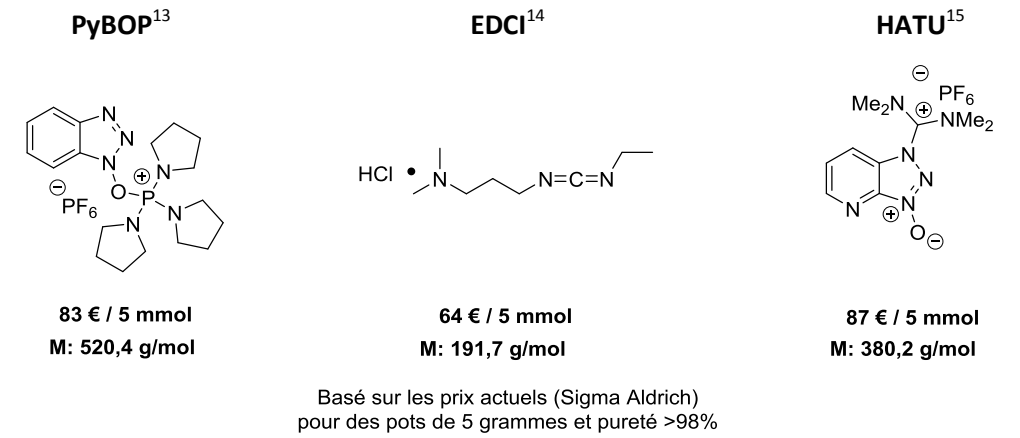


Figure 1 : Quelques agents de couplage peptidique classiques

Ces agents de couplages peptidiques sont très efficaces (rendements supérieurs à 95% à température ambiante, temps de réaction courts). Les nombreuses avancées réalisées dans le domaine (support solide, synthétiseur automatique…) les rendent particulièrement attrayants.

Cependant, ces derniers souffrent de quelques inconvénients :

- Leur coût est important, parfois prohibitif
- Leur masse moléculaire est élevée et engendre donc des réactions à faible économie d'atomes
- La racémisation

Il existe cependant cependant des agents de couplages ou techniques pouvant être utilisées pour la production industrielle de « courts » peptides permettant de s'affranchir de certains inconvénients (simplification de la purification, économie d'atomes) que nous venons d'aborder : le T3P® (acide anhydrique *N*-propanephosphonique) et la chimie des UNCAs (uréthane-*N*-carboxyanhydrides) (Figure 2).

[13] (a) B. Castro, J. R. Dormoy, G. Evin, C. Selve, *Tetrahedron Lett*. **1975**, 14, 1219-1222. (b) J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro, *Tetrahedron Lett*. **1990**, 31, 205-208.

[14] (a) J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc*. **1955**, 77, 1067-1068. (b) J. C. Sheehan, P. A. Cruickshank, G. L. Boshart, *J. Org. Chem*. **1961**, 26, 2525-2528.

[15] (a) V. Dourtoglou, J.-C. Ziegler, B. Gross, *Tetrahedron Lett*. **1978**, 15, 1268-1272. (b) R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett*. **1989**, 30, 1927-1930. (c) L. A. Carpino, H. Imazumi, A. El-Faham, F. J. Ferrer, C. Zhang, Y. Lee, B. M. Foxman, P. Henklein, C. Hanay, C. Mügge, H. Wenschuh, J. Klose, M. Beyermann, M. Bienert, *Angew. Chem. Int. Ed*. **2002**, 41, 441-445.

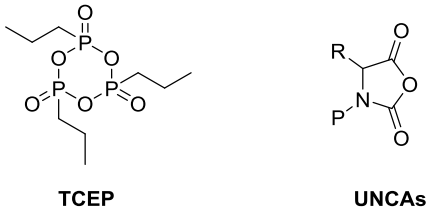


Figure 2 : Agent de couplage et technique pour la synthèse industrielle

II.1.1 La racémisation

Le problème principal de la synthèse peptidique concerne le phénomène de racémisation, qui est particulièrement rencontré lors des étapes impliquant l'activation de l'acide carboxylique.

En effet, lorsque l'acide carboxylique est activé, une oxazolone peut être formée via un mécanisme intramoléculaire (Schéma 5).[16] Le proton en α (Hα) est alors plus acide que sur la forme linéaire, puisque la base générée suite à la déprotonation est stabilisée par délocalisation sur le cycle. L'ouverture de l'oxazolone par l'amine du second acide α-aminé conduit ainsi à un produit épimérisé.

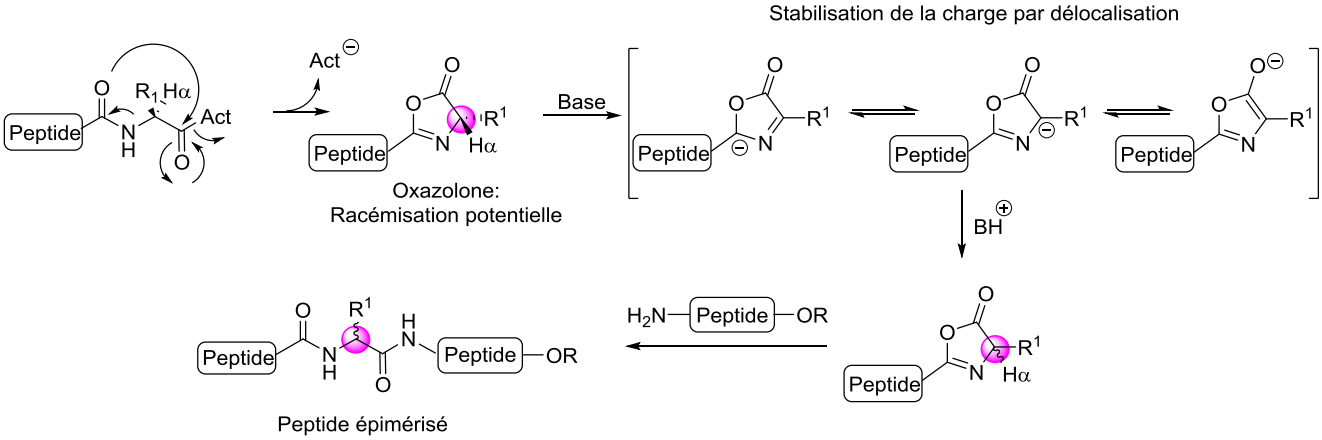


Schéma 5 : Racémisation via la formation d'une oxazolone

Si ce phénomène de racémisation est reproduit lors de chaque couplage, un mélange de diastéréomères très difficilement séparable sera obtenu en fin de synthèse. Ce phénomène de racémisation a également pour conséquence l'incapacité à effectuer des couplages par fragments ou la synthèse de peptides cycliques sans épimérisation.

[16] (a) M. Goodman, K. C. Stueben, *J. Org. Chem*. **1962**, 27, 3409-3416. (b) M. Goodman, L. Levine, *J. Am. Chem. Soc*. **1964**, 86, 2918-2922. (c) M. Goodman, W. J. McGahren, *J. Am. Chem. Soc*. **1966**, 88, 3887-3888. (d) M. Slebioda, M. A. St-Armand, F. M. F. Chen, N. L. Benoiton, *Can. J. Chem*. **1988**, 66, 2540-2544.

L'une des solutions proposées pour limiter ce problème est l'utilisation de groupements protecteurs de type *N*-uréthane (Boc, Fmoc et Cbz). Dans ce cas, même si l'oxazolone peut être formée, la présence d'un groupement alcoxyle (donneur d'électrons) a pour conséquence la déstabilisation de la charge éventuellement générée ; l'acidité du proton en α (Hα) est donc plus faible et la racémisation est inhibée (Schéma 6).

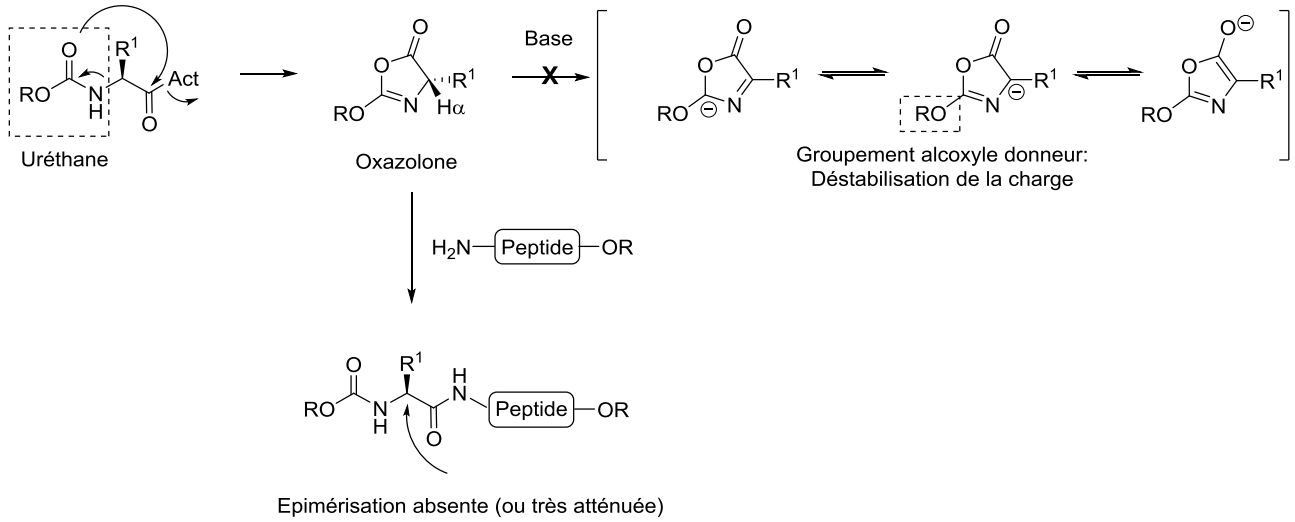


Schéma 6 : Protection de l'amine sous forme d'uréthane

De plus, pour limiter ces phénomènes de racémisation, il est également recommandé :

- D'utiliser des bases faibles et encombrées comme la diisopropyléthylamine (DIPEA)
- De travailler à concentration élevée afin d'augmenter la cinétique en faveur d'un mécanisme bimoléculaire (acide carboxylique + amine)
- De ne pas travailler à température trop élevée (0 °C à température ambiante)

Cependant, malgré toutes ces précautions, certains acides α-aminés (cystéine, histidine, phénylglycine) restent très sensibles et peuvent racémiser via un mécanisme différent (Schéma 7) :

- Cas de la cystéine : La racémisation est favorisée par l'établissement, lors de l'activation de l'acide, d'une liaison hydrogène avec l'atome de soufre, formant un intermédiaire stabilisé à 6 chaînons. Il a également été suggéré, suite à la déprotonation par une base, que la carbanion généré soit stabilisé par les orbitales d vacantes du soufre (Schéma 7, équation a).[17]

- Cas de l'histidine : L'abstraction directe du proton en α est favorisée par un mécanisme intramoléculaire lors de l'étape de l'activation de l'acide (Schéma 7, équation b).

- Cas de la phénylglycine : Le proton en position benzylique est relativement acide, sa base conjuguée étant stabilisée par le système π du groupement phényle (Schéma 7, équation c).

[17] P. Lloyd-Williams, F. Albericio, E. Giralt, *Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins*, **1997**.

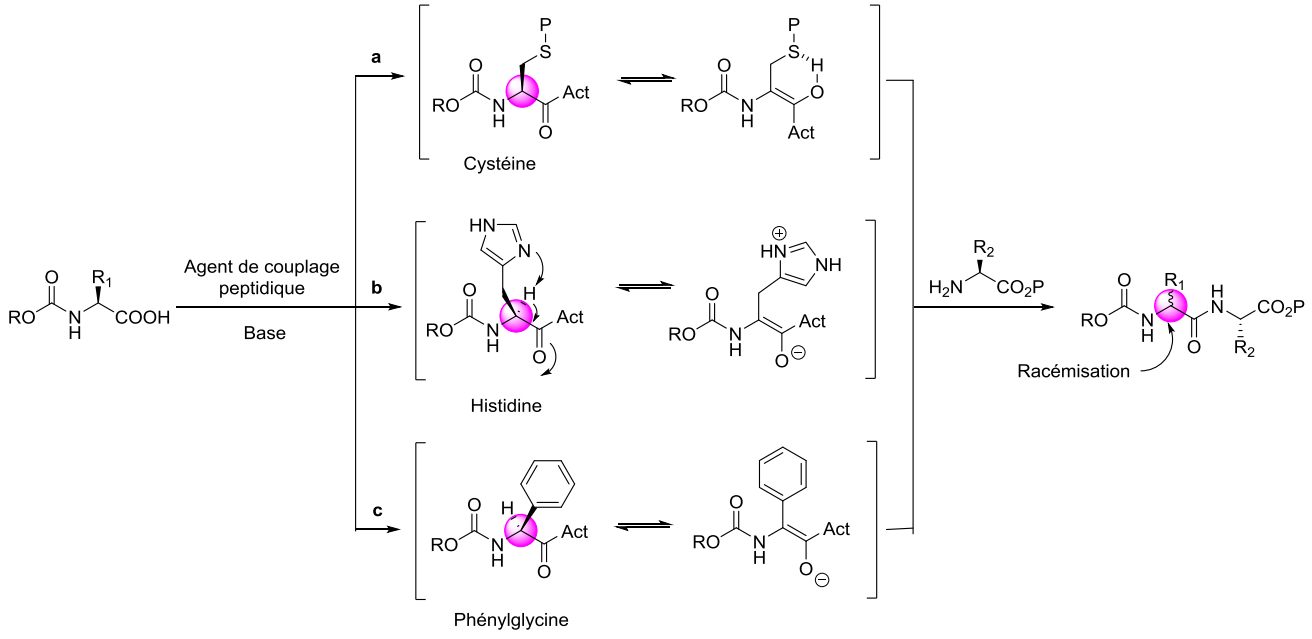
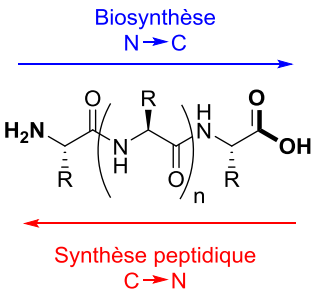


Schéma 7 : Acides α-aminés sensibles à la racémisation



L'activation de l'acide carboxylique, et la possible formation d'une oxazolone épimérisable, ont pour conséquence d'imposer le sens de la synthèse peptidique. En effet, si la synthèse naturelle s'effectue à partir de l'amine terminale vers l'acide carboxylique terminal, les peptides sont quant à eux « chimiquement » synthétisés dans la direction opposée (Figure ci-contre). Ce sens imposé de la synthèse est une conséquence directe du phénomène d'épimérisation.

Nous pouvons illustrer ce propos à travers l'exemple de la synthèse du tétrapeptide H-Ala-Ala-Phe-Val-OR dans les deux directions (N→C) et (C→N):

- N→C : Via l'activation de l'acide carboxylique, une épimérisation partielle, et non-maitrisée, de la phénylalanine et de l'alanine conduirait lors de chaque couplage en raison de la formation possible d'une oxazolone épimérisable (Schéma 8).

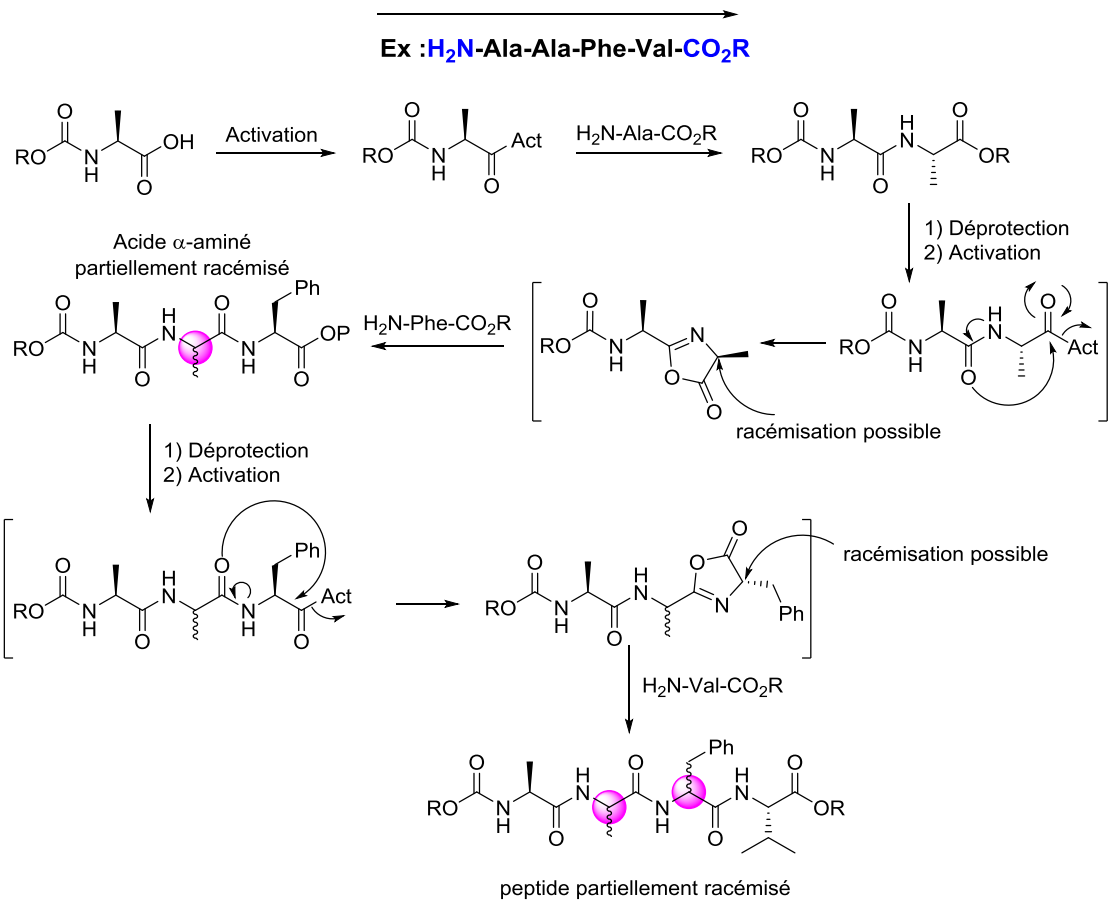


Schéma 8 : Exemple de synthèse peptidique dans le sens N→C

- C→N : A contrario, dans cette direction, il n'y aurait à priori aucune épimérisation. En effet, les acides α-aminés étant à chaque fois protégés sous forme d'uréthane, aucune (ou très peu) de racémisation ne serait théoriquement détectée (Schéma 9).

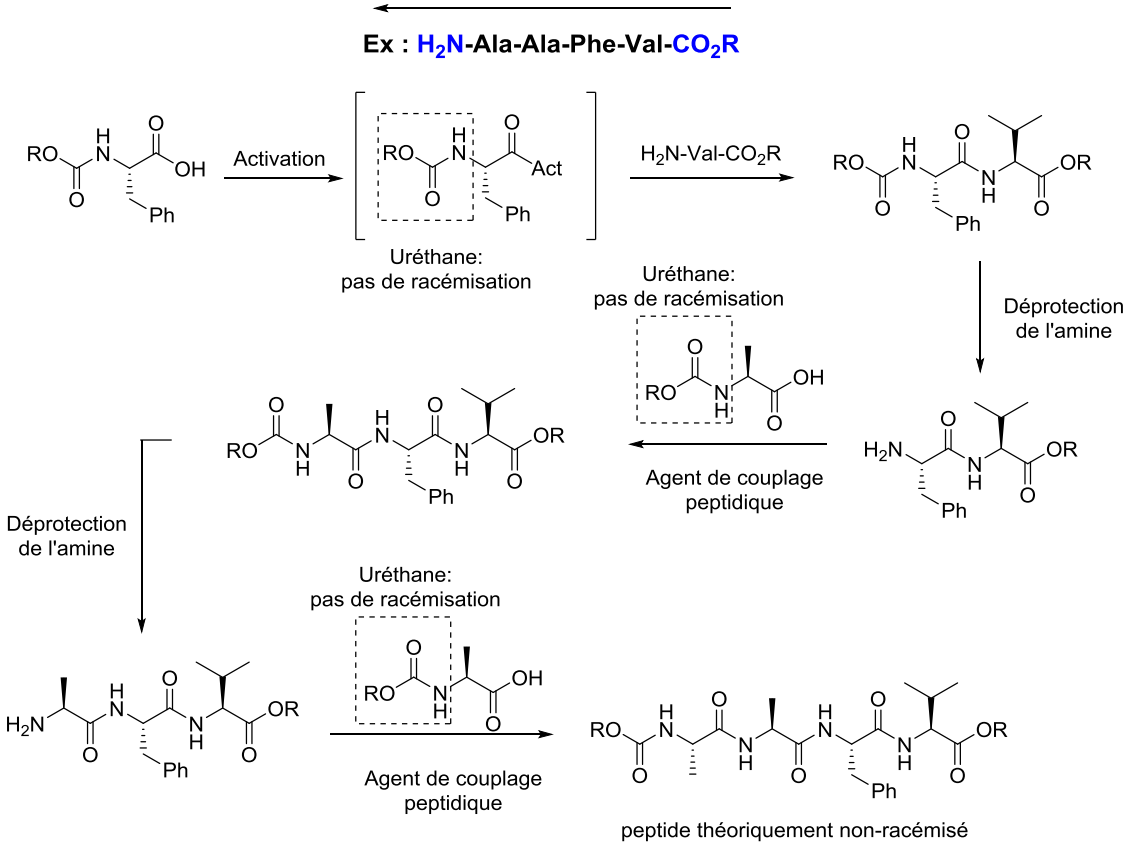


Schéma 9 : Exemple de synthèse peptidique dans le sens C→N

- <u>Conclusion</u> :

La synthèse peptidique classique requiert l'utilisation d'agents de couplage, dont le rôle est d'activer l'acide carboxylique d'un premier acide α-aminé afin de le rendre réactif vis-à-vis de l'amine d'un second acide α-aminé. Cette stratégie est bien maitrisée par les chimistes et permet la synthèse de nombreux peptides en solution et sur support solide.

Cependant, des problèmes inhérents à cette stratégie (activation de l'acide carboxylique) demeurent. Ainsi, la racémisation engendrée via la formation d'une oxazolone a conduit les chimistes à adopter un sens de synthèse particulier (C→N) et à utiliser des uréthanes comme groupement protecteur de l'amine. Il est également difficile d'effectuer des couplages par fragments de peptides ainsi que de synthétiser des peptides cycliques sans racémisation. De plus, pour des raisons de solubilité, les réactions impliquant de très gros fragments de peptides sont effectués en milieu aqueux, ce qui n'est souvent pas compatible avec l'utilisation d'agents de couplage (peu solubles et très sensibles à l'hydrolyse).

III. Les méthodes d'amidation dites « non-classiques »

Comme nous l'avons vu précédemment, la synthèse peptidique « classique » est très efficace et couramment employée en laboratoire et dans l'industrie. Cependant, les inconvénients liés à cette stratégie ont suscité le développement de méthodes alternatives n'impliquant pas l'activation de l'acide carboxylique.

Dans ce chapitre seront abordées de manière non-exhaustive les principales méthodologies utilisées pour la formation d'amides via une réactivité « non-classique ». Nous distinguerons également les différentes alternatives à la création d'une liaison amide « simple » (n'impliquant pas des acides α-aminés) et à la création plus exigeante d'une liaison peptidique (Figure 3).

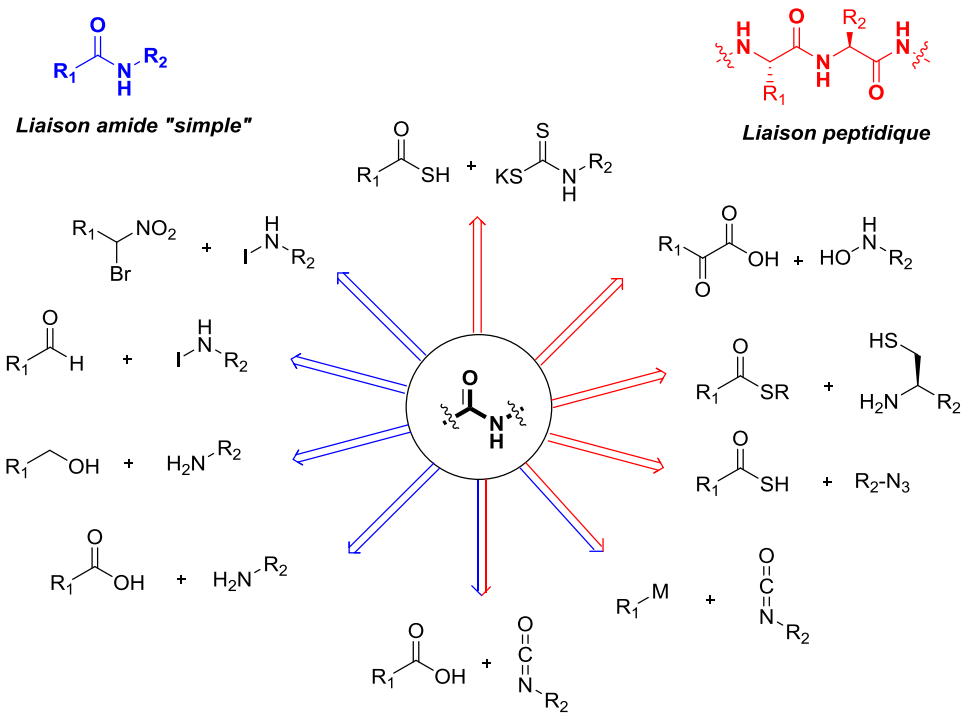


Figure 3 : Différentes alternatives pour la création de liaisons amide et peptidique

III.1 Création de liaisons peptidiques

Dans cette section seront abordées de facon non-exaustive[18] différentes techniques de ligations peptidiques développées et permettant l'assemblage de longs fragments peptidiques de manière extremement chimiosélective.

III.1.1 Native Chemical Ligation (NCL)

Dans le but de synthétiser de gros peptides, voire de petites protéines, le couplage de deux fragments s'avère incontournable (Schéma 10).

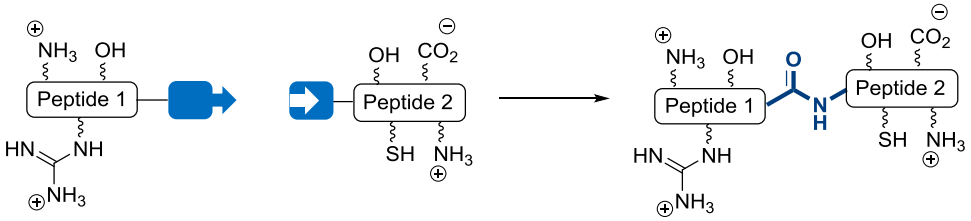


Schéma 10 : Assemblage de deux fragments peptidiques

La méthode « non-classique » la plus connue pour la création de liaisons peptidiques est la Native Chemical Ligation (NCL). Cette réaction, permettant l'assemblage de fragments peptidiques, met en jeu un thioester d'un premier fragment et une Cystéine en position *N*-terminale d'un second fragment.

Introduite par Kent en 1994,[19] la Native Chemical Ligation permet aujourd'hui de synthétiser de très gros peptides et protéines.[20] D'un point de vue mécanistique, l'étape initiale est une transthioestérification réversible entre le thioester (**1**) d'un premier fragment et le thiol de la cystéine en position *N*-terminale du second fragment (**2**). Cette première étape permet de générer un intermédiaire (**3**) pouvant se réarranger, de manière irréversible, via une migration S→N d'acyle pour donner le peptide natif (**4**). Cette réaction présente l'avantage d'être chimio et régiosélective, elle peut donc s'effectuer en l'absence de groupements protecteurs sur les chaînes latérales. La première étape de transthioestérification étant réversible, l'éventuel composé résultant d'une

[18] R. Mhidia, E. Boll, F. Fécourt, M. Ermolenko, N. Ollivier, K. Sasaki, D. Crich, B. Delpech, O. Melnyk, *Bioorg. Med. Chem*. **2013**, 21, 3479–3485.
[19] P.E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. Kent, *Science* **1994**, 266, 776-779.
[20] (a) P. E. Dawson, S. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, 69, 923-960. (b) D. S. Y. Yeo, R. Srinivasan, G. Y. J. Chen, S. Q. Yao, *Chem. Eur. J*. **2004**, 10, 4664-4672. (c) H. P. Hermantha, N. Narendra, V. V. Sureshbabu, *Tetrahedron* **2012**, 9491-9537. (d) L. Raibaut, N. Ollivier, O. Melnyk, *Chem. Soc. Rev*. **2012**, 41, 7001-7015.

transthioestérification avec une cystéine autre que la cystéine *N*-terminale n'évoluera pas et l'équilibre sera déplacé vers le peptide natif souhaité par migration S→N d'acyle irréversible (Schéma 11).

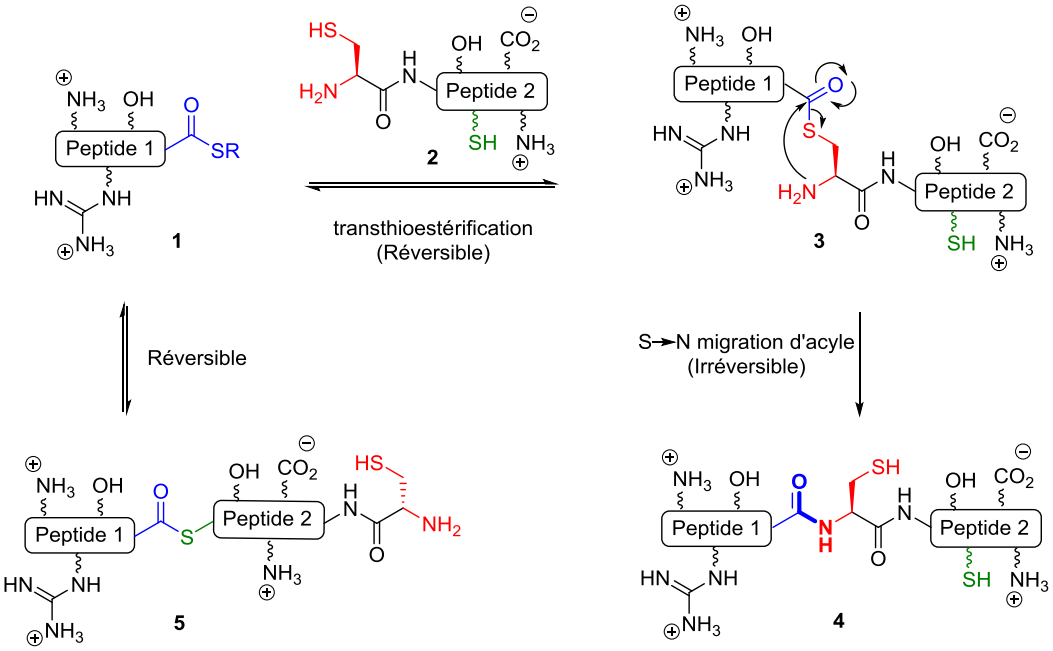


Schéma 11 : Native Chemical Ligation

Comme illustré sur le mécanisme ci-dessus, la réaction implique la présence d'une cystéine *N*-terminale. L'abondance de cet acide α-aminé dans les peptides/protéines naturels étant faible (1,9%), cette méthodologie a été étendue à d'autres acides α-aminés via une stratégie apparentée (Schéma 12). En effet, il est possible d'éliminer le groupement thiol de la chaîne latérale (désulfurisation) et ainsi accéder aux acides α-aminés natifs. Le premier exemple de cette extension de la NCL fut reporté par Dawson avec la désulfurisation de la cystéine.[21] Des exemples avec la Phénylalanine,[22] Valine,[23] Arginine,[24] Leucine,[25] Acide aspartique,[26] Lysine,[27] Thréonine,[28] Glutamine,[29] Acide glutamique,[30] Proline,[31] et Tryptophane[32] ont par la suite été décrits.

[21] L. Z. Yan, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc*. **2001**, 123, 526-533.
[22] D. Crich, A. Banerjee, *J. Am. Chem. Soc*. **2007**, 129, 10064-10065.
[23] (a) C. Haase, H. Rohde, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 6807-6810.(b) J; Chen, Q. Wan, Y. Yuan, J. Zhu, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 8521-8524.
[24] L. R. Malins, K. M. Cergol, R. J. Payne, *ChemBioChem* **2013**, 14, 559-566.
[25] (a) Z. Tan, S. Shang, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem. Int. Ed*. **2010**, 49, 9500-9503. (b) Z. Harpaz, P. Siman, K. S. Ajish Kumar, A. Brik, *ChemBioChem* **2010**, 11, 1232-1235.
[26] (a) R. E. Thompson, B. Chan, L. Radom, K. A. Joliffe, R. J. Payne, *Angew. Chem. Int. Ed*. **2013**, 52, 9723-9727. (b) X. Guan, M. R. Drake, Z. Tan, *Org. Lett*. **2013**, 15, 6128-6131.

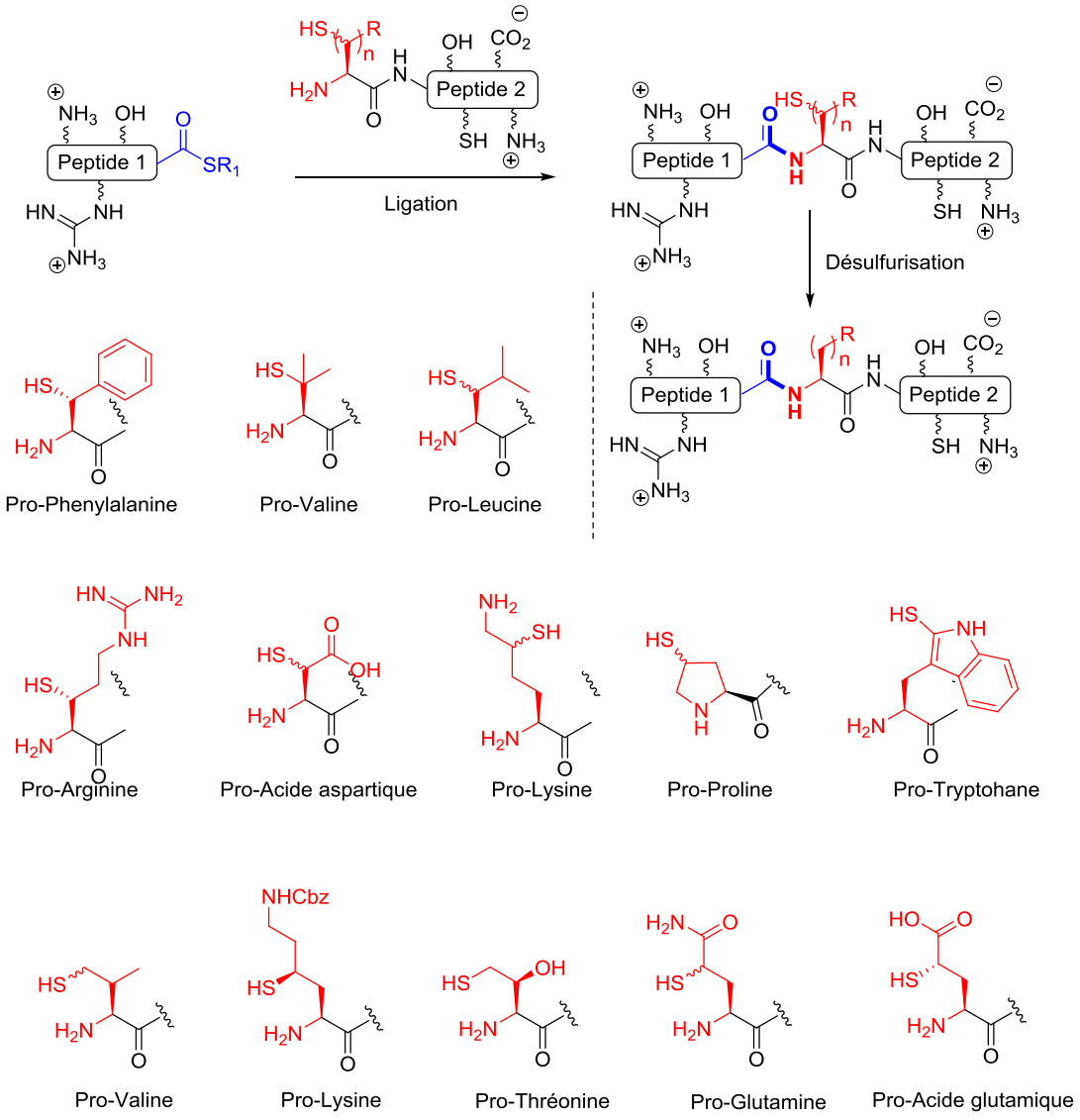


Schéma 12 : Substituts de la Cystéine pour la Native Chemical Ligation

Après l'étape de ligation, il est nécessaire de régénérer l'acide α-aminé désiré par une réaction de désulfurisation. Le premier exemple de désulfurisation de la cystéine, décrit par Dawson en 2001,

[27] (a) R. Yang, K. K. Pasunooti, F. Li, X. – W. Liu, C-F. Liu, *J. Am. Chem. Soc*. **2009**, 131, 13592-1593. (b) R. Merkx, G. de Bruin, A. Kruithof, T. van den Bergh, E. Snip, M. Lutz, F. El Oualid, H. Ovaa, *Chem. Sci*. **2013**, 4, 4494-4498. (c) K. S. A. Kumar, M. Haj – Yahya, D. Olschewski, H. A. Lashuel, A. Brik, *Angew. Chem. Int. Ed*. **2009**, 48, 8090-8094.

[28] J. Chen, P. Wang, J. Zhu, Q. Wan, S.J. Danishefsky, *Tetrahedron*, **2010**, 66, 2277-2283.

[29] P. Siman, S. V. Karthikeyan, A. Brik, *Org. Lett*. **2012**, 14, 1520-1523.

[30] K. M. Cergol, R. E. Thompson, L. R. Malins, P. Turner, R. J. Payne, *Org. Lett*. **2014**, 16, 209-293.

[31] (a) S. Shang, Z. Tan, S. Dong, S.J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc*. **2011**, 133, 10784-10786. (b) H. Ding, A. Shigenaga, K. Morishata, A. Otaka, *Org. Lett*. **2011**, 13, 5588-5591.

[32] L. R. Malins, K. M. Cergol, R. J. Payne, *Chem. Sci*. **2014**, 5, 260-266.

s'effectuait en présence de Nickel de Raney ou de Pd/Al_2O_3 sous atmosphère d'hydrogène.[21] En 2007, Danishefsky a proposé une méthode alternative de désulfurisation radicalaire basé sur l'utilisation de TCEP [tris(2-carboxyethyl)phosphine] et d'un initiateur radicalaire (VA.044).[33] Cependant, le problème majeur de cette méthodologie est la régiosélectivité de la réaction en présence d'autres cystéines sur le peptide. Il est donc nécessaire, au préalable, de protéger orthogonalement les différentes cystéines que l'on souhaite conserver à la fin de la synthèse. Une solution potentielle pour éviter ces problèmes de sélectivité est l'utilisation de la sélénocystéine. Les propriétés de cet acide α-aminé, différentes de la cystéine, ont permis de déséléniser chimiosélectivement une sélénocystéine en présence de cystéine.[34] Dans ces conditions, le mécanisme semble être similaire à celui de la désulfurisation, mais la désélénisation chimiosélective peut être expliquée par la formation préférentielle du radical centré sur l'atome de sélénium plutôt que sur l'atome de soufre ainsi que la faiblesse de la liaison carbone-sélénium (Schéma 13). Cependant, aucune étude mécanistique n'a à notre connaissance été décrite à ce jour. Quelques séléno acides α-aminés ont été développés et utilisés avec succès dans des réactions de NCL et désélénisation sélective.[35]

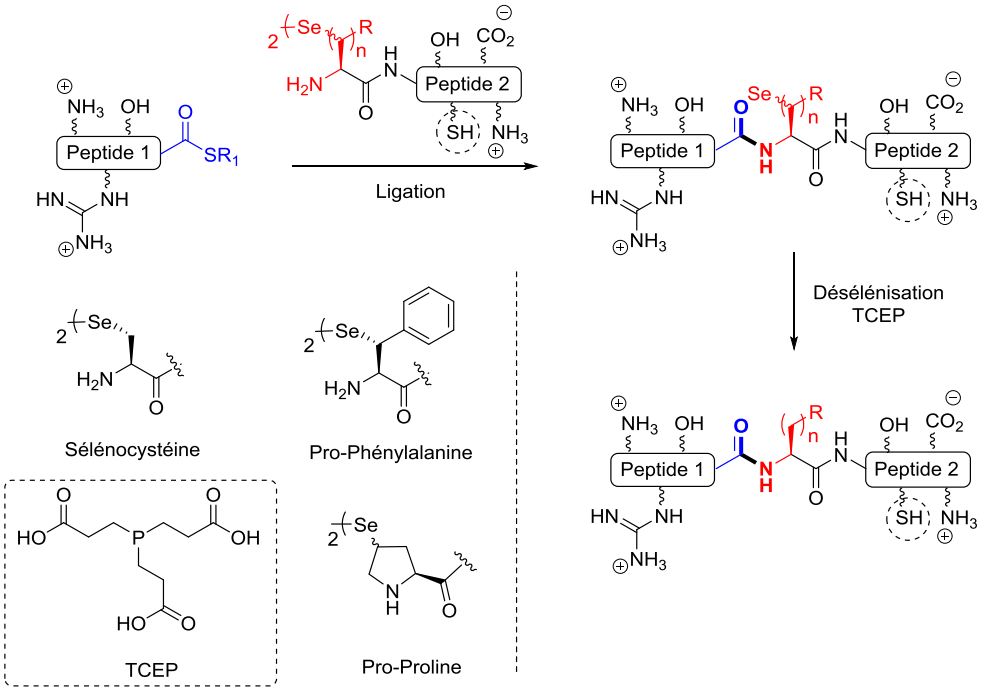


Schéma 13 : Native Chemical Ligation utilisant des séléno acides α-aminés

[33] Q. Wan, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem. Int. Ed*. **2007**, 46, 9248-9252.
[34] N. Metanis, E. Keinan, P.E. Dawson, *Angew. Chem. Int. Ed*. **2010**, 49, 7049-7053.
[35] (a) S. D. Townsend, Z. Tan, S. Dong, S. Shang, J. A. Brailsford, S. J Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc*. **2012**, 134, 3912-3916. (b) L. R. Malins, R. J. Payne, *Org. Lett*. **2012**, 14, 3142-3145.

Le mécanisme communément admis pour la réaction de désulfurisation / désélénisation est décrit sur le Schéma 14.[36] L'action de la TCEP permet de réduire la liaison X-X et de former le thiol / sélenol XH (**6**). Ce dernier peut subir une rupture homolytique permettant la formation du radical correspondant (radical thiyle ou radical sélényle) (**7**). L'attaque directe de ce radical sur l'atome de phosphore de la TCEP conduit à la formation d'un radical phosphoranyle (**8**) qui peut subir une réaction de β-scission menant au radical alkyle (**9**). L'abstraction d'un atome d'hydrogène par ce dernier conduit au résidu alanine (**10**).

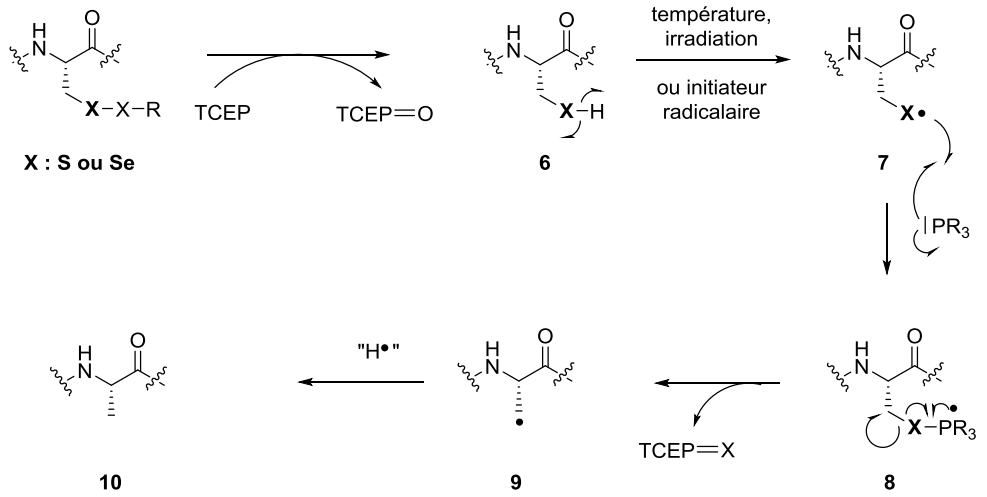


Schéma 14 : Mécanisme général proposé pour la réaction de désulfurisation / désélénisation

Malgré ces nombreuses avancées, l'une des difficultés majeures liée à la NCL est l'accès aux thioesters terminaux. Cependant, le groupe de Melnyk a montré qu'il était possible de les générer in-situ.[37] Ce travail représente une amélioration notable dans ce domaine.

En 2010, l'équipe de Melnyk a préparé des fragments pour la NCL sur un support solide (résine chlorotrityle) (**11**) portant un groupement bis(2-sulfanylethyl)amino (SEA) en position *C*-terminale. Ce groupement peut réagir avec un peptide portant une cystéine en position *N*-terminale pour conduire au peptide natif (Schéma 15).

Après avoir synthétisé sur support solide le fragment SEA, ce dernier est clivé en conditions acide (TFA). Le produit de clivage conduit au fragment SEA (**12**) qui est directement oxydé pour simplifier les conditions de purification. Le peptide SEA oxydé est appellé $SEA^{off,}$ car il est non réactif dans des conditions de NCL. L'addition d'un réducteur (TCEP) sur le peptide SEA^{off} (**13**) permet de réduire le pont disulfure et de générer le peptide réactif SEA^{on} (**14**). Ce dernier est en équilibre avec la forme

[36] S. Dery, P. S. Reddy, L. Dery, R. Mousa, R. N. Dardashti, N. Metanis, *Chem. Sci*. **2015**, 6, 6207-6212.
[37] N. Ollivier, J. Dheur, A. Blanpain, O. Melnyk, *Org. Lett* **2010**, 12, 5238-5241.

15 et peut réagir dans des conditions classiques de Native Chemical Ligation pour former le peptide natif **16**.

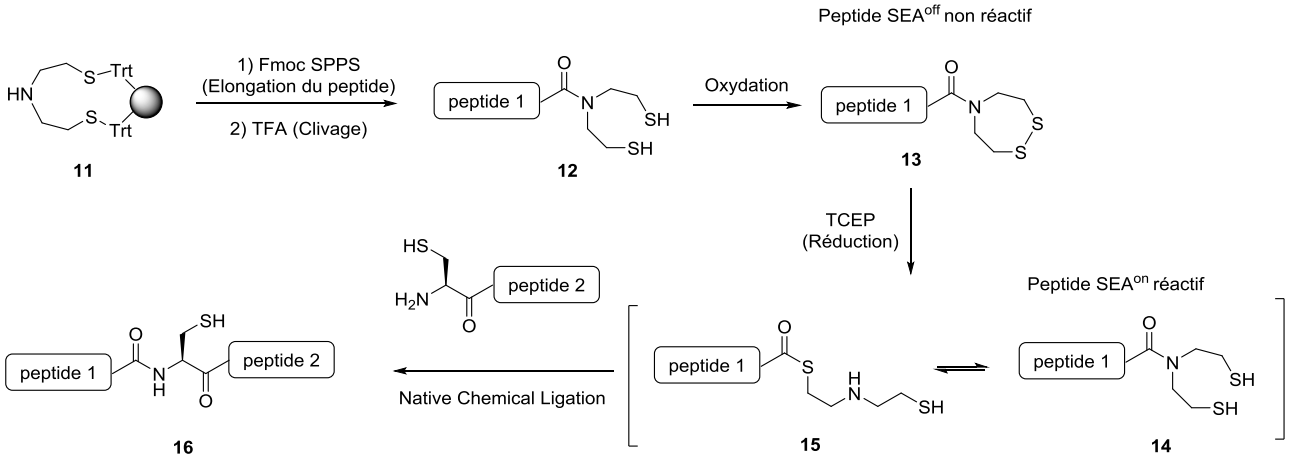


Schéma 15 : Concept général de la SEA Ligation

Au-delà de l'intérêt particulier de cette méthodologie pour l'accès aisé aux thioesters terminaux[38] (Schéma 16), la stabilité du peptide SEA^{off} dans les conditions de NCL et la facilité pour obtenir le peptide SEA^{on} ont permis d'utiliser cette méthodologie dans des stratégies de ligations monotopes impliquant trois fragments de peptides (Schéma 17).[39]

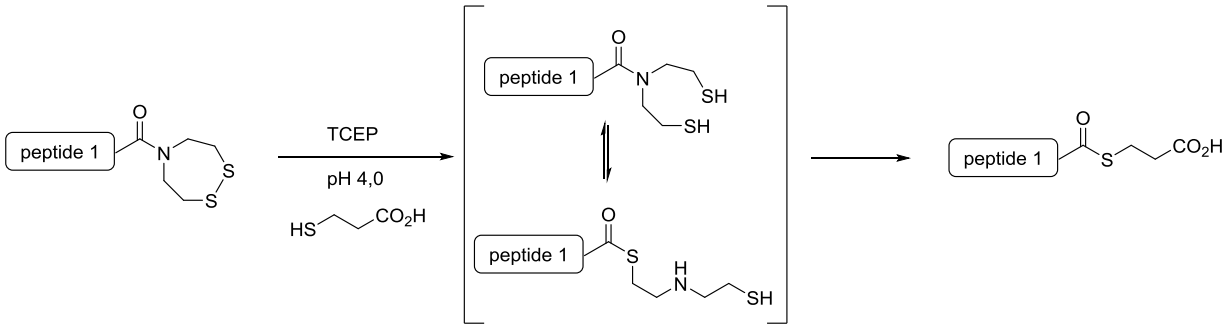


Schéma 16 : Synthèse de peptides thioesters via la SEA ligation

[38] (a) J. Dheur, N. Ollivier, A. Vallin, O. Melnyk, *J. Org. Chem*. **2011**, 76, 3194-3202. (b) N. Ollivier, L. Raibaut, A. Blanpain, R. Desmet, J. Dheur, R. Mhidia, E. Boll, H. Drobecq, S. L. Pira, O. Melnyk, *J. Pept. Sci.* **2014**, 20, 92-97.
[39] N. Ollivier, J. Vicogne, A. Vallin, H. Drobecq, R. Desmet, O. El Mahdi, B. Leclercq, G. Goormachtigh, V. Fafeur, O. Melnyk, *Angew. Chem. Int. Ed*. **2012**, 51, 209-213.

En effet, l'équipe de Melnyk a utilisé une stratégie monotope pour la synthèse du fragment K1 de « l'hepatocyte growth factor (HGF) » composé de 85 acides α-aminés (HGF 125-209) et stabilisé par trois ponts disulfures.

L'assemblage du fragment K1 débute par la ligation du fragment thioester (**17**) avec le fragment SEA^{off} (**18**). La réaction conduit au fragment (**19**) après 20 heures de réaction à 37 °C. L'addition dans le milieu du fragment (**20**) et de TCEP conduit à une seconde étape de ligation menant avec succès à la formation du fragment HGF 125-209-NH_2 (**21**) linéaire avec un rendement de 39% après 48 heures de réaction. Une dernière étape permettant la création des ponts disulfures permet d'isoler le fragment K1 HGF (**22**) avec un rendement de 36%.

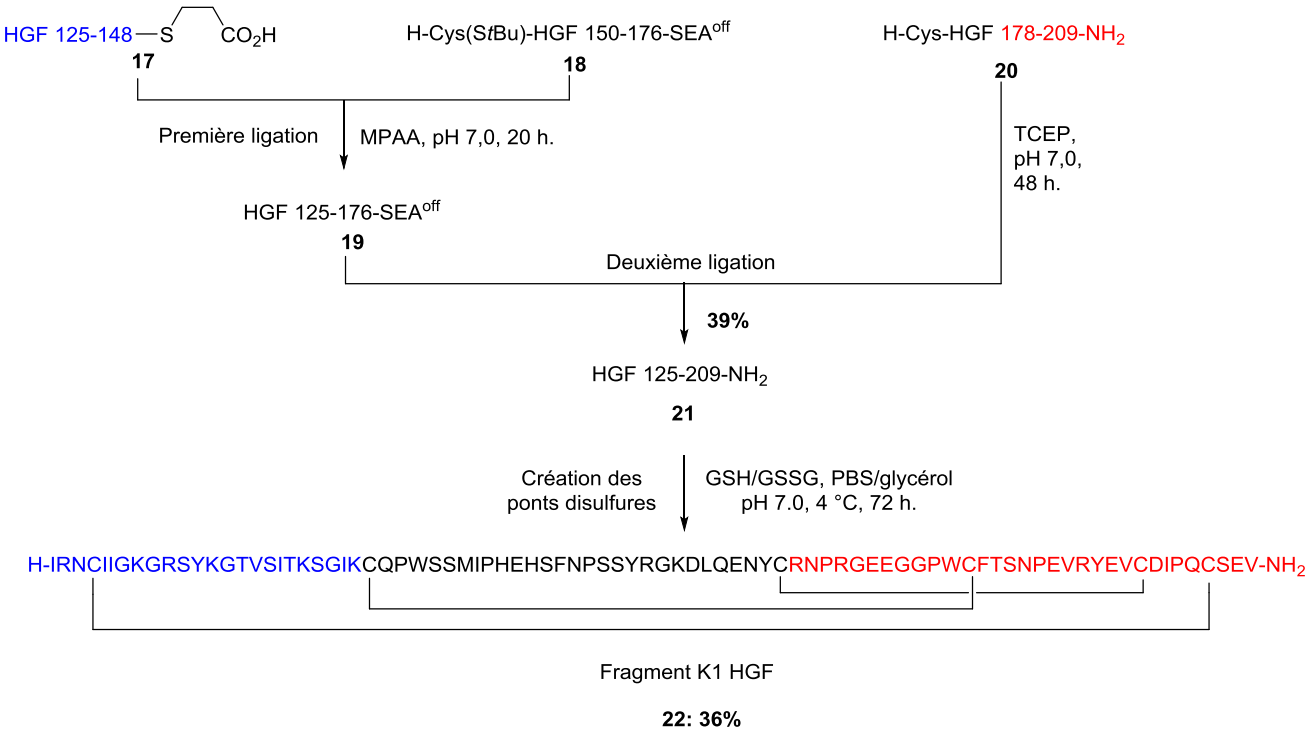


Schéma 17 : Synthèse du fragment K1 HGF via SEA ligation mototope

➢ <u>Conclusion</u> :

La Native Chemical Ligation est très certainement la stratégie la plus utilisée aujourd'hui pour la « ligation » de grands peptides et les avancées récentes présentées ci-dessus lui confèrent un attrait particulier.

Cependant, d'autres techniques puissantes de ligation sont apparues ces dernières années. C'est notamment le cas de la KAHA ligation.

III.1.2 KAHA Ligation

En 2006, Bode a décrit une nouvelle technique de ligation peptidique chimiosélective mettant en jeu la réaction entre un céto-acide et une hydroxylamine (KAHA Ligation). Le premier exemple décrit implique la ligation entre deux tripeptides présentant des chaînes latérales non-protégées. La réaction permet l'obtention du produit de ligation souhaité avec un rendement de 75% (Schéma 18).[40]

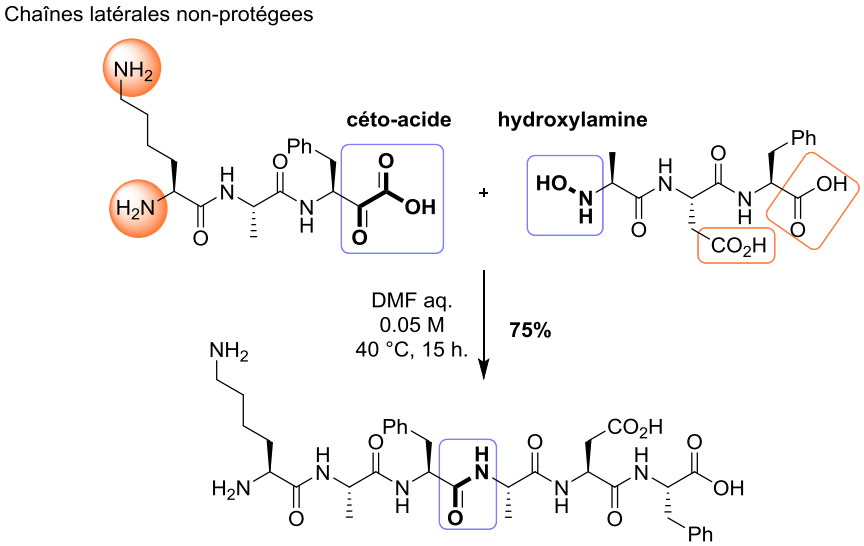


Schéma 18 : KAHA ligation

La réactivité remarquable des deux partenaires a poussé l'équipe de Bode à élucider le mécanisme réactionnel. De nombreuses études poussées, dont des expériences de marquage à l'oxygène 18, ont ainsi été réalisées (Schéma 19).[41] Il a été ainsi montré que l'atome d'oxygène présent dans la liaison peptidique formée ne provient pas d'eau présente dans le milieu qui permettrait l'hydrolyse d'une nitrone intermédiaire (a). Cet atome d'oxygène n'est pas non plus issu du carbonyle du céto-acide (b), mais semble provenir de l'oxygène initialement présent sur l'hydroxylamine (c).

[40] J. W. Bode, R. M. Fow, K. D. Baucom, *Angew. Chem. Int. Ed*. **2006**, 45, 1248-1252.
[41] I. Pusterla, J. W. Bode, *Angew. Chem. Int. Ed*. **2012**, 51, 513-516.

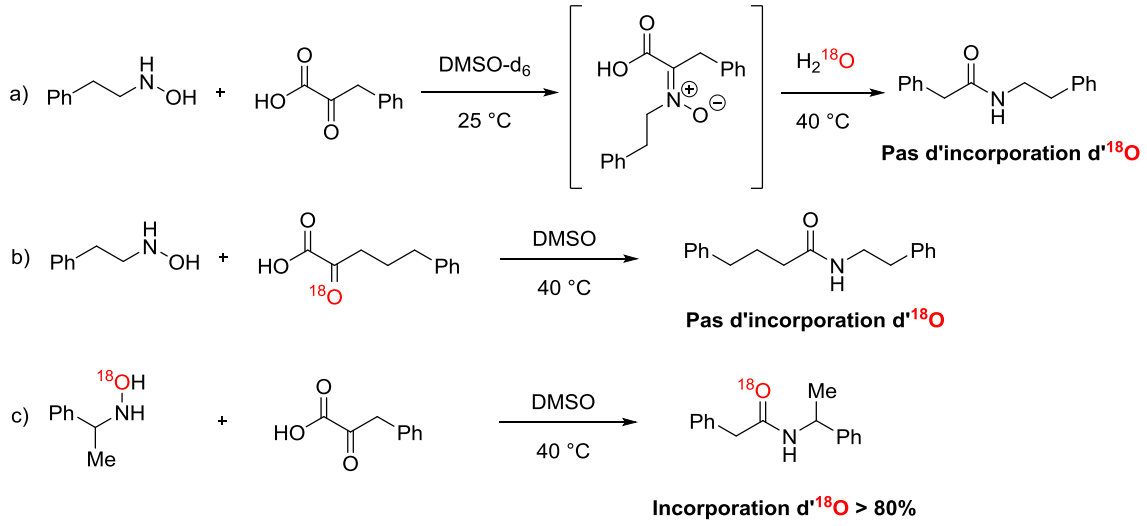


Schéma 19 : Expériences de marquage à l'oxygène 18

À partir de ces résultats expérimentaux, un mécanisme complexe a été proposé (Schéma 20). L'addition de l'hydroxylamine sur le céto-acide permet la formation d'un hémiaminal qui se déshydrate pour former une nitrone (*Z* et *E*). Après prototropie, une α-lactone peut être formée, cette dernière est en équilibre avec l'oxaziridine correspondante. L'oxaziridine peut à son tour perdre une molécule de dioxyde de carbone pour conduire à la liaison amide désirée.

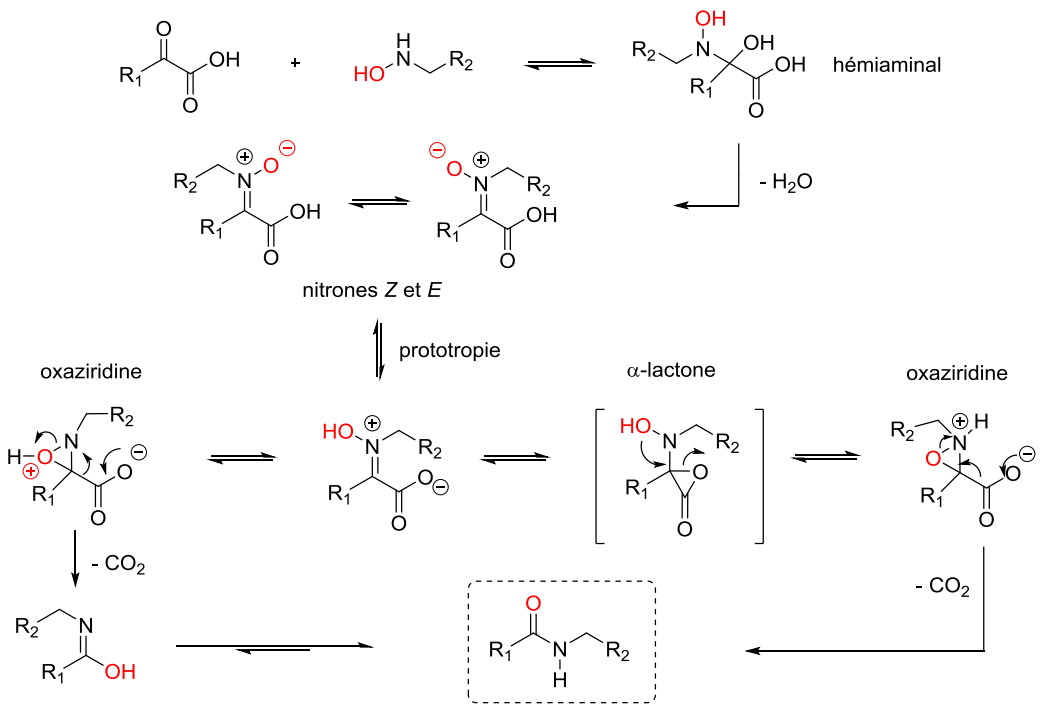


Schéma 20 : Mécanisme proposé pour la KAHA ligation

Le principal inconvénient de cette stratégie est lié à l'utilisation des deux partenaires, céto-acide et hydroxylamine qui sont non-naturels et non-commerciaux. Le groupe de Bode a tout d'abord développé des méthodes d'accès rapides et efficaces à ces deux composés.[42, 43]

Comme illustré sur le Schéma 21, cette stratégie de ligation a été employée dans la synthèse de peptides tels que le GLP-1 (7-36).
Le fragment déprotégé *C*-terminal céto-acide 7-21 est obtenu via une stratégie Fmoc sur une résine 2-Cl-trityle après déprotection/clivage au TFA puis une étape d'oxydation à l'oxone® pour générer le céto-acide (**31**).

Le fragment *N*-terminal hydroxylamine 22-36 est synthétisé également via une stratégie Fmoc sur une résine Rink Amide MBHA. À partir de l'amine terminale (**23**), l'hydroxylamine attendue (**27**) est obtenue en trois étapes :

- Couplage avec l'acide bromo-acétique
- Addition de l'hydroxylamine **25**
- Clivage/déprotection des groupements protecteurs au TFA

La réaction de ces deux fragments dans un mélange DMSO/DMA en présence de deux équivalents d'acide oxalique permet de générer le peptide GLP1 (7-36) par KAHA ligation avec un rendement de 51%.[44]

[42] (a) T. G. Wucherpfennig, V. R. Pattabiraman, F. R. P. Limberg, J. Ruiz – Rodriguez, J. W. Bode, *Angew. Chem. Int. Ed*. **2014**, 53, 12248-12252. (b) J. Ju, J. W. Bode, *Org. Biomol. Chem*. **2009**, 7, 2259-2267. (c) L. Ju, A. R. Lippert, J. W. Bode, *J. Am. Chem. Soc*. **2008**, 130, 4253-4255.
[43] (a) S. I. Medina, J. Wu, J. W. Bode, *Org. Biomol. Chem*, **2010**, 8, 3405-3417. (b) T. Fukuzumi, J.W. Bode, *J. Am. Chem. Soc*. **2009**, 131, 3864-3865
[44] J. Wu, J. Ruiz – Rodriguez, J. M. Comstock, J. Z. Dong, J. W. Bode, *Chem. Sci*. **2011**, 2, 1976-1979.

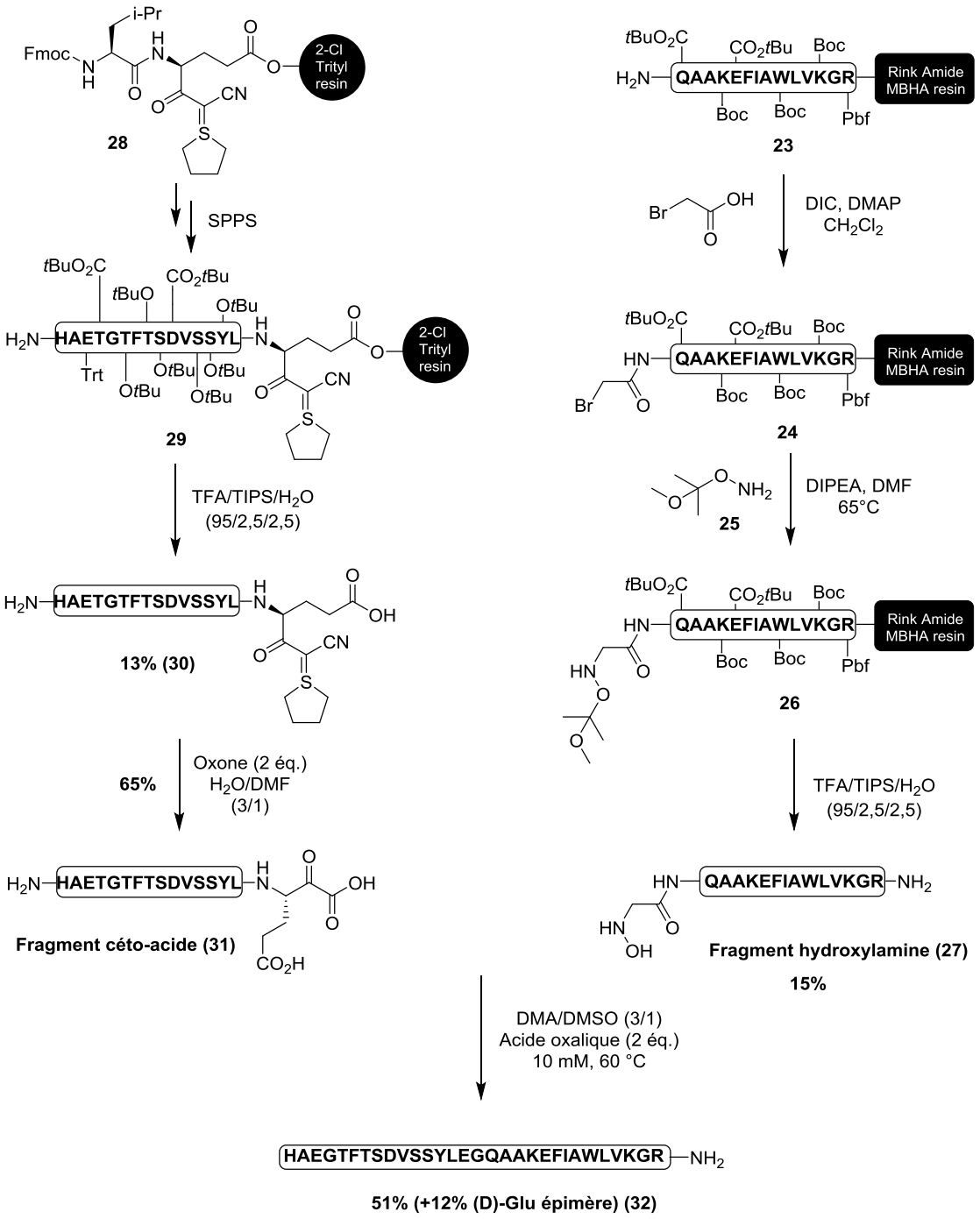


Schéma 21 : Synthèse du peptide GLP-1 (7-36) via KAHA ligation

De manière très intéressante, cette stratégie de ligation a également été appliquée à la synthèse de peptides cycliques (Schéma 22).[45]

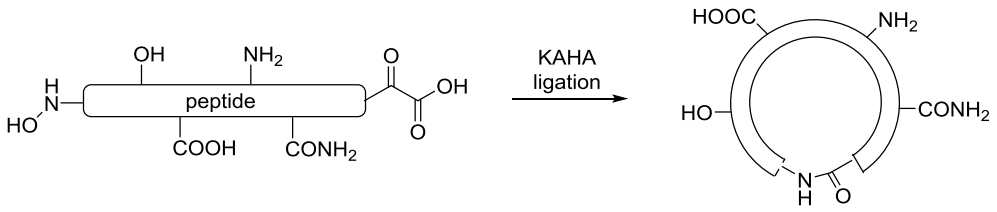


Schéma 22 : Synthèse de peptides cycliques par KAHA ligation

Par extension du concept de la KAHA ligation, Bode a également développé des peptides portant sur la chaîne *N*-terminale une fonction 5-oxaproline permettant l'accès, après la ligation, à des résidus homosérine[46] et aldéhyde aspartique[47] (Schéma 23).

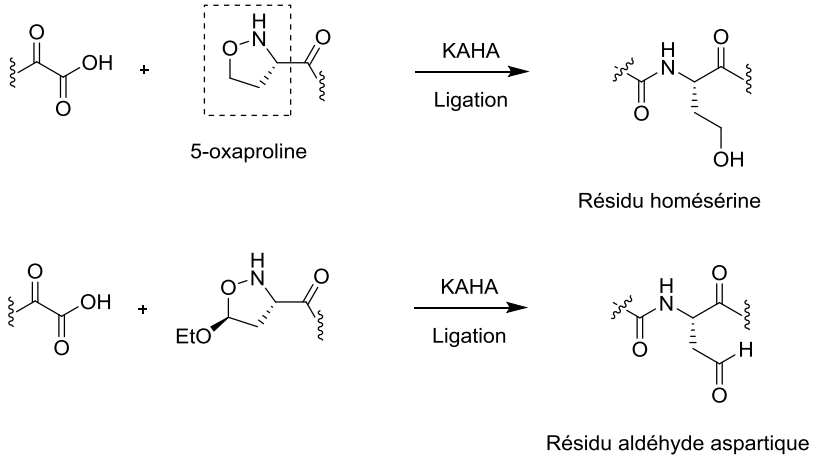


Schéma 23 : Ligations avec la 5-oxaproline

- <u>Conclusion</u> :

La KAHA ligation développée par Bode représente une alternative très intéressante à la NCL couramment utilisée pour les ligations peptidiques. En effet, le groupe de Bode a su développer des méthodologies de synthèses aisées pour la formation des deux fragments directement sur support solide rendant la KAHA ligation particulièrement intéressante pour l'accès à de grands peptides.

[45] (a) T. Fukuzumi, L. Ju, J. W. Bode, *Org. Biomol. Chem*. **2012**, 10, 5837-5844. (b) F. Rohrbacher, G Deniau, A. Luther, J. W. Bode, *Chem. Sci*. **2015**, 6, 4889-4896.
[46] V. R. Pattabiraman, A. O. Ogunkoya, J. W. Bode, *Angew. Chem. Int. Ed*. **2012**, 51, 5114-5118.
[47] C. E. Murar, F. Thuaud, J. W. Bode, *J. Am. Chem. Soc*. **2014**, 136, 18140-18148.

L'utilisation de substituts de l'hydroxylamine comme la 5-oxaproline montre la diversité réactionnelle que peut offrir cette méthodologie.

III.1.3 KAT Ligation

Après l'étude de substituts de l'hydroxylamine, Bode s'est ensuite intéressé au remplacement de la fonction céto-acide. Il a ainsi développé une nouvelle technique de ligation, la KAT Ligation, impliquant l'utilisation d'un acylborate.

En 2010, Molander a décrit le premier acyltrifluoroborate stable (**33**), qui en présence d'un azoture conduit à la formation de la liaison amide correspondante (Schéma 24).[48]

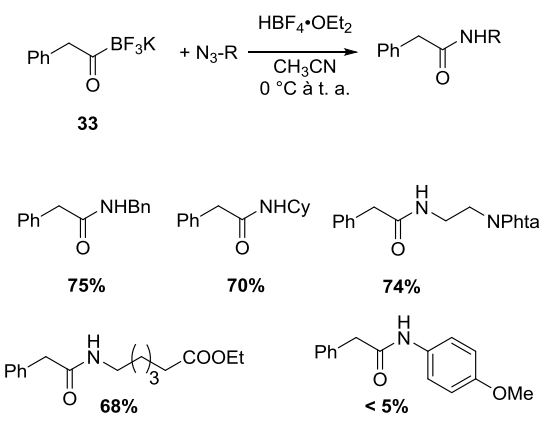


Schéma 24 : Réaction entre un acyltrifluoroborate et un azoture

Le problème majeur de cette méthodologie réside en la difficulté d'obtention des acyltrifluoroborates. Cependant, en 2012, Bode propose une voie simple d'accès à ces composés,[49] lui permettant d'en explorer la réactivité avec des O-benzoyl hydroxylamines (Schéma 25).[50] Les amides issus de cette réaction sont obtenus avec de bons rendements et en seulement 30 minutes de réaction à température ambiante.

[48] G. A. Molander, J. Raushel, N. M. Ellis, *J. Org. Chem*. **2010**, 75, 4304-4306.
[49] A. M Dumas, J. W. Bode, *Org. Lett*. **2012**, 14, 2138-2141.
[50] A. M. Dumas, G. A. Molander, J. W. Bode, *Angew. Chem. Int. Ed*. **2012**, 51, 5683-5686.

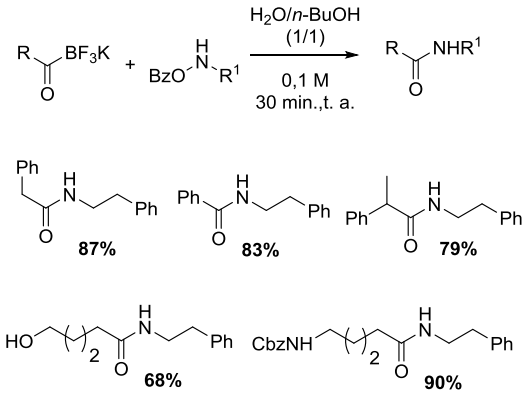


Schéma 25 : Réaction entre un acyltrifluoroborate et une hydroxylamine

Au cours de cette étude, la réactivité des acyltrifluoroborates a été comparée à celle des céto-acides. Il est intéressant de remarquer, sur l'exemple ci-dessous, que les acyltrifluoroborates sont beaucoup plus réactifs que les céto-acides dans les conditions de ligation. En effet, si l'acyltrifluoroborate (**34**) est mis en réaction avec l'hydroxylamine (**38**) en présence du céto-acide (**35**), le produit de réaction entre l'acyltrifluoroborate (**34**) et l'hydroxylamine (**38**) est très largement majoritaire (Schéma 26).

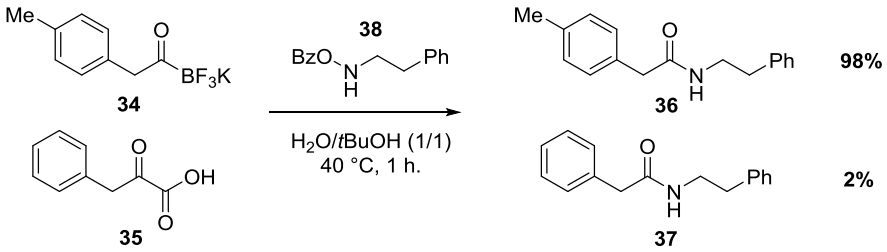


Schéma 26 : Compétition cinétique entre la KAT et la KAHA ligation

D'un point de vue mécanistique, trois chemins réactionnels ont été envisagés. La proposition initiale de Molander implique la formation d'un acyldifluoroborane par perte d'un équivalent de KF, suivi d'une migration 1→2 d'acyle, qui permettrait de former la liaison amide (voie a). Ce mécanisme implique la rupture préliminaire de la liaison Bore-Fluor qui est difficilement envisageable en l'absence d'un composé fluorophile. Dans les deux autres mécanismes proposés, la première étape serait la formation d'un hémiaminal par addition de l'hydroxylamine sur le centre électrophile. L'élimination concertée (voie b) ou la formation d'un nitrilium (voie c) permettrait de former l'amide attendu (Schéma 27).

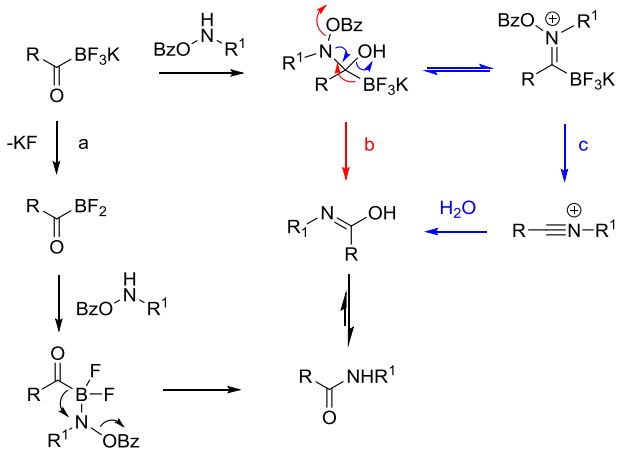


Schéma 27 : Proposition mécanistique pour la KAT ligation

L'utilité de la KAT ligation a pu être illustrée à travers des réactions de ligations chimiosélectives impliquant la lysine de la chaîne latérale du peptide non-protégé GLP-1 (**39**) (Schéma 28). La réaction se déroule dans des conditions équimolaires et en seulement 10 minutes. Les produits désirés sont obtenus avec de très bons rendements (90%).[51] Dans ce cas, une hydroxylamine *N*,*N*-diéthylcarbamate est utilisée à la place d'une hydroxylamine OBz. Cette dernière étant peu stable dans les conditions d'élongation du peptide. A contrario, l'hydroxylamine *N*,*N*-diéthylcarbamate est stable dans des conditions basique (pipéridine/DMF) et acide (TFA). Cette stabilité lui permet donc d'être aisément introduite lors d'un processus d'élongation peptidique, tout en étant réactive dans une dernière étape de KAT ligation.

[51] H. Noda, G. Eros, J. W. Bode, *J. Am. Chem. Soc*. **2014**, *136*, 5611-5614.

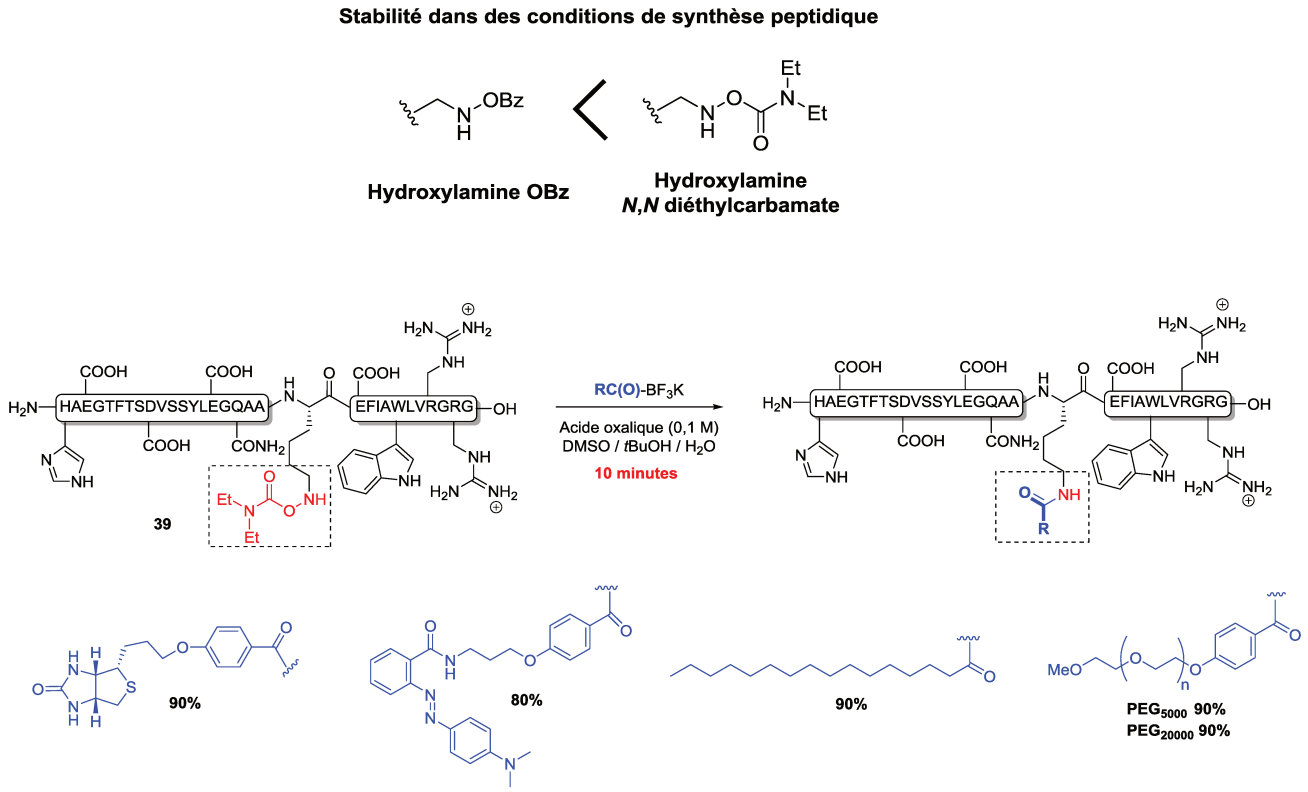


Schéma 28 : Applications de la KAT ligation

➢ Conclusion :

La KAT ligation, très récemment développée par Bode, présente les caractéristiques idéales pour une réaction de ligation ; les temps de réaction sont courts et les réactifs sont utilisés en quantité équimolaires. Cependant, à ce jour, aucun exemple de ligation impliquant deux fragments peptidiques n'a été réalisé.

III.1.4 Ligation de Staudinger

La réaction de Staudinger, découverte par Hermann Staudinger, est une réaction dans laquelle un azoture organique (**40**) réagit avec une phosphine (**41**) pour former un iminophosphorane (aza-ylure) (Schéma 29).[52]

[52] H. Staudinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta*. **1919**, 2, 635-646.

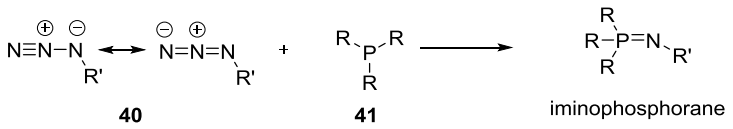


Schéma 29 : Formation d'un aza-ylure (iminophosphorane)

Le plus souvent, cet aza-ylure est transformé en amine par hydrolyse, mais il peut également être additionné sur divers électrophiles, y compris des composés faiblement électrophiles. (Schéma 30).[53]

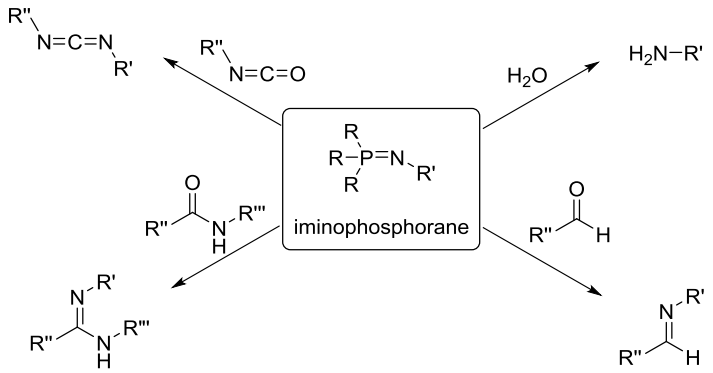


Schéma 30 : Réactivité des iminophosphoranes

Pour illustrer l'intérêt de cette réaction, nous pouvons citer les travaux de Saxon et Bertozzi, qui dans le but de développer des réactions chimiosélectives, bio-orthogonales pour marquer des bio-molécules dans un environnement aqueux, ont développé le réactif (**42**) (Schéma 31). La présence de l'ester méthylique intramoléculaire permet de piéger l'iminophosphorane avant qu'il ne soit hydrolysé.[54] Cette réaction est connue sous le nom de réaction de Bertozzi-Staudinger ou Ligation de Staudinger « nontraceless ». Cette dernière est donc hautement chimiosélective et orthogonale à la plupart des groupements fonctionnels présents dans les systèmes biologiques.

D'un point de vue mécanistique, après avoir formé l'iminophosphorane (**43**), l'ester méthylique présent sur la molécule peut piéger l'iminophosphorane et éviter l'hydrolyse de ce dernier. Le piégage par l'ester méthylique conduit à l'intermédiaire P(V) (**44**) dont la structure a été confirmée par RMN et cristallographie RX.[55] L'hydrolyse de ce dernier conduit, via le passage par l'intermédiaire (**45**), au produit de ligation désiré dans lequel l'oxyde de phosphine est incorporé au composé final.

[53] P. M. Fresnada, P. Molina, *Synlett* **2004**, 1, 1-17.
[54] (a) E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, **287**, 2007-2010. (b) E. Saxon, S. J. Luchansky, H. C. hang, C. Yu, S. C. Lee, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc*. **2002**, 124, 14893-14902.
[55] F. L. Lin, H. M. Hoyt, H. van Halbeek, R. G. Bergman, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc*. **2005**, 127, 2686-2695.

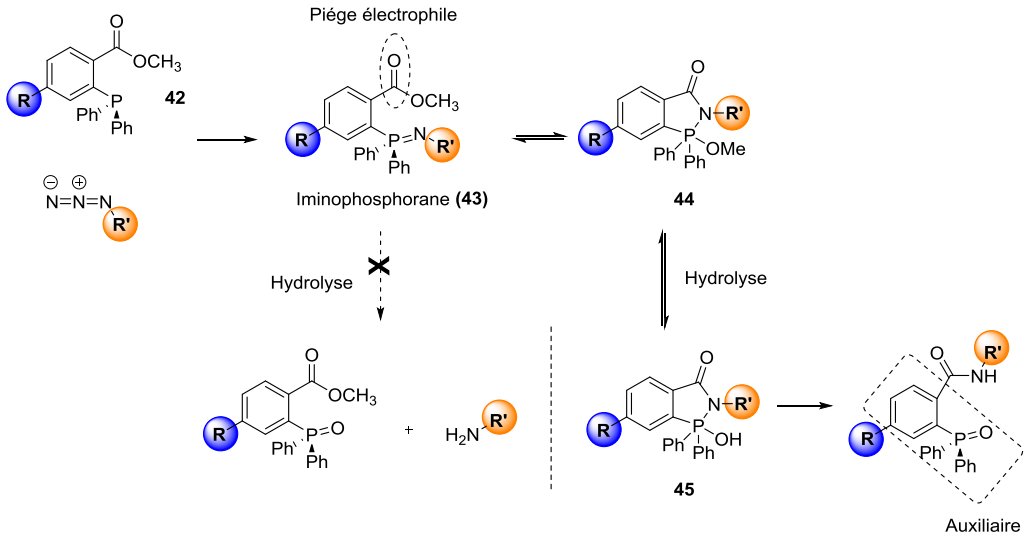


Schéma 31 : Mécanisme de la réaction de Bertozzi-Staudinger

Peu après la publication de ces travaux, Bertozzi[56] et Raines[57] ont proposé de manière indépendante une stratégie de ligation de Staudinger dite « traceless ». Le principe de cette ligation repose sur l'utilisation d'un auxiliaire phosphoré clivable après la réaction permettant ainsi d'obtenir le produit de réaction désiré « détaché » de l'auxiliaire (Schéma 32).

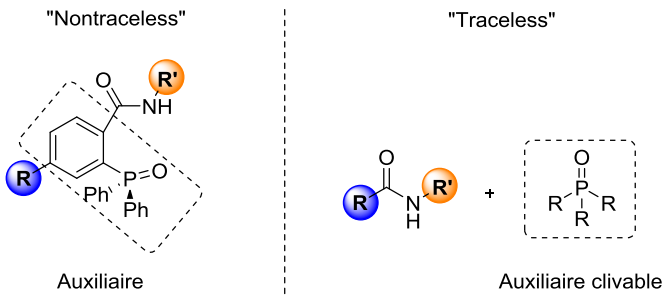


Schéma 32 : Produits de réactions de la ligation de Staudinger « traceless » et « nontraceless »

[56] E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. Bertozzi, *Org. Lett*. **2000**, 2, 2141-2143.
[57] (a) B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, R. T. Raines, *Org. Lett*. **2000**, 2, 1939-1931. (b) B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, R. T. Raines, *Org. Lett*. **2001**, 3, 9-12.

Quelques-uns de ces auxiliaires sont représentés sur la Figure 4.

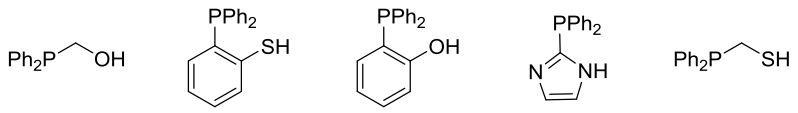


Figure 4: Quelques auxiliaires utilisés pour la ligation de Staudinger « traceless »

Le mécanisme de la réaction est similaire à celui de ligation « nontraceless » (Schéma 33). L'auxiliaire lié de manière covalente au groupement acyle du premier fragment (**46**) fournit après réaction avec le second fragment (**47**) l'iminophosphorane correspondant (**48**). Le piégage électrophile de l'iminophosphorane par le groupement acyle-auxiliaire conduit à la formation de la liaison peptidique. Une dernière étape d'hydrolyse permet de relarguer l'auxiliaire phosphoré oxydé ainsi que le produit de ligation (**50**).[58]

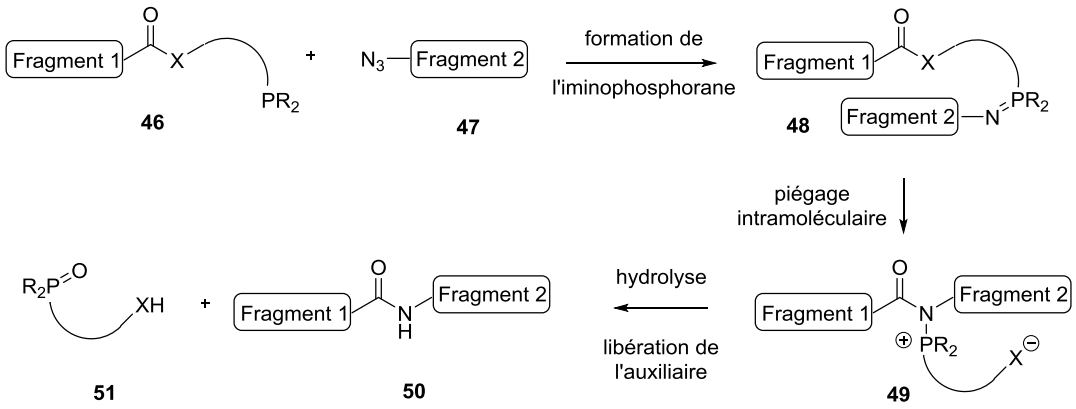


Schéma 33 : Ligation de Staudinger « traceless »

La ligation de Staudinger a connu des applications dans de nombreux domaines, notamment pour la synthèse de glycopeptides.[59] La réaction d'un premier fragment glycopeptide thioester (**52**) et d'un second fragment glycopeptide portant un azoture terminal (**53**) permet d'obtenir le produit de ligation (**54**) avec un rendement de 70% (Schéma 34).

[58] M. B. Soellner, B. L. Nilsson, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc*. **2006**, 128, 8820-8828.
[59] L. Liu, Z. – Y., C. – H. Wong, *ChemBioChem* **2006**, 7, 429-432.

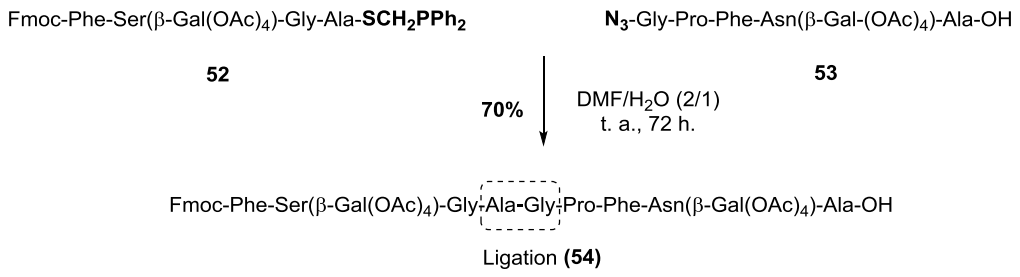


Schéma 34 : Application de la ligation de Staudinger

Une version de la ligation de Staudinger sur support solide a été développée en 2006 par Lee,[60] permettant des conditions de purification simplifiées et l'obtention de produits avec d'excellentes puretés. En effet, l'oxyde de phosphine généré à la fin de la réaction reste greffé sur la résine et une simple filtration du milieu réactionnel permet d'obtenir le produit désiré séparé de l'oxyde de phosphine résiduel. La résine incorporant l'auxiliaire nécessaire à la ligation de Staudinger peut être recyclée par réduction de l'oxyde de phosphine en présence d'un excès de trichlorosilane (Schéma 35).

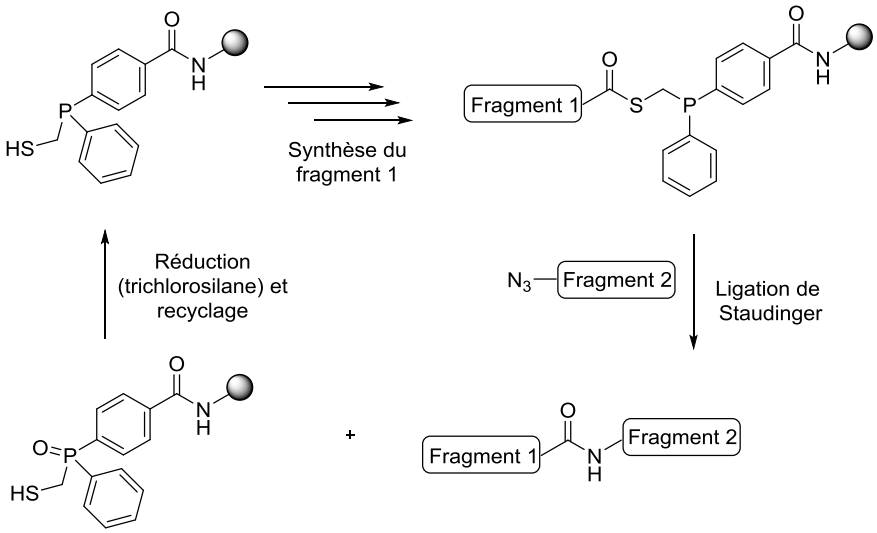


Schéma 35 : Ligation de Staudinger supportée

- <u>Conclusion</u> :

En moins d'une quinzaine d'années, la ligation de type Staudinger a connu un incroyable succès et a été rapidement reconnue comme « a gift to chemical biology »[61] notamment via les travaux de

[60] H. Kim, J. K. Cho, S. Aimoto, Y. – S. Lee, *Org. Lett*. **2006**, 8, 1149-1151.
[61] M. Kohn, R. Breinbauer, *Angew. Chem. Int. Ed*. **2004**, 43, 3106-3116.

Bertozzi. Au-delà des applications pour des ligations bio-orthogonales et en synthèse peptidique, cette méthodologie a également été utilisée en catalyse, chimie des polymères et science des matériaux, en synthèse organique, en synthèse de produits naturels ou pour de l'imagerie in vivo.[62]

III.1.5 Conclusion

Nous venons d'aborder différentes stratégies d'accès aux liaisons peptidiques, via la réaction de « gros » fragments peptidiques, n'impliquant pas l'activation de la fonction acide carboxylique. La Native Chemical Ligation, très certainement la plus répandue, permet aujourd'hui la synthèse de gros peptides, voire de petites protéines. Ces dernières années, de nombreuses avancées dans ce domaine sont apparues, dont la possibilité d'effectuer des ligations sur différents acides α-aminés via des techniques de désulfurisation / désélénisation. L'émergence récente de la KAHA ligation permet également de se rendre compte que d'autres types de réactivité peuvent permettent l'accès à de très gros peptides de manière efficace. Enfin, la ligation de Staudinger, impliquant la réaction entre un dérivé phosphoré et un azoture a montré sa polyvalence et son champ d'application couvre plusieurs domaines. Notamment pour des raisons de solubilité, l'utilisation de conditions aqueuses est nécessaire, ce n'est pas compatible avec l'utilisation d'agents de couplage classiques. Les nombreuses fonctions organiques présentes sur les peptides impliquent ainsi que la réaction soit chimiosélective. De plus, il est très important d'éviter le phénomène d'épimérisation. C'est notamment pour ces raisons, que la création de liaisons peptidiques demeure plus exigeante et présente plus de contraintes que la création d'amides simples.

III.2 Création de liaisons amides « simples »

Après avoir abordé les méthodes « non-classiques » permettant la formation de liaisons peptidiques, dans la section suivante seront traitées, de manière non-exhaustive, les différentes méthodes d'accès aux liaisons amides « simples ». Contrairement à la formation de liaisons peptidiques, il s'agit dans ce cas, très souvent, de « petites molécules » présentant moins de fonctions organiques que les peptides. Pour ces raisons, les outils réactionnels à disposition du chimiste sont plus nombreux. Ces réactions d'amidation peuvent être catalytiques, effectuées à température élevée, utilisant des substrats originaux.

[62] (a) C I. Schilling, N. Jung, M. Biskup, U. Schepers, S. Brase, *Chem. Soc. Rev.,* **2011**, 40, 4840-4871. (b) S. S. van Berkel, M. B. van Eldijk, J. C. M. van Hest*, Angew. Chem. Int. Ed*. **2011**, 50, 8806-8827.

III.2.1 Amidation catalytique d'acides carboxyliques

Dans le contexte du développement d'une chimie verte et plus économe en atomes, de nouvelles méthodes d'amidation catalytiques sont apparues récemment. Les plus marquantes sont détaillées dans les sections suivantes.

III.2.1.1 Catalyse par les dérivés organoborés

En synthèse organique, les composés organoborés sont connus comme étant de bons acides de Lewis. Cependant, leur utilité pour les réactions d'amidation a été reconnue plus récemment. En effet, si leur application en synthèse d'amides est connue depuis 1965, le composé organoboré était utilisé en quantité stoechiométrique.[63] Le premier exemple d'amidation employant une quantité catalytique de dérivé organoboré a été décrit en 1996 par Yamamoto.[64] Il a montré qu'un dérivé arylboronique pauvre en électrons tel que l'acide 3,4,5-trifluorophényle boronique (**55**) pouvait être un bon agent d'amidation. Les amides obtenus peuvent être secondaires (**56**) ou tertiaires (**57**), à partir d'acides, et d'amines aliphatiques et aromatiques (**59**). La réaction est chimiosélective : il est possible de travailler en présence d'un acide α-hydroxycarboxylique sans observer de réaction d'estérification (**60**). L'utilisation de la proline comme substrat conduit à la formation de la dicétopipérazine (DKP) (**58**) correspondante avec un très bon rendement (94%) (Schéma 36).

[63] D. B. Collum, S. - C. Chen, B. Ganem, *J. Org. Chem*. **1978**, 43, 1978-1979.
[64] (a) K. Ishihara, S. Ohara, H. Yamamoto*, J. Org. Chem*. **1996**, 61, 4196-4167. (b) K. Ishihara, S. Ohara, H. Yamamoto, *Organic Syntheses* **2002**, 76, 176-183.

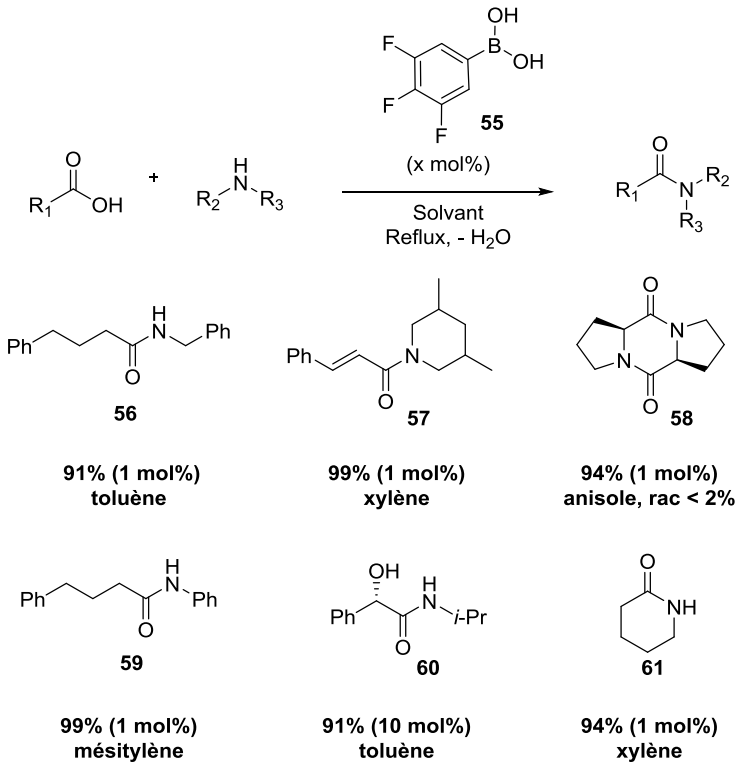


Schéma 36 : Catalyse par les dérivés organoborés : catalyseur de Yamamoto

Le mécanisme proposé pour cette réaction est représenté sur le Schéma 37:[65] L'acide carboxylique peut dans un premier temps réagir avec l'acide arylboronique pour former un intermédiaire acide (acyloxy)boronique (**62**). Après cette étape initiale, l'intermédiaire (**62**) peut réagir avec une amine pour former l'amide correspondant. Il est également possible d'envisager la formation de l'intermédiaire bis(acyloxy)boronique (**63**) par réaction avec un deuxième équivalent d'acide carboxylique. L'aminolyse de cet intermédiaire régénèrerait l'intermédiaire (**62**) et permettrait la formation de l'amide.

[65] C. Wang, H. - Z. Q. - X. Guo, *Org. Biomol. Chem*. **2013**, 11, 2440-2146.

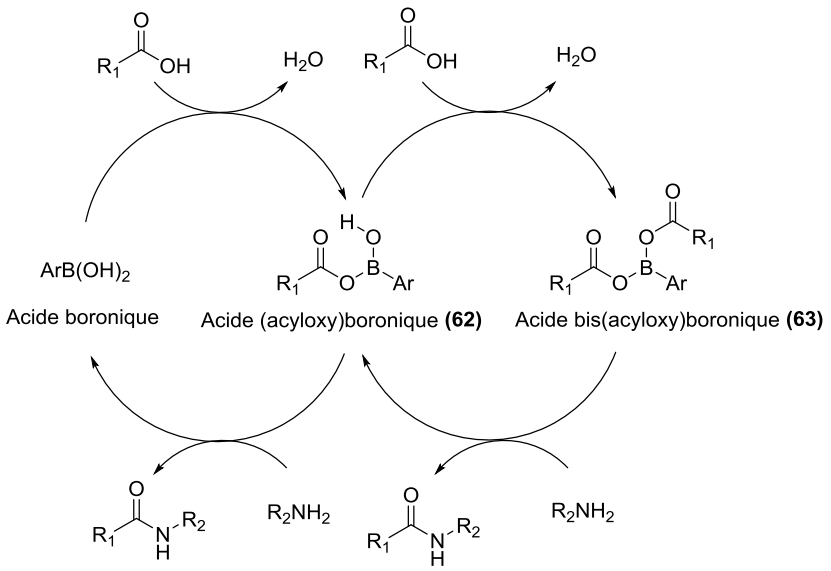


Schéma 37 : Mécanisme de la réaction

De nombreux catalyseurs organoborés ont par la suite été développés,[66] et afin de rationnaliser leur efficacité relative, notamment en ce qui concerne la température de réaction, des études mécanistiques ont été entreprises.

En effet, les réactions se déroulant souvent à des températures élevées (100-110 °C), la possibilité de former l'amide par condensation thermique n'est pas à exclure. La confrontation du mécanisme catalysé et du mécanisme via condensation thermique a ainsi fait l'objet d'une étude par l'équipe de Whiting.[67] Cette étude a montré qu'il était possible, à de telles températures, que la condensation thermique ait lieu. Il est important de noter que cette réaction est substrat dépendante. En effet, la réaction de condensation thermique peut avoir lieu en présence d'acides carboxyliques réactifs (acides carboxyliques aliphatiques). A contrario, elle n'a pas/peu lieu en présence d'acides carboxyliques peu réactifs (acides carboxyliques aromatiques). Dans ce dernier cas, l'utilisation de catalyseurs organoborés permet d'obtenir les produits avec de bons rendements.

Une avancée majeure dans ce domaine est l'utilisation d'acides arylboroniques substitués en position *ortho* par un atome d'iode puisqu'ils permettent d'effectuer ces réactions d'amidation à température ambiante.[68]

[66] (a) H. Lundberg, F. Tinnis, N. Selander, H. Adolfsson, *Chem. Soc. Rev*. **2014**, 43, 2714-2742. (b) T. Maki, K. Ishihara, and H. Yamamoto, *Org. Lett.* **2006**, 8, 1431-1434. (c) R. Yamashita, A. Sakakura, K. Ishihara, *Org. Lett*. **2013**, 15, 3654-3657.
[67] K. Arnold, B. Davies, R. L. Giles, C. Grosjean, G. E. Smith, A. Whiting, *Adv. Synth. Catal*. **2006**, 348, 813-820.
[68] R. M. Al-Zoubi, O. Marion, D. G. Hall, *Angew. Chem. Int. Ed*. **2008**, 47, 2876-2879.

Dans le but d'étudier leur efficacité, ces catalyseurs ont été comparés au catalyseur initial de Yamamoto dans une réaction d'amidation test (Schéma 38). Nous pouvons voir sur l'exemple ci-dessous la différence entre le catalyseur de Yamamoto et différents acides arylboroniques substitués en position *ortho* par différents halogènes. Lorsque l'acide *ortho* iodo-phénylboronique est utilisé, le produit est obtenu avec un rendement de 91%. À l'inverse, l'acide *ortho* fluoro-phénylboronique et le catalyseur de Yamamoto permettent d'isoler le produit avec des rendements plus faibles (41% et 42% respectivement).

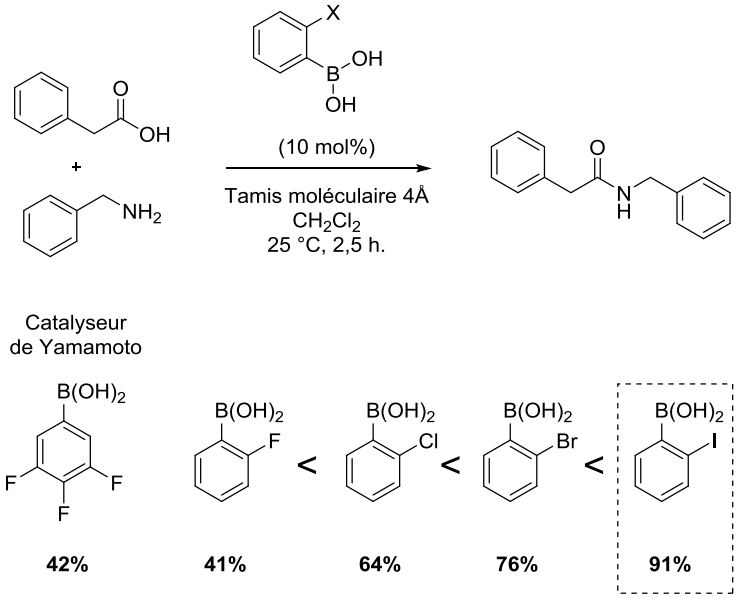


Schéma 38 : Étude de l'effet de l'atome d'halogène

Ces résultats, somme toute surprenants, ont pu par la suite être éclairés par une étude DFT réalisée indépendamment par Marcelli[69] et Fu.[70] Les deux études sont concordantes sur le fait que l'étape cinétiquement déterminante de la réaction est l'étape de clivage de la liaison C-O de l'intermédiaire tétraédrique hémiaminal (**64**) (Schéma 39) et que l'atome d'iode joue un rôle déterminant au cours de cette étape : l'abaissement de la barrière énergétique par stabilisation de l'état de transition.

[69] T. Marcelli, *Angew. Chem. Int. Ed*. **2010**, 49, 6840-684.
[70] C. Wang, H.- Z. Yu, Y. Fu, Q. - X. Guo, *Org. Biomol. Chem*, **2013**, 11, 2140-2146.

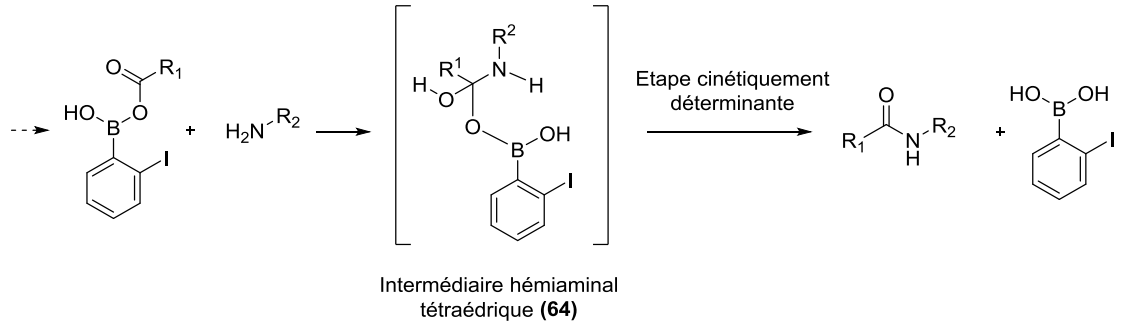


Schéma 39 : Étape cinétiquement déterminante de la réaction

Cependant, les calculs effectués par Marcelli et Fu concernant la manière dont l'atome d'iode permet la stabilisation de l'état de transition diffèrent :

- <u>Étude de Marcelli</u> : Dans les calculs présentés par Marcelli, l'état de transition serait stabilisé par une liaison hydrogène entre l'atome d'iode et l'atome d'hydrogène H_1 formant un cycle à 6 chaînons et faisant intervenir une molécule d'eau (Figure 5). L'intervention de cette molécule d'eau dans l'état de transition semble être en désaccord avec les résultats expérimentaux. En effet, du tamis moléculaire est nécessaire à la réaction et devrait piéger l'eau libérée lors de la formation de l'acide (acyloxy)boronique.

- <u>Étude de Fu</u> : Dans l'étude reportée par Fu, aucune liaison hydrogène n'est observée dans l'état de transition. L'acide phénylboronique étant plan du à la conjugaison entre les orbitales π du groupement phényle et l'orbitale *p* du bore, la présence de l'atome d'iode volumineux en position *ortho* conduit à la perte de cette conjugaison. L'atome d'iode est alors hybridé sp_2 et un recouvrement orbitalaire entre l'orbitale sp_2 pleine de ce dernier et l'orbitale p vide de l'atome de bore permettrait la stabilisation de l'état de transition (Figure 5).

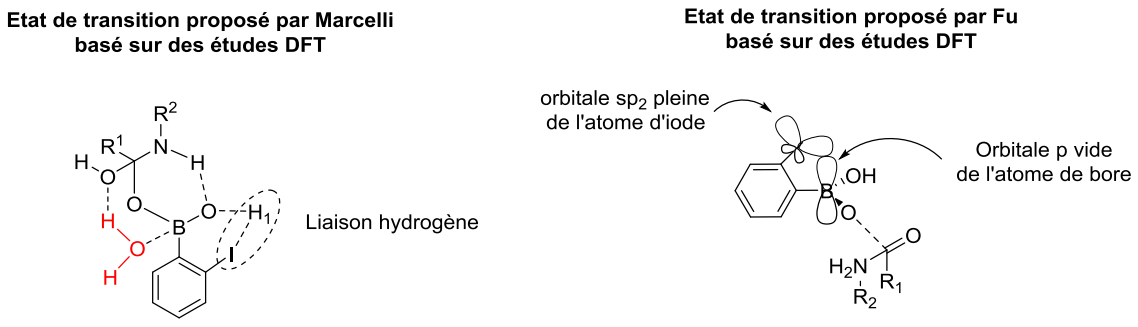


Figure 5 : Etudes de l'état de transition

L'éclaircissement du mécanisme via ces travaux a permis le développement de nouveaux catalyseurs efficaces à température ambiante.

L'équipe de Blanchet a développé un nouveau catalyseur organoboré (**65**) capable de catalyser la réaction d'amidation à température ambiante.[71] De manière très intéressante, ce catalyseur a été utilisé pour la synthèse d'un dipeptide. Le produit de couplage entre Boc-Phe-OH et H_2N-Val-OMe est obtenu sans épimérisation (Schéma 40). Cependant, dans le cas des acides α-aminés, une température de 65 °C est nécessaire et la charge catalytique est plus élevée (25 mol%).

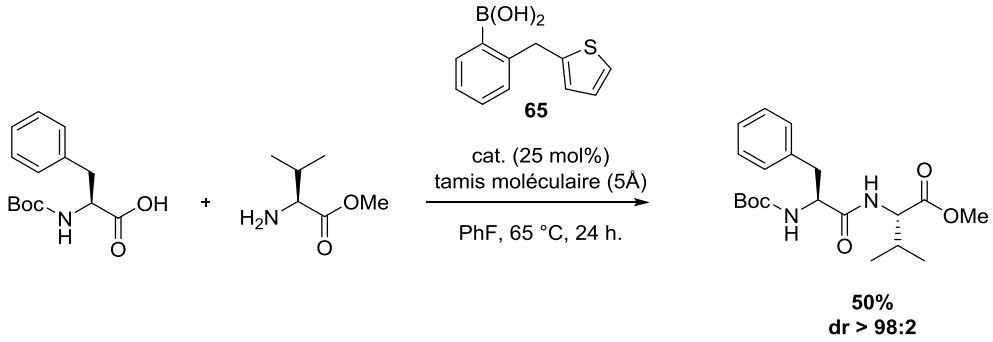


Schéma 40 : Couplage peptidique catalysé par un catalyseur organoboré

Soucieux du développement de méthodes éco-compatibles, Wang a mis au point une méthode d'amidation impliquant un acide boronique supporté. La réaction est menée en présence d'une quantité catalytique du dérivé organoboré (1 à 5 mol%) au reflux du toluène et avec piégeage d'eau (Soxhlet chargé de tamis moléculaire).[72] Le potentiel du catalyseur à être recyclé a été étudié et Wang n'a observé aucune perte de l'activité catalytique après trois cycles de réaction (Schéma 41).

[71] T. Mohy El Dine, W. Erb, Y. Berhault, J. Rouden, J. Blanchet, *J. Org. Chem*. **2015**, 80, 4532-4544.
[72] R. Latta, G. Springsteen, B. Wang, *Synthesis* **2001**, 11, 1611-1613.

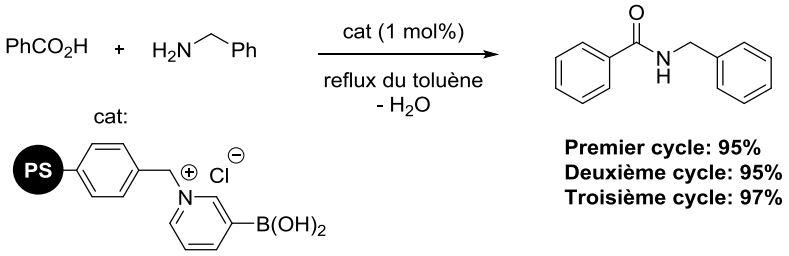


Schéma 41 : Catalyseur organoboré supporté

➢ Conclusion :

La réaction d'amidation catalysée par des composés organoborés représente un axe de recherche intéressant et prometteur pour la création de liaisons amides et peptidiques. Cependant, à ce jour, les conditions opératoires que nécessite cette méthodologie (solvants, température, milieu anhydre…) ainsi que les résultats obtenus ne représentent pas encore une alternative intéressante à la synthèse peptidique classique.

III.2.1.2 Amidation catalytique d'acide carboxylique catalysée par les métaux

Comme nous l'avons vu précédemment, la condensation thermique d'un acide carboxylique et d'une amine peut avoir lieu à haute température dans des solvants apolaires et aprotiques de manière plus ou moins efficace en fonction des substrats utilisés.[67] Cependant, l'ajout dans le milieu réactionnel de métaux de transition peut permettre de catalyser la réaction et d'augmenter les rendements.[73] La réaction entre la Boc-Pro-OH et la benzylamine à 110 °C catalysée par le tétrachlorure de zirconium ($ZrCl_4$) permet d'isoler le produit de couplage avec un rendement de 56% alors qu'aucun produit de couplage n'est obtenu en l'absence de catalyseur (Schéma 42).

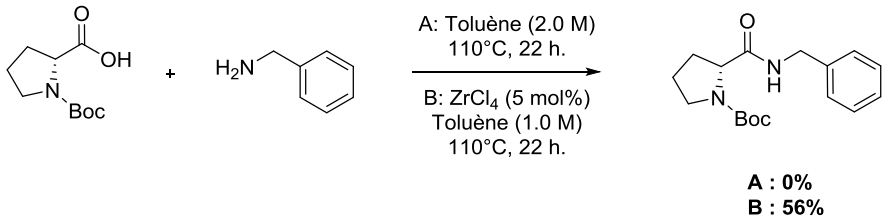


Schéma 42 : Amidation catalysée par les métaux

[73] C. L. Allen, A. R. Chhatwal, J. M. J. Williams, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 666-668.

En 2012, Adolfsson[74] et Williams[73] ont montré de façon indépendante que les sels de zirconium pouvaient être des acides de Lewis efficaces pour les réactions d'amidation d'acides carboxyliques non activés. La réaction se déroule à température élevée (70-110 °C) en présence d'une quantité catalytique de sels de zirconium (2-10 mol%). Les produits sont obtenus avec des rendements modérés à bons. Il est important de noter que le produit de couplage entre la Boc-Pro-OH, Boc-Ala-OH et la benzylamine est obtenu sans qu'aucune épimérisation ne soit détectée (Schéma 43).

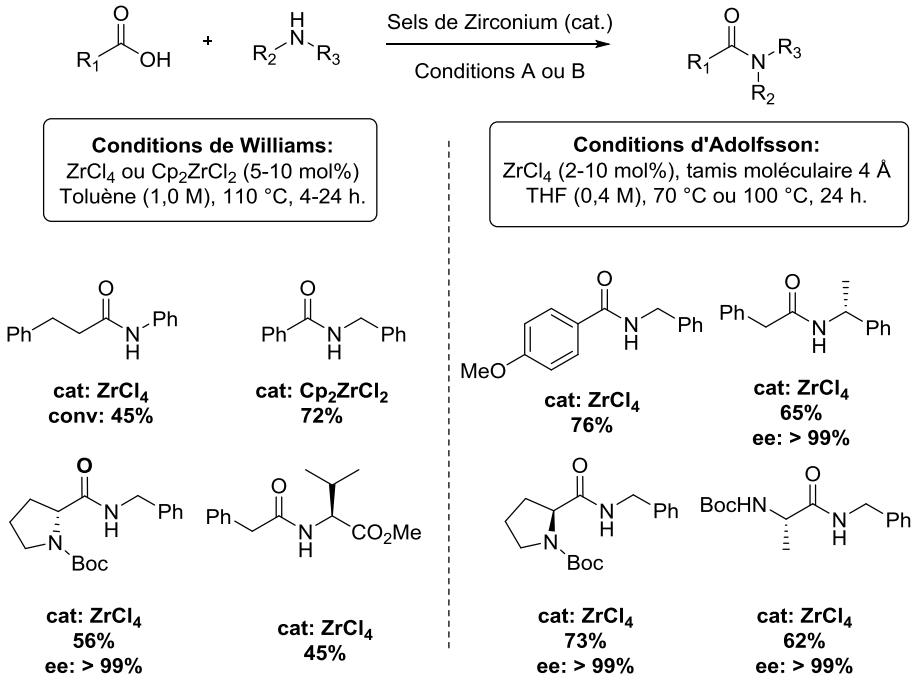


Schéma 43 : Étendue de la réaction d'amidation catalysée par des sels de Zirconium

Adolfsson a également montré que le $Ti(O_iPr)_4$ pouvait être un catalyseur efficace. L'utilisation de cet acide de Lewis permet l'obtention d'amides avec de bons rendements (61-99%). Cependant, lorsque le (*S*)-ibuprofène est couplé à la benzylamine, une racémisation conséquente a pu être détectée (ee : 83%).[75]

De plus, une version à partir de billes d'aluminium activées a été développée. L'intérêt de cette méthodologie (qui se déroule à 140 °C) est de pouvoir recycler les billes d'aluminium et après trois cycles, aucune perte de l'activité catalytique n'est observée.[76]

[74] H. Lundberg, F. Tinnis, H. Adolfsson, *Chem. Eur. J.* **2012**, 18, 3822-3826.
[75] H. Lundberg, F. Tinnis, H. Adolfsson, *Synlett* **2012**, 23, 2201-2204.
[76] S. Ghosh, A. Bhaumik, J. Mondal, A. Mallik, S. Sengupta, C. Mukhopadhyay, *Green Chem*. **2012**, 14, 3220-3229.

➢ Conclusion :

La condensation directe d'acides carboxyliques et d'amines pour former une liaison amide catalysée par des métaux de transition est une méthodologie intéressante pour la synthèse d'amides « simples » ne présentant aucun groupement sensible. Même si quelques exemples ont été décrits à partir d'acides α-aminés ou autres substrats chiraux, la température ainsi que les solvants utilisés (solvants apolaires) que requiert cette réaction semble être peu compatible pour une application en synthèse peptidique ou pour l'élaboration d'amides complexes.

III.2.2 Amidation oxydante d'alcools catalysée par les métaux

L'amidation oxydante catalysée par les métaux représente un sujet de recherche émergent pour la synthèse d'amides avec économie d'atomes. Le paragraphe ci-dessous résume les avancées récentes concernant ce domaine.

La formation d'amides catalysée par les métaux de transition a connu un essor considérable ces dernières années.[77] L'intérêt de ce procédé, en terme d'économie d'atomes, est important dans le sens où le seul sous-produit de la réaction est le dihydrogène. Le mécanisme général de cette méthodologie est décrit ci-dessous (Schéma 44). La première étape du mécanisme consiste en l'oxydation de l'alcool en aldéhyde par perte de dihydrogène. L'amine présente dans le milieu peut alors s'additionner sur l'aldéhyde pour former un intermédiaire hémiaminal (**66**). À ce stade, deux possibilités sont envisageables, la ré-oxydation de l'hémiaminal pour former l'amide désiré ou la perte d'une molécule d'eau suivie de la réduction de l'imine pour donner l'amine de départ alkylée.

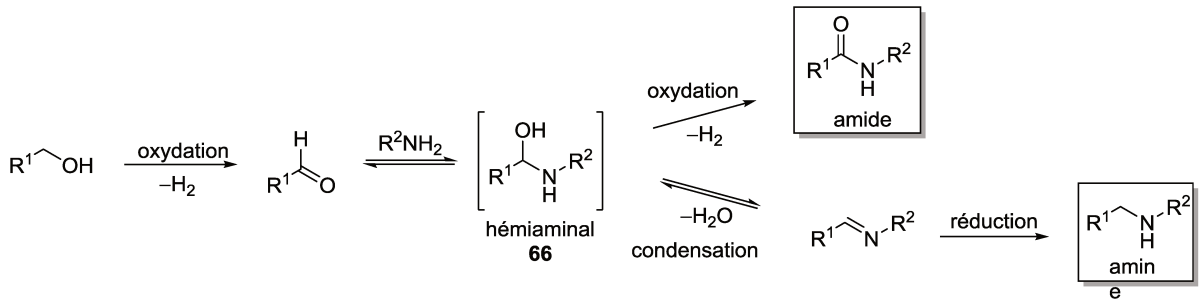
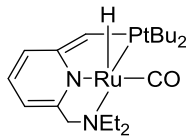


Schéma 44 : Concept mécanistique de la réaction

[77] C. Chen, S. H. Hong, *Org. Biomol. Chem*. **2011**, 9, 20-26.



Catalyseur de Milstein
67

Le premier exemple effectué de manière intermoléculaire permettant d'illustrer cette méthodologie a été décrit par Milstein en 2007.[78] Le catalyseur utilisé pour cette réaction est un complexe de ruthénium (**67**) qui est aujourd'hui commercialisé.

La réaction est effectuée avec un ratio 1:1 d'amine et d'alcool à reflux du toluène et permet d'isoler les amides correspondants avec de très bons rendements. La réaction est sensible à l'encombrement stérique en position α de l'alcool (**70**). Cependant, la réaction ne fonctionne qu'avec les amines primaires, aucun produit (**71**) n'est obtenu en présence de dibenzylamine et d'hexanol (Schéma 45).

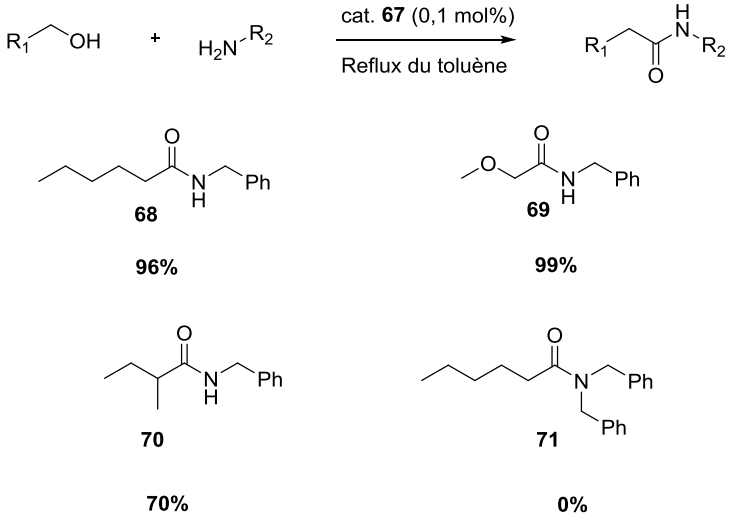


Schéma 45 : Étendue de la réaction

Le mécanisme proposé par Milstein est illustré ci-dessous (Schéma 46) :

La première étape de cette réaction est une déhydrogénation (oxydation) de l'alcool via l'intermédiaire **73** pour former l'aldéhyde **74** correspondant avec réaromatisation du catalyseur. L'addition de l'amine sur l'aldéhyde ainsi formé permet la formation d'un hémiaminal (**76**). Dans un même temps, le complexe aromatisé (**75**) se déaromatise par perte de dihydrogène pour redonner le complexe actif (**72**). La réaction de l'hémiaminal avec ce dernier mène à la formation de l'intermédiaire aromatique (**77**) qui après une réaction de β-H élimination permet la formation de l'amide désiré avec régénération du complexe **75**.

En accord avec le mécanisme proposé, un courant d'argon est nécessaire afin d'éliminer le dihydrogène du milieu.

[78] C. Gunanathan, Y. Ben-David, D. Milstein, *Science* **2007**, 317, 790-792.

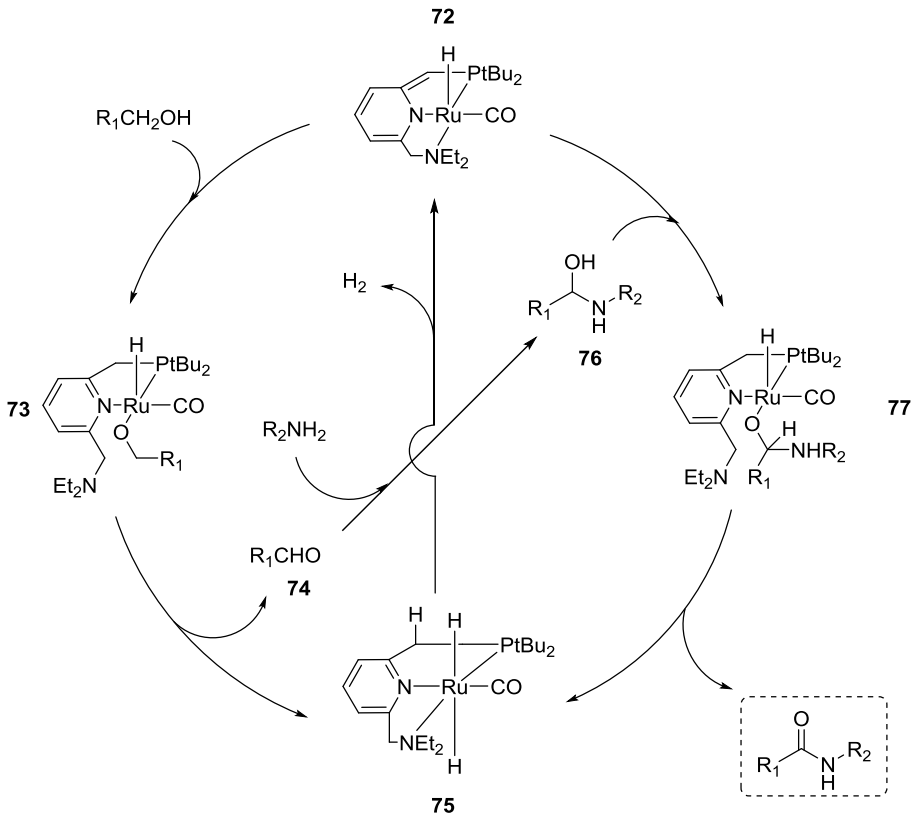


Schéma 46 : Mécanisme de la réaction

En s'appuyant sur ces travaux, le groupe de Madsen a développé en 2008 un nouveau système catalytique à partir d'un complexe de ruthénium commercial [Ru(COD)Cl_2], de carbènes *N*-hétérocycliques (NHC) et de ligands phosphines (Schéma 47).[79] Le système catalytique est efficace avec différents alcools et amines primaires. Les substrats plus encombrés ou les amines peu nucléophiles (anilines) nécessitent une température plus élevée (163 °C).

[79] L. U. Nordstrøm, H. Vogt, R. Madsen, *J. Am. Chem. Soc*. **2008**, 130, 17672-17673.

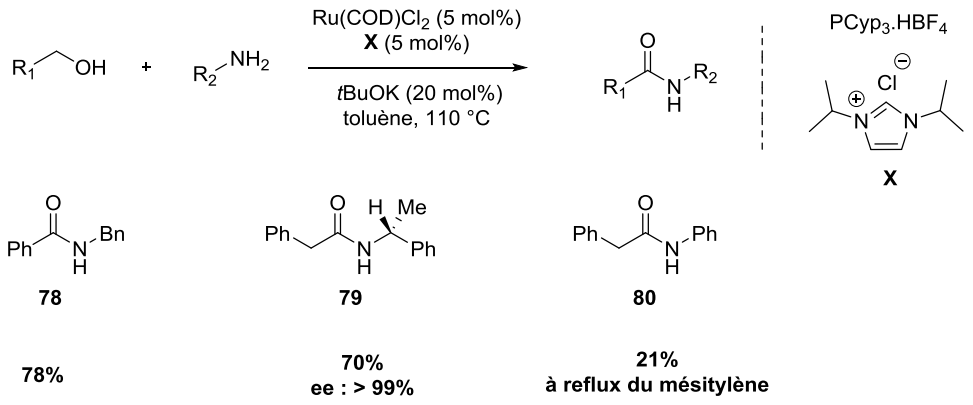


Schéma 47 : Système catalytique développé par Madsen

Les premiers travaux de Madsen ont permis d'obtenir des informations d'un point de vue mécanistique. Le mécanisme semble être similaire à celui proposé par Milstein et passe par les mêmes « étapes »: (a) oxydation de l'alcool en aldéhyde, b) formation d'un intermédiaire hémiaminal, c) oxydation de l'hémiaminal en amide) (Schéma 48).

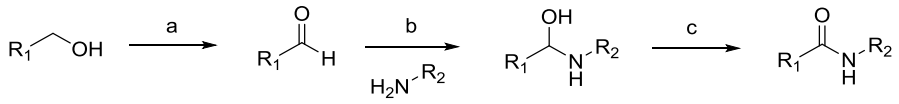


Schéma 48 : Mécanisme simplifié de la réaction

- Cependant, il est théoriquement possible de générer un intermédiaire hémiacétal par addition de l'alcool n'ayant pas encore réagi sur l'aldéhyde généré. L'oxydation de l'hémiacétal conduirait à la formation d'un ester qui pourrait réagir avec l'amine et former l'amide désiré (Schéma 49).

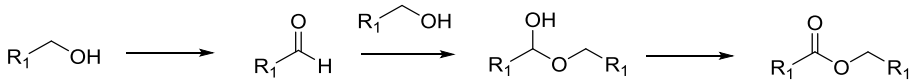


Schéma 49 : Étude mécanistique, formation d'un ester

Pour vérifier cette hypothèse, l'ester 2-phényléthyle 2-phénylacétate a été traité par la benzylamine en présence de catalyseur et le produit d'amidation n'a pas été observé. Cette hypothèse mécanistique peut donc être exclue (Schéma 50).

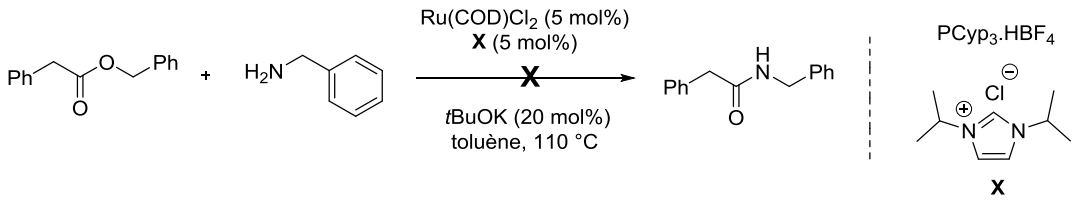


Schéma 50 : Étude excluant le passage par un ester

- Il est également possible d'envisager dans le mécanisme la formation d'une imine par perte d'une molécule d'eau sur l'intermédiaire hémiaminal. Cette imine qui serait ensuite réduite par le complexe (« RuH_2 ») conduirait au sous-produit d'alkylation de l'amine de départ (Schéma 51).

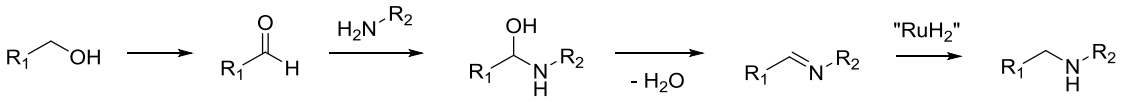


Schéma 51 : Étude mécanistique, formation de l'amine alkylée

Or, la réaction du benzaldéhyde et de la benzylamine ne conduit ni à l'amine, ni à l'amide. En effet, dans ces conditions, cette réaction conduit essentiellement à la formation de l'imine qui s'avère stable et qui n'évolue vers aucun produit, même en présence d'eau ou sous atmosphère d'hydrogène (Schéma 52).

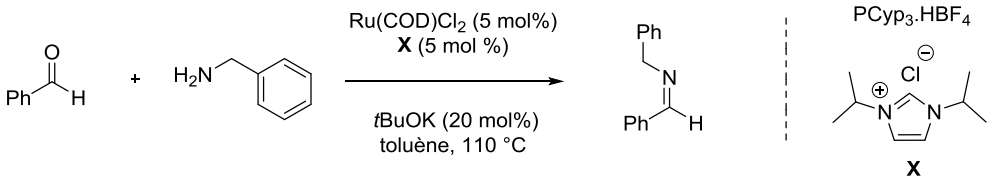


Schéma 52 : Étude mécanistique, formation d'une imine

Afin de justifier ces résultats, les auteurs postulent que l'aldéhyde et l'hémiaminal formés au cours de la réaction restent coordinés au métal et qu'aucun aldéhyde ni hémiaminal « libre » ne sont présents dans le milieu (Schéma 53). En effet, si un aldéhyde « libre » était présent dans le milieu, celui-ci aurait dû évoluer vers la formation d'une imine.

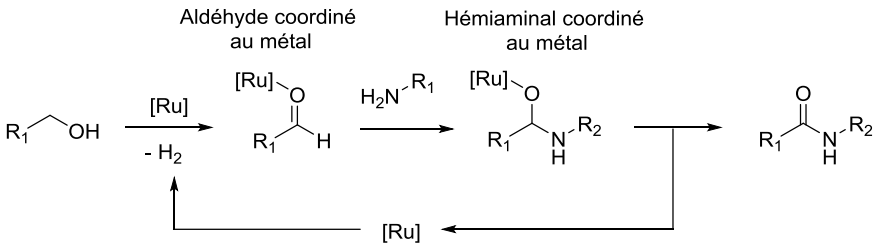


Schéma 53 : Coordination des intermédiaires au métal

Après ces premières informations, le mécanisme de la réaction a fait l'objet de nombreuses études théoriques.[80]

Le système catalytique proposé par Madsen ne permet pas l'obtention de meilleurs résultats en termes d'étendue de réaction ou de rendement que celui de Milstein. Cependant, dans le système catalytique présenté par Madsen, le catalyseur actif est généré *in-situ* dans la réaction à partir d'un complexe de ruthénium commercial ($Ru(COD)Cl_2$) et de ligands simples et commerciaux. Cette première approche a ouvert la porte à l'utilisation d'autres métaux pour catalyser cette réaction. Ainsi, ces dernières années, de nombreux systèmes catalytiques impliquant différents métaux ont été développés : Cuivre,[81] Argent,[82] Or,[83] Rhodium,[84] Fer,[85] Zinc.[86]

- <u>Conclusion</u> :

Cette méthodologie permettant de créer une liaison amide à partir d'un alcool et d'une amine est très intéressante pour la synthèse organique. L'utilisation d'un catalyseur en très faible quantité et le peu de sous-produits réactionnels dégagés (dihydrogène) est extrêmement intéressant dans le contexte du développement d'une chimie respectueuse de l'environnement. Cependant, il est difficile d'envisager son application en synthèse peptidique. La présence de différentes fonctions organiques présentes dans les peptides (liaison peptidique, uréthane et chaînes latérales…) pourrait altérer le bon déroulement de la réaction.

[80] (a) O. Eisenstein, *Organometallics* **2010**, 29, 6548-6558. (b) J. Y. Lee, *Organometallics* **2013**, 2, 4571-4576. (c) S. Kegnæs, *Catalysis Today* **2013**, 20, 211-216.
[81] X. Bantreil, C. Fleith, J. Martinez, F. Lamaty, *ChemCatChem* **2012**,4, 1922-1925.
[82] K. Shimizu, K. Oshima, A. Satsuma, *Chem. Eur. J*. **2009**, 15, 9977-9980.
[83] J - F Soulé, H. Miyamura, S. Kobayashi, *Chem. Asian. J*. **2013**, 8, 2614-2626.
[84] T. Zweifel, J. – V. Naubron, H. Grützmacher*, Angew. Chem. Int. Ed*. **2009**, 48, 559-563.
[85] (a) S. Gaspa, A. procheddu, L. de Luca, *Org. Biomol. Chem***. 2013**, 11, 3803-3807. (b) X. Bantreil, N. Kanfar, N. Gehin, E. Golliard, P. Ohlmann, J. Martinez, F. Lamaty, *Tetrahedron* **2014**, 70, 5093-5099.
[86] X. – F. Wu, M. Sharif, A. Pews – Davtyan, P. Langer, K. Ayub, M. Beller, *Eur. J. Org. Chem*. **2013**, 2783-2787.

Le même principe a également été transposé à des substrats de type aldéhyde, mais ce concept est moins étendu à ce jour.[87]

III.2.3 Stratégie umpolung

III.2.3.1 Utilisation d'α bromo nitroalcanes et d'halo-amines

Après avoir abordé des stratégies catalytiques (dérivés organoborés), des amidations oxydantes à partir d'alcools, nous allons nous intéresser à une stratégie récente, où les amides sont synthétisés par inversion de polarité (umpolung).

En 2010, Johnston a exploré la réactivité des α-bromo nitroalcanes (**81**) avec des halo-amines (**82**) générées *in situ*.[88] Le concept de cette méthodologie est de générer un équivalent d'anion acyle qui réagit avec une amine électrophile, d'où le terme de stratégie umpolung (Schéma 54).

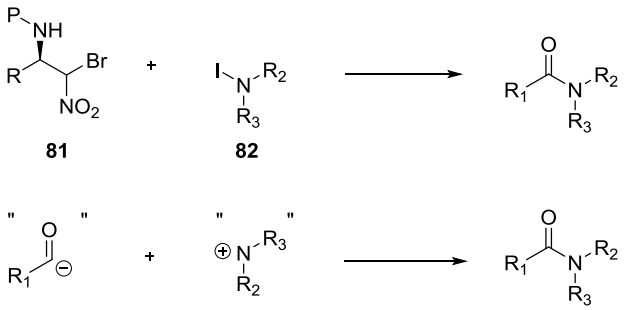


Schéma 54 : Concept de la réactivité umpolung

La réaction se déroule dans des conditions douces et permet l'accès aux produits finaux avec de bons rendements. Ces conditions sont compatibles avec un large évantail d'acides α-aminés non-protégés. Cependant, seuls des dérivés de phénylglycine sont décrits (dans le cadre de la synthèse de dipeptides). Les produits de couplage sont néanmoins obtenus sans qu'aucune épimérisation ne soit détectée, ce qui est très intéressant sachant que cet acide α-aminé est très sensible à la racémisation (Schéma 55).

[87] Quelques exemples sélectionnés: (a) W.- J. Yoo, C. – J. Li, *J. Am. Chem. Soc*. **2006**, 128, 13064-13065. (b) G.- L. Li, K. K.- Y. Kung, M.- K. Wong, *Chem. Commun*. **2012**, 48, 4112-4114. (c) S. C. Ghosh, J. S. Y. Ngiam, C. L. L. Chai, A. M. Seayad, T. T. Dang, A. Chen*, Adv. Synth. Catal*. **2012**, 354, 1407 – 1412.

[88] B. Shen, D. M. Makley, J. N. Johnston, *Nature* **2010**, 465, 1027-1033.

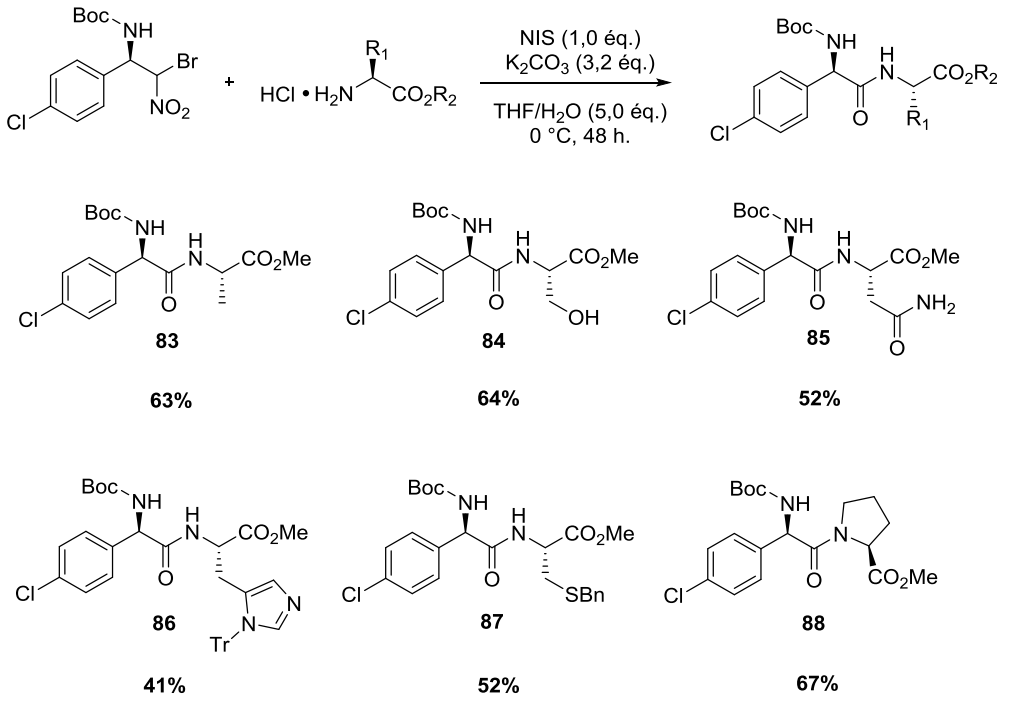


Schéma 55 : Étendue de la réaction

Le mécanisme initialement proposé impliquait la formation d'une iodo-amine (**90**) pouvant être piégée par le dérivé α-bromo nitro-alcane (**89**). Cette réaction conduit à un intermédiaire tétraédrique (**91**) pouvant éliminer l'atome de brome ou le nitrite et finalement être hydrolysé pour donner l'amide souhaité (Schéma 56).

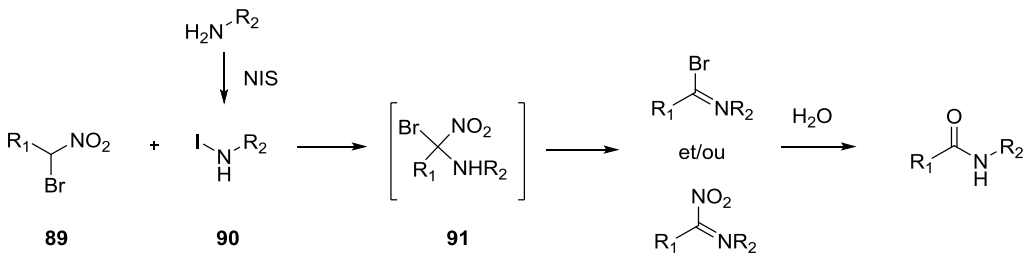


Schéma 56 : Mécanisme initialement proposé

Afin d'étayer cette hypothèse, différentes expériences de marquage à l'oxygène 18 ont été réalisées et ont permis de révéler un mécanisme plus complexe. En effet, lorsque la réaction est menée en présence d'eau marquée, aucun produit de marquage n'est observé (Schéma 57). Cette expérience permet de révéler que l'eau n'est pas la source d'oxygène de l'amide produit.

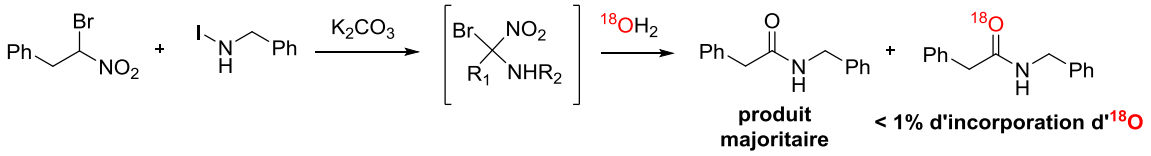


Schéma 57 : Étude mécanistique : eau marquée

Il a par la suite été envisagé le fait que l'oxygène puisse provenir du bromo-nitroalcane, ou du dioxygène ambiant. L'utilisation de bromo-nitroalcane marqué (à 82%) conduit à l'amide correspondant présentant un taux d'incorporation d'^{18}O de 66% sous atmosphère d'argon (Schéma 58 (a)). Cependant, si la réaction est menée seulement sous atmosphère d'oxygène marqué, un fort degré d'incorporation d'^{18}O est là encore observé (Schéma 58(b)).

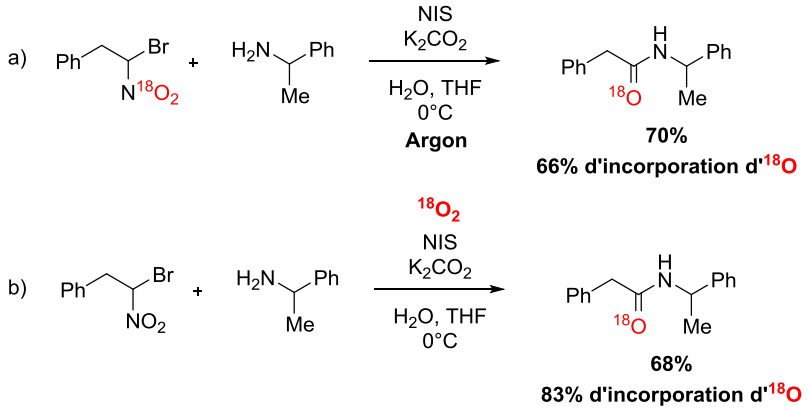


Schéma 58 : Etude mécanistique, marquage à l'^{18}O

Johnston a finalement proposé un mécanisme permettant de justifier ces observations (Schéma 59). L'intermédiaire tétraédrique (**92**) peut évoluer via une rupture homolytique vers la formation du radical (**93**) et du radical nitrite. À ce stade, deux voies réactionnelles sont envisageables. En milieu aérobique, le radical (**93**) peut réagir avec l'oxygène radicalaire pour former l'espèce (**94**) qui évolue vers la formation de l'amide. En milieu anaérobique, la recombinaison radicalaire avec isomérisation du radical nitrite et du radical (**93**) conduit à l'espèce (**95**) qui fournit après hydrolyse la liaison amide.

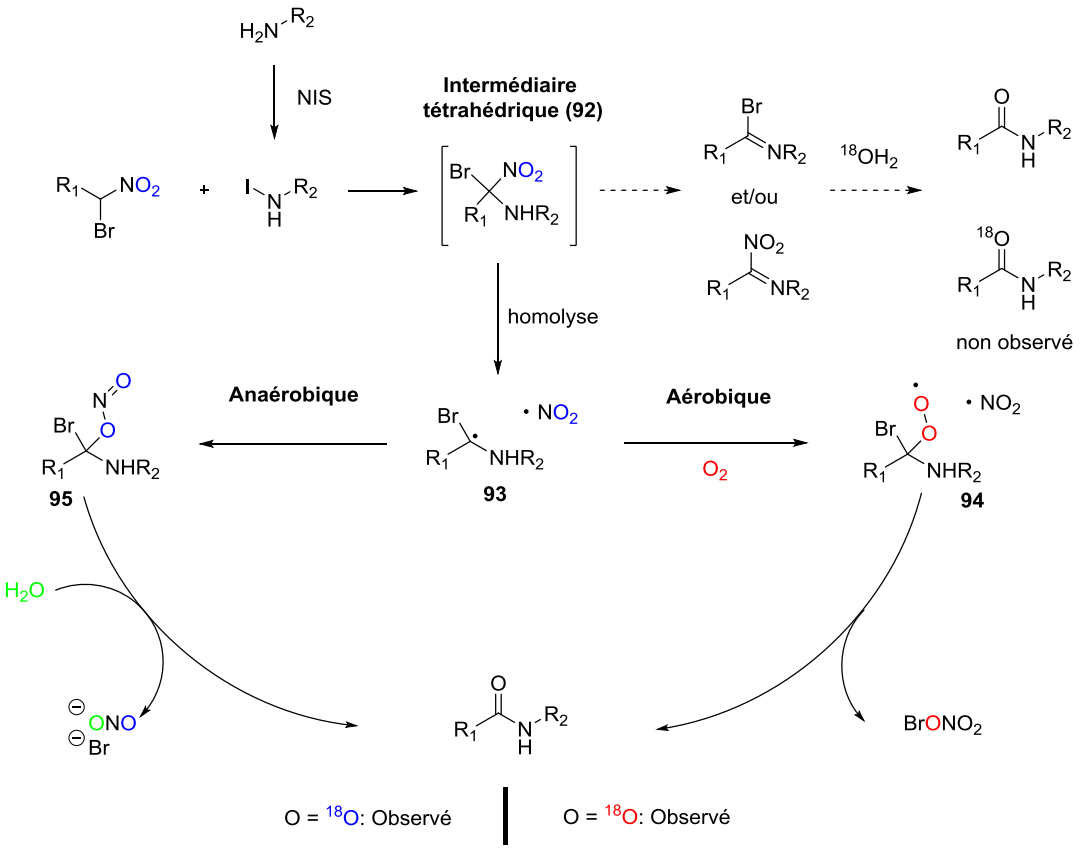


Schéma 59 : Mécanisme proposé

Nous pouvons voir qu'au cours du processus aérobique, un équivalent de $BrONO_2$ est généré dans le milieu. Il est possible d'envisager, via cette espèce, la formation d'un ion bromonium (Br^+) pouvant bromer l'amine de départ, et la réengager dans le cycle catalytique (Schéma 60).

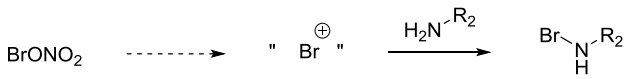


Schéma 60 : Formation hypothétique d'un bromonium

En s'appuyant sur cette observation, l'équipe de Johnston a développé une version aérobique et catalytique en *N*-iodosuccinimide (NIS).[89] Il est intéressant de noter que les rendements obtenus en version catalytique sont similaires à ceux obtenus en version stœchiométrique (Schéma 61).

[89] K. E. Schwieter, B. Shen, J. P. Shackleford, M. W. Leighty, J. W. Johnston, *Org. Lett*. **2014**, 16, 4714-4717.

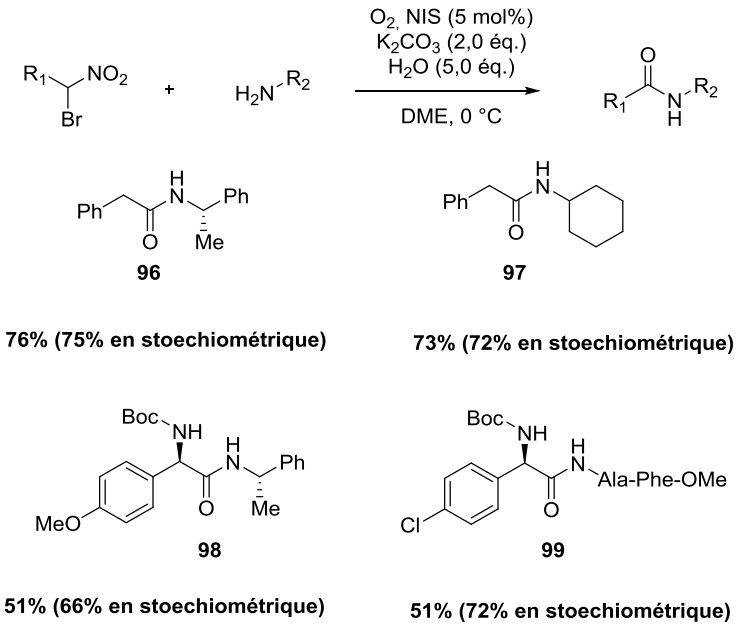


Schéma 61 : Étendue de la réaction

Cette méthodologie a également été employée pour la synthèse d'α-oxy amides.[90] Encouragés par le développement d'une réaction de Henry énantiosélective catalysée par des sels de cuivre, les auteurs ont utilisé les produits de cette réaction pour la méthodologie umpolung récemment développée (Schéma 62). Les produits sont obtenus avec des rendements modérés, mais des excès énantiomériques excellents, ce qui est intéressant pour ces composés qui sont habituellement très sensibles à la racémisation (via la stratégie classique).

[90] M. W. Leighty, B. Shen, J. N. Johnston, *J. Am. Chem. Soc*. **2012**, 134, 15233-15236.

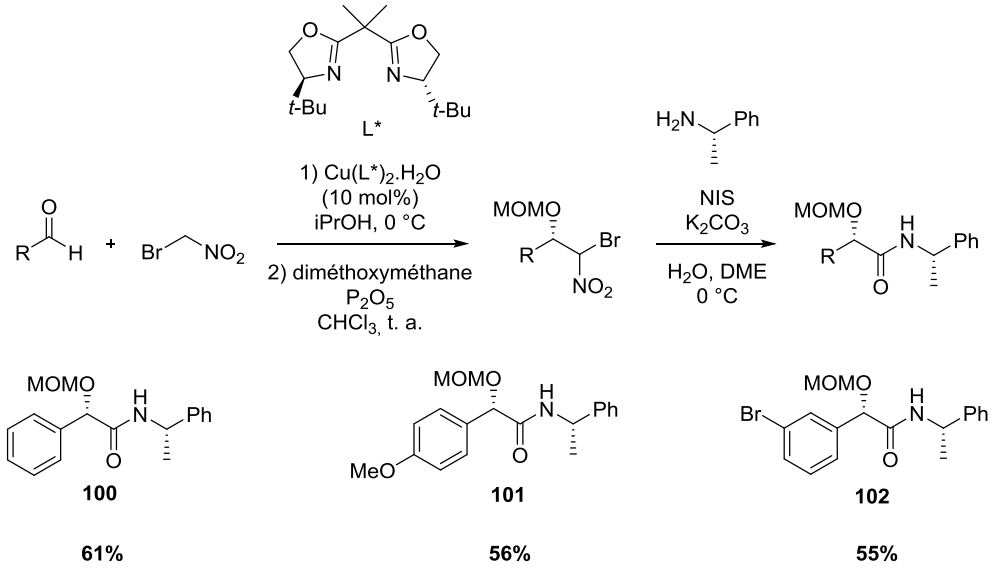


Schéma 62 : Synthèse d'α-oxy amides

➢ Conclusion :

Cette méthodologie, permettant la création d'une liaison amide, via l'utilisation d'une amine électrophile et d'un composé α-bromo-nitroalcane, demeure très intéressante sur le plan conceptuel et synthétique. Il s'agit de la première méthode d'amidation basée sur l'inversion de polarité des substrats. Par ailleurs, l'utilisation de dioxygène ^{18}O peut s'avérer très intéressante pour le marquage d'amides.

III.2.3.2 Utilisation de carbènes *N*-hétérocycliques

Très récemment, une nouvelle version d'amidation umpolung a été développée.[91] La réaction met en jeu un aldéhyde et une amine électrophile, catalysée par un carbène *N*-hétérocyclique (NHC) (**103**), et permet la formation de liaisons amides avec de bons rendements.

Les carbènes *N*-hétérocycliques (NHC) permettent de réaliser l'umpolung d'aldéhydes, et d'envisager de piéger l'équivalent d'anion acyle par un électrophile (Schéma 63).

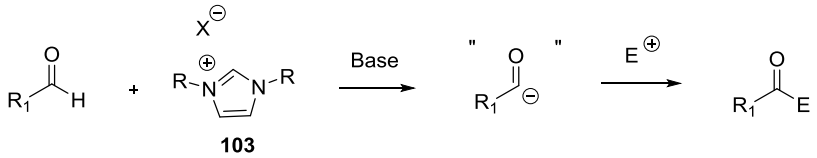


Schéma 63 : Umpolung d'aldéhyde catalysé par les NHC

[91] A. Alanthadka, C. U. Maheswari, *Adv. Synth. Catal*. **2015**, 357, 1199-1203.

L'équipe de Maheswari a alors tiré profit de cette réactivité et l'a appliquée à la synthèse d'amides. Après avoir identifié le système catalytique adéquat, les auteurs ont illustré l'intérêt synthétique de cette méthodologie (Schéma 64). La réaction se déroule en présence d'une quantité catalytique de précurseur de NHC (10 mol%) et de base (10 mol%) dans l'acétonitrile. Les produits sont obtenus avec des rendements modérés à bons. La réaction n'est cependant décrite qu'à partir d'aldéhydes aromatiques. Les amines primaires encombrées (**105**), ou secondaires cycliques (**106**) permettent d'obtenir les amides correspondants avec de bons rendements.

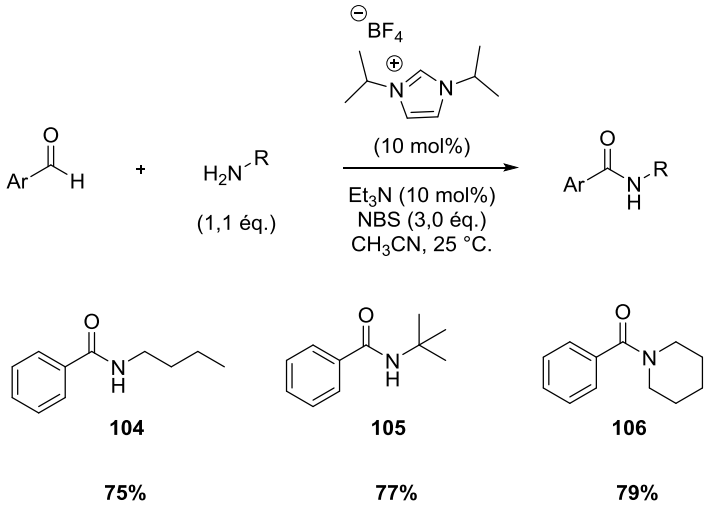


Schéma 64 : Amidation électrophile catalysée par les NHC

Le mécanisme postulé par Maheswari est un mécanisme classique de la chimie des NHC. Après avoir formé le carbène (**107**), ce dernier s'additionne sur l'aldéhyde pour conduire à l'intermédiaire de Breslow (**108**). L'addition de cet intermédiaire sur l'amine électrophile conduit à l'intermédiaire (**109**) qui expulse le carbène et permet de former l'amide (Schéma 65).

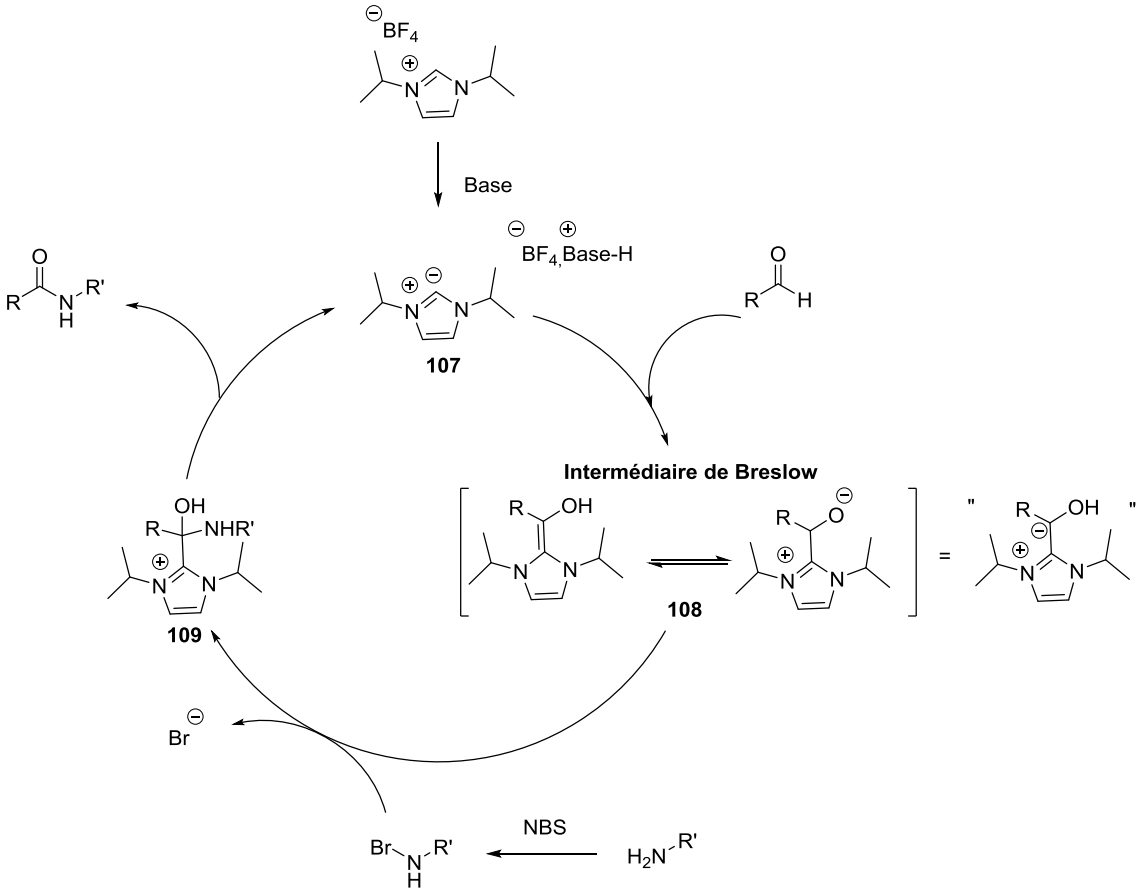


Schéma 65 : Mécanisme proposé

III.2.4 Dérivés isocyanates

La condensation thermique d'isocyanates avec des acides carboxyliques, permettant la formation de liaisons amides, est une réaction connue depuis des années.[92] Au cours de la réaction, un intermédiaire anhydride carbamique (**110**) instable est formé et se réarrange avec dégagement de dioxyde de carbone (Schéma 66).

[92] (a) A. C. R. Haller, *Acad. Sci*. **1895**, 120, 1326-1329. (b) A. C. R. Haller, *Acad. Sci*. **1895**, 121, 189-193.

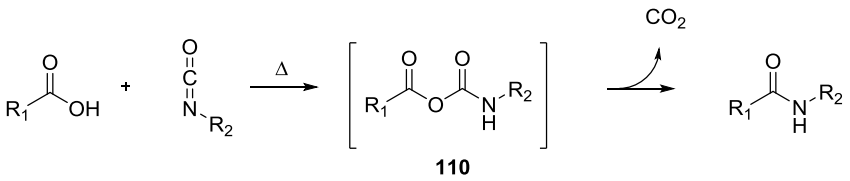


Schéma 66 : Réactivité des isocyanates vis-à-vis des acides carboxyliques

Ce procédé a été appliqué à la synthèse de peptides, mais une température élevée est nécessaire (toluène, 110 °C).[93] Cependant, quelques décennies plus tard, des conditions plus douces ont été développées. L'ajout de triéthylamine (Et_3N) en quantité catalytique à 60 °C, ou de 4-diméthylaminopyridine (DMAP) à 0 °C permettent l'obtention d'amides dans des conditions plus douces.[94] Les produits sont obtenus avec de bons rendements (Schéma 67).

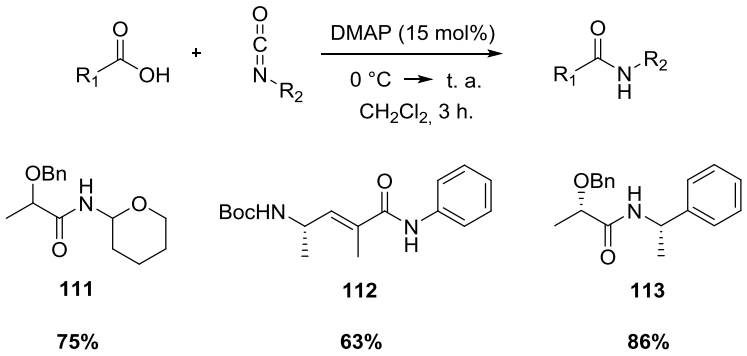


Schéma 67 : Étendue de la réaction catalysée par la DMAP

Cette méthode s'est révélée non-racémisante dans le cas du test d'Anderson.[95] En effet, le couplage entre Cbz-Gly-(D)-Phe-OH et OCN-Gly-OEt permet la formation du tripeptide avec un rendement de 74% et seulement 1% de racémisation détectée (Schéma 68).

[93] S. Goldschmidt, *Liebigs. Ann. Chem*. **1952**, 575, 217-231.
[94] (a) N. E. Mackenzie, *Tetrahedron Lett*. **1986**, 27, 1251-1254. (b) A. C. Schuemacher, R. W. Hoffmann, *Synthesis* **2001**, 243-246.
[95] G. W. Anderson, J. Blodinger, A. D. Welcher. *J. Am. Chem. Soc*. **1952**, 74, 5307-5312.

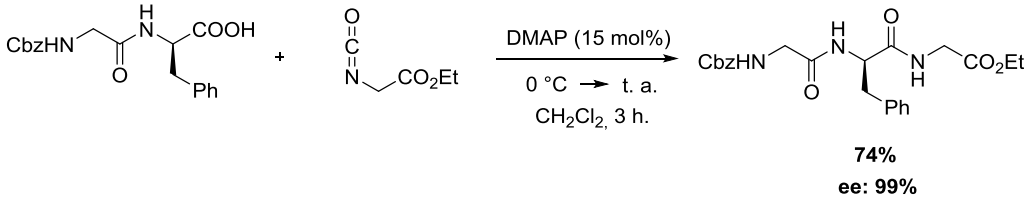


Schéma 68 : Test d'Anderson

Le rôle de la DMAP dans la réaction n'a pas été étudié. Cependant, les auteurs suggèrent que cette dernière puisse jouer le rôle de nucléophile relai et s'additionner sur l'isocyanate pour générer une espèce plus réactive (**114**) vis-à-vis de l'acide carboxylique (Schéma 69).

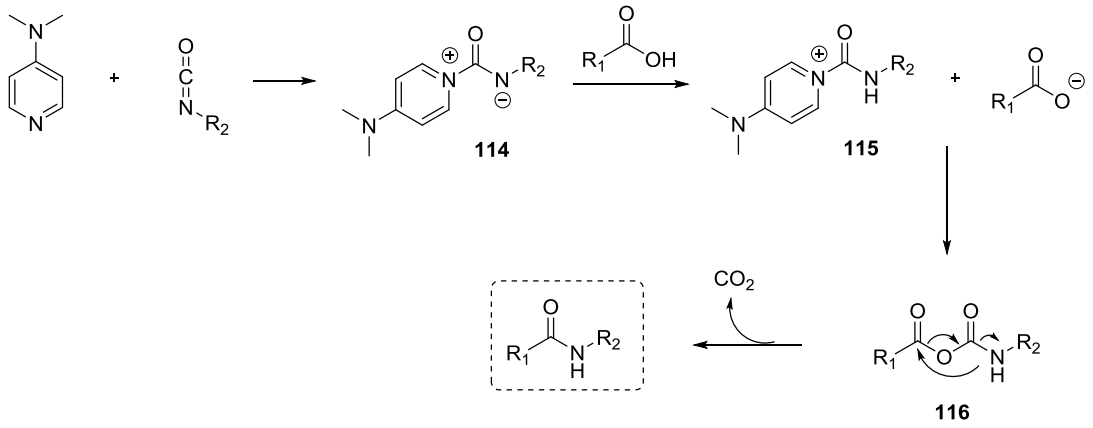


Schéma 69 : Mécanisme proposé, rôle de la DMAP

La réactivité des isocyanates vis-à-vis des acides carboxyliques a également été illustrée récemment par l'équipe de Crich.[96] La réaction se déroule à température ambiante en présence d'une quantité stœchiométrique de base et fonctionne en présence d'isocyanates aromatiques pauvre en électrons et d'acyle isocyanate. Les produits sont obtenus avec de très bons rendements. L'encombrement stérique de l'acide carboxylique n'altère pas le rendement comme illustré dans le cas de l'acide pivalique (93%). L'acide benzoïque, les acides α-aminés et la présence de groupements hydroxyles sont compatibles avec la réaction (Schéma 70).

[96] K. Sasaki, D. Crich, *Org. Lett*. **2011**, 13, 2256-2259.

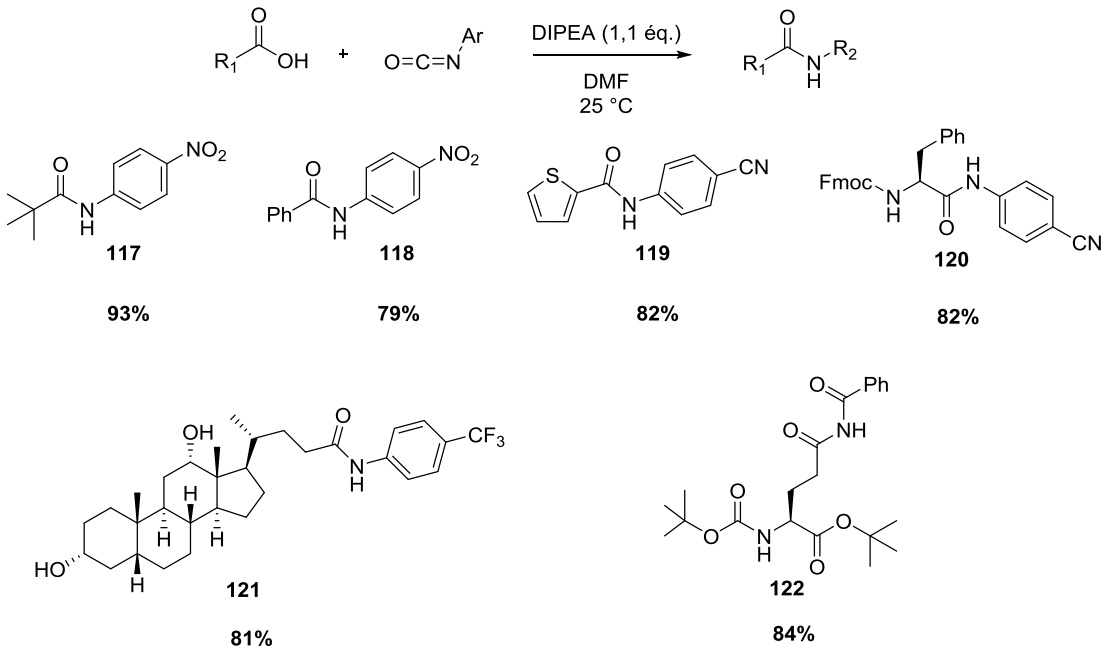


Schéma 70 : Étendue de la réaction

Les isocyanates peuvent également offrir une réactivité différente permettant l'accès à une liaison amide. En effet, l'addition nucléophile d'espèces organométalliques conduit à la formation d'une liaison amide (Schéma 71).

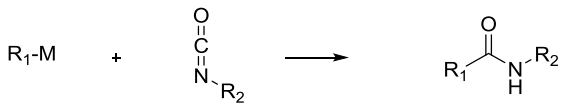


Schéma 71 : Réactivité des isocyanates avec des espèces organométalliques

Cette réactivité peut être illustrée par les récents travaux de Bode qui utilise un intermédiaire isocyanate pour la synthèse d'acides α-aminés encombrés (Schéma 72).[97] L'approche traditionnelle pour la création de liaisons amides est sensible à l'encombrement stérique. En effet, les acides α-aminés *gem*-disubstitués sont connus pour leur faible réactivité en synthèse peptidique. La stratégie que propose Bode repose sur l'utilisation d'un *N*-carboxyanhydride (NCA) sur lequel est additionné un excès (2,1 éq.) d'une espèce organométallique (réactif de Grignard ou organolithien). Le premier équivalent du composé organométallique sert à déprotoner le proton N-H menant à la formation

[97] G. Schäfer, J. W. Bode, *Org. Lett*. **2014**, 16, 1526-1529.

d'un intermédiaire isocyanate. Le second équivalent de composé organométallique s'additionne alors sur l'isocyanate pour générer l'amide. Dans le but de prouver l'existence de l'intermédiaire isocyanate, les auteurs ont suivi la réaction par *react*-IR. Après l'addition de bromure de mésitylmagnésium sur une solution de NCA à –78 °C, une bande d'absorption correspondant à l'isocyanate apparait immédiatement (2250 cm^{-1}). Il est intéressant de remarquer qu'à cette température, l'isocyanate est stable même en présence de l'espèce organométallique en excès. Ce dernier est consommé seulement lorsque le milieu remonte à température ambiante.

Dans les conditions optimales, les produits sont obtenus avec de bons rendements. La présence de nitrile (**129**), d'ester (**128**) ou d'amine libre (**127**) est compatible avec cette méthodologie. Le produit d'addition du mésityle Grignard sur le NCA dérivé de la phénylalanine conduit au produit désiré (**130**) sans détériorer sa stéréointégrité. Cependant dans le cas de l'addition d'un vinyl-Grignard (**125**), le rendement obtenu est faible.

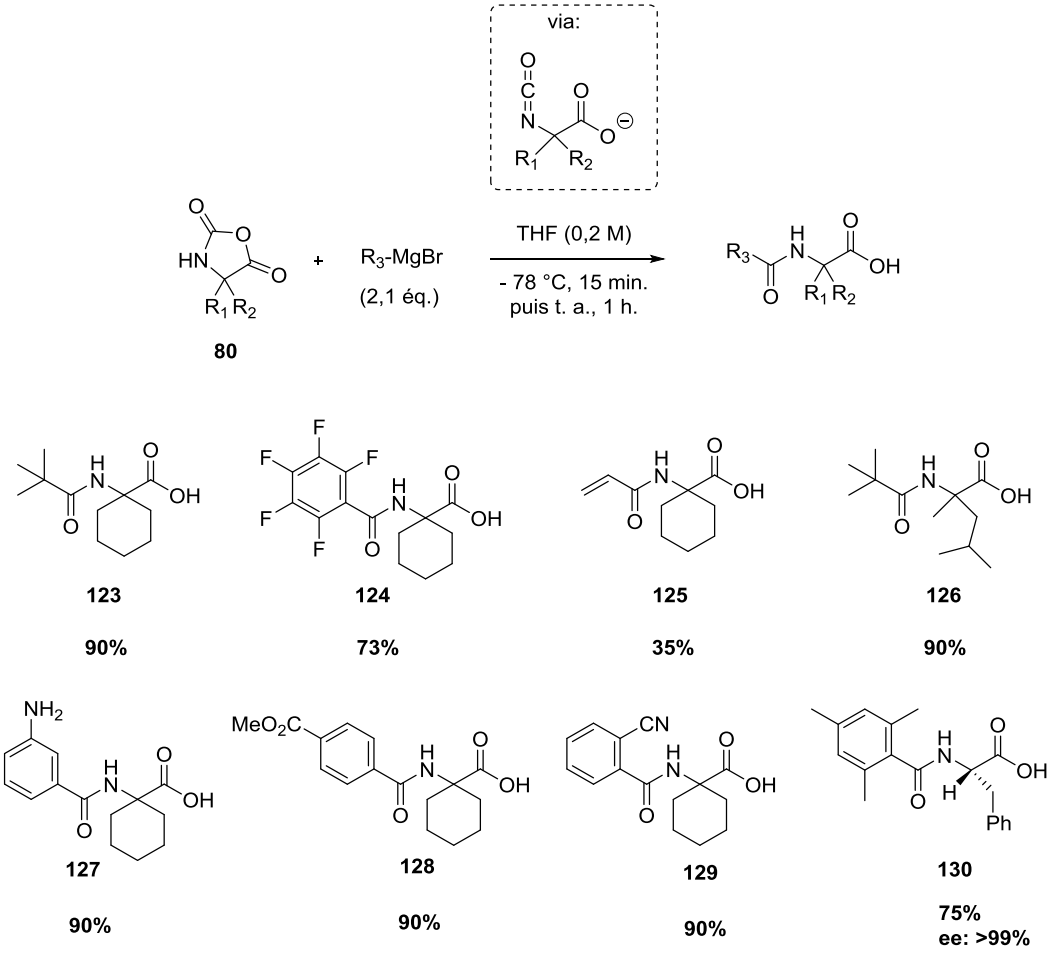


Schéma 72 : Additions d'organométalliques sur un intermédiaire isocyanate

- Conclusion :

L'utilisation de dérivés isocyanates présente l'avantage d'offrir deux types de réactivités différentes conduisant à la création de liaison amide.

La réactivité de ces derniers avec des acides carboxyliques est facile à mettre en œuvre et seul un équivalent de dioxyde de carbone est dégagé. Cette méthode est intéressante pour la synthèse peptidique, car la racémisation est faible.[94] Les isocyanates peuvent également réagir avec des espèces organométalliques. L'exemple abordé ci-dessus montre l'intérêt de cette méthodologie pour la synthèse d'amides très encombrés.

Cependant, l'inconvénient de cette méthodologie est la synthèse des isocyanates. La méthode de synthèse la plus souvent employée requiert l'utilisation de phosgène (ou ses dérivés) qui est un réactif extrêmement dangereux.

IV. Conclusion

En conclusion, la synthèse de peptides et d'amides demeure un domaine de recherche prioritaire de l'industrie chimique, tant les applications sont nombreuses. La méthode traditionnelle d'accès à ces derniers, certes efficace et maitrisée, montre cependant quelques limites. Pour ces raisons, de nombreuses méthodologies originales furent développées permettant d'accéder à de très grosses structures moléculaires. Dans un souci d'éco-compatibilité, de nombreuses méthodes catalytiques ont également été développées permettant d'obtenir des amides avec une grande économie d'atomes. Enfin, des méthodologies originales telles que la stratégie umpolung permettent d'obtenir des liaisons amides marquées à l'oxygène 18, potentiellement intéressantes pour des études biologiques.

Les travaux présentés dans ce manuscrit sont en lien avec la littérature présentée. Ils visent à développer une méthodologie de couplage peptidique via l'activation de la fonction amine. Cette stratégie est potentiellement intéressante puisqu'elle permettrait d'éviter les inconvénients liés à la méthode classique.

I. Projet NIPS (New Inverse Peptide Synthesis)

I.1 Concept du projet : activation de l'amine

Le but de ce projet est de développer une stratégie de formation de liaison peptidique n'impliquant pas, dans une étape initiale, l'activation directe de la fonction acide carboxylique et ainsi la génération dans le milieu réactionnel d'un intermédiaire « acide activé ». En effet, le fait de ne pas activer la fonction acide carboxylique peut présenter un intérêt réel en synthèse peptidique, nous l'avons vu précédemment à travers les exemples abordés concernant la Native Chemical Ligation (NCL), KAHA ligation...

L'idée de ce projet est d'activer la fonction amine d'un acide α-aminé. Cette étape initiale conduit alors à un intermédiaire que l'on nommera « amine-activée ». La réaction de ce dernier avec l'acide carboxylique d'un second acide α-aminé permettrait la formation de la liaison peptidique (Schéma 73).

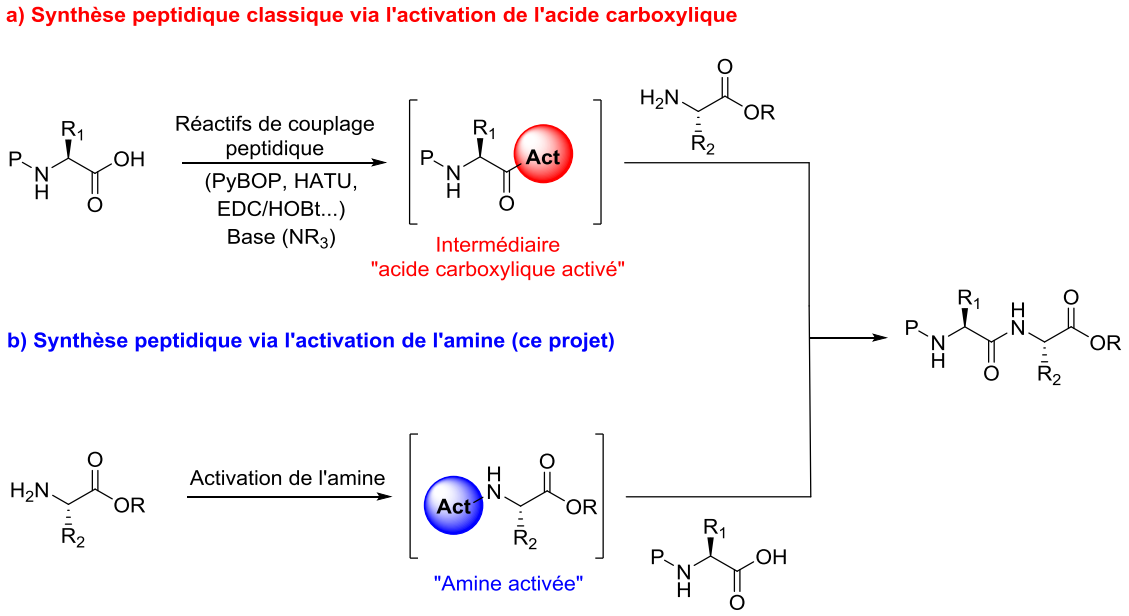


Schéma 73 : Concept du projet NIPS

I.2 Activation de l'amine : les intérêts potentiels

De manière générale, l'objectif du projet proposé est d'éviter les inconvénients inhérents à l'activation de l'acide carboxylique en synthèse peptidique, dont le phénomène de racémisation. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, lorsqu'elle est activée, la fonction acide carboxylique

terminale d'un peptide est très propice à la racémisation, qu'elle se produise par abstraction directe du proton Hα ou via la formation d'une oxazolone (Schéma 74).

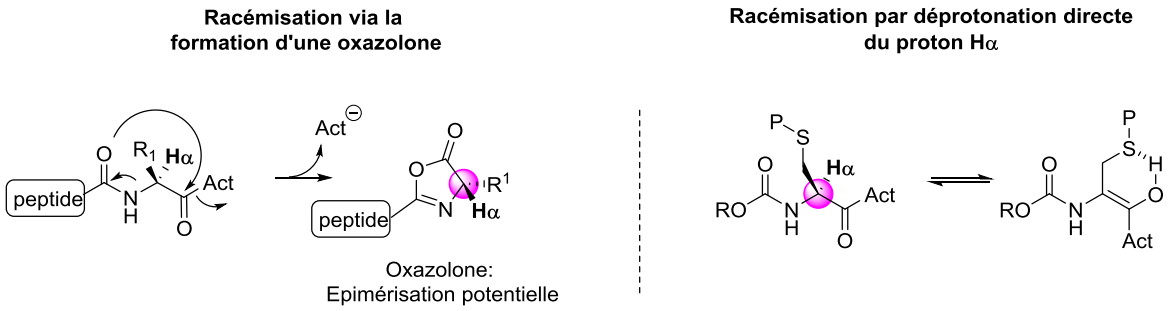
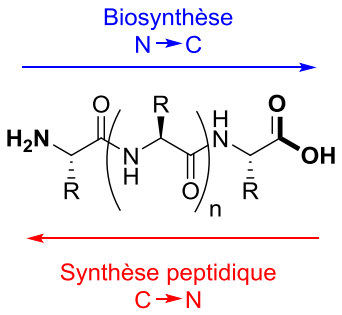


Schéma 74 : Racémisation en synthèse peptidique



De plus, si l'on admet, en effet, que l'activation de l'acide carboxylique a pour conséquence la racémisation partielle de l'acide α-aminé, le fait d'activer l'amine, permettrait potentiellement de se soustraire au problème de racémisation. Comme évoqué précédemment, la possibilité de formation d'une oxazolone va induire le sens de la synthèse peptidique. En effet, alors que l'élongation peptidique dans la nature s'effectue dans la direction N→C, un peptide synthétisé par voie chimique est construit dans le sens opposé (C→N). Via l'activation de l'amine, si ce problème de racémisation est évité, il serait alors envisageable de synthétiser des peptides dans le sens naturel (N→C).

- Parmi les conséquences néfastes du phénomène de racémisation, nous pouvons également citer l'incapacité à réaliser des couplages par fragments non-racémisants. En effet, via l'utilisation d'agents de couplages peptidiques classiques, une oxazolone est potentiellement formée et peut conduire à la racémisation du centre activé (Schéma 75). Pour cette raison, la stratégie classique n'est pas recommandée.

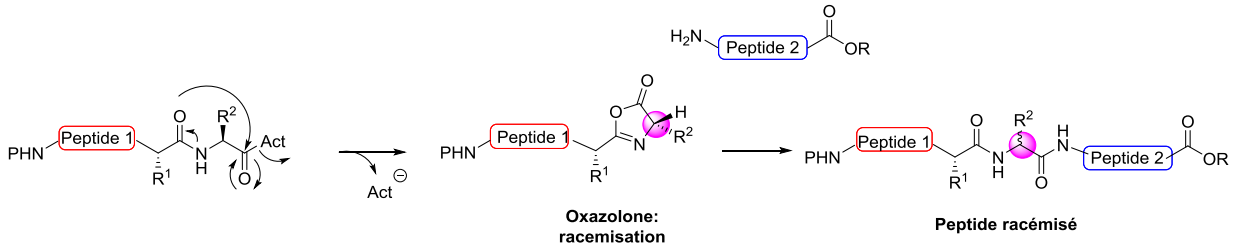


Schéma 75 : Couplage par fragments : racémisation

La stratégie envisagée pourrait alors permettre d'effectuer des couplages par fragments non racémisants. L'acide carboxylique du premier fragment de peptide n'étant pas activé, aucune oxazolone ne serait, à priori, formée. Par conséquent, le phénomène de racémisation ne devrait pas être observé (Schéma 76).

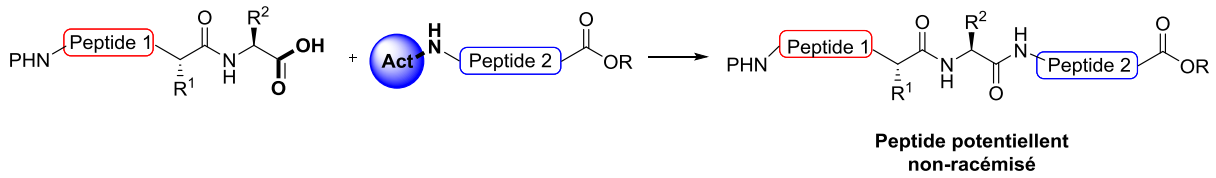


Schéma 76 : Projet NIPS : Couplage par fragments

➢ De plus, en synthèse peptidique, l'introduction d'acides α-aminés encombrés tels que l'Aib est connue pour être difficile. L'étape limitante de cette transformation est la formation d'un intermédiaire tétraédrique défavorisé stériquement (Schéma 77). L'introduction de tels acides α-aminés nécessite alors l'utilisation d'agents de couplages particuliers (PyBrOP ou TFFH) ou de techniques spécifiques,[98] ainsi que des temps de réaction plus longs.

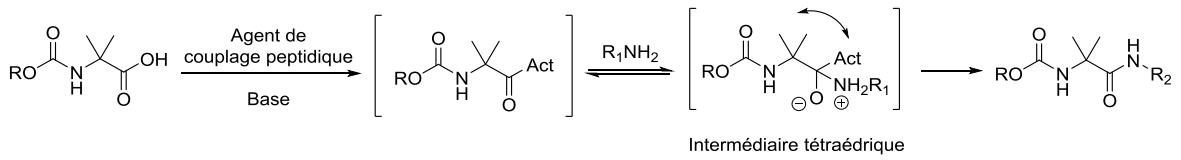


Schéma 77 : Couplage impliquant des acides α-aminés encombrés

[98] J. M. Humphrey, A. R. Chamberlin, *Chem. Rev.* **1997,** 97, 2243-2266.

Dans le projet proposé, la création de la liaison peptidique est effectuée de manière intramoléculaire. Cela pourrait favoriser l'évolution de l'intermédiaire tétraédrique vers la formation de la liaison peptidique. De cette manière, la formation de liaisons peptidiques impliquant des acides α-aminés encombrés serait peut-être accessible.

I.3 Activation de l'amine : de quelle manière ?

Afin d'activer la fonction amine et de la rendre réactive vis-à-vis d'un acide carboxylique, il est nécessaire trouver le réactif capable de promouvoir cette réaction. Pour cela, il avait été envisagé d'utiliser un réactif portant deux groupements partants. Ce réactif doit être susceptible de réagir dans un premier temps avec l'amine d'un premier acide α-aminé afin de générer un premier intermédiaire que l'on appellera « amine activée » (**131**). Cet intermédiaire « amine activée » pourra par la suite réagir avec l'acide carboxylique d'un second acide α-aminé menant à la formation d'un anhydre carboxylique carbamique instable (**132**). Ce dernier peut, après décarboxylation, conduire à la liaison peptidique désirée (Schéma 78). Cette réactivité est très proche de la chimie des isocyanates, mais l'idée ici est d'utiliser un réactif non toxique pour générer un équivalent réactionnel d'isocyanate (« amine activée ») pour effectuer la réaction.

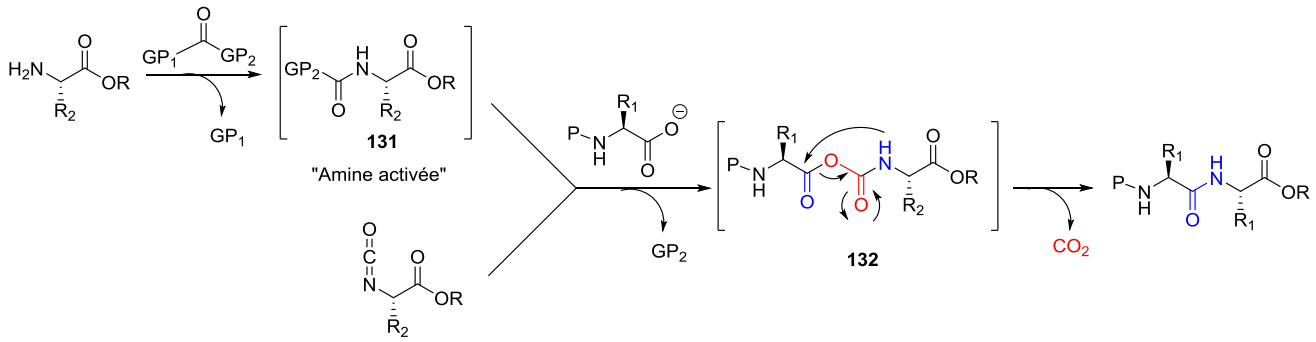


Schéma 78 : Idée du projet

De plus, comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique, la chimie des isocyanates a montré son efficacité en synthèse peptidique concernant le phénomène de racémisation. Cette méthode s'est en effet révélée non-racémisante dans le cas du test d'Anderson (Schéma 68).

Cependant, la limitation majeure de cette méthodologie réside en la synthèse des isocyanates. La méthode de synthèse la plus souvent employée requiert l'utilisation de phosgène (ou ses dérivés) qui

est un réactif extrêmement dangereux. De plus, les amines activées, équivalents d'isocyanates, devraient à priori être plus stables et permettre une utilisation plus aisée de ces composés.
La stratégie alors proposée dans ce projet pourrait permettre de revisiter la chimie des isocyanates et de l'appliquer à la synthèse peptidique.

Au cours de cette thèse, en 2013 et 2015, deux publications traitant de la formation de liaisons peptidiques mettant en jeu l'activation de la fonction amine sont parues. Ces travaux sont abordés dans le paragraphe suivant.

II. Rappels bibliographiques

En 2013, l'équipe de Yu a développé une méthodologie de couplage peptidique impliquant un dithiocarbamate, pouvant être considéré comme une « amine activée », et un thioacide (Schéma 79).[99]
Le dithiocarbamate (**133**) est obtenu par addition de sulfure de carbone sur l'amine correspondante. La réaction de ce dernier avec un thioacide conduit à un intermédiaire instable (**134**), pouvant transférer le groupement acyle du soufre vers l'azote (transfert d'acyle S→N) pour donner l'amide final avec relargage de sulfure de carbone.

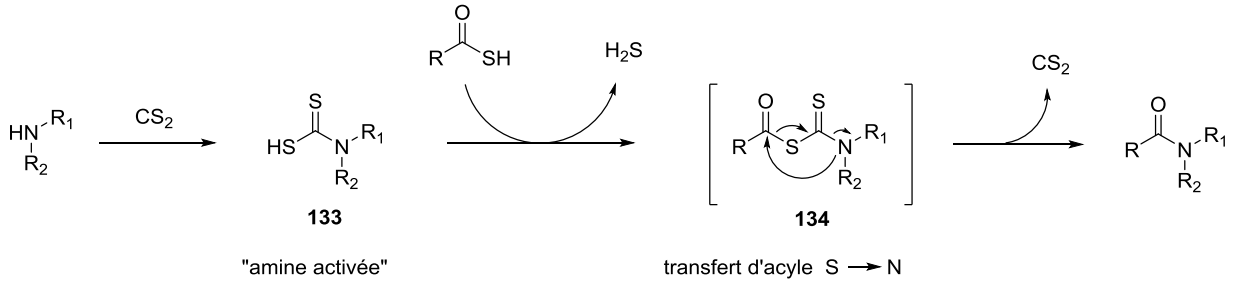


Schéma 79 : Stratégie proposée par l'équipe de Yu

Dans un premier temps, la réactivité de ces composés a été étudiée dans des réactions d'amidation simples et a permis d'isoler les amides correspondants avec de bons rendements. La réaction se déroule dans le méthanol à température ambiante et permet des couplages entre des amines pauvres en électrons (anilines) (**136** et **139**) et acides carboxyliques peu réactifs (acides benzoïques)

[99] W. Chen, J. Shao, M. Hu, W. Yu, M. A. Giulianotti, R. A. Houghten, Y. Yu, *Chem. Sci*. **2013**, 4, 970-976.

(**135**, **137** et **138**). Un premier couplage impliquant l'amine d'un acide α-aminé (H-Phe-OMe) a été obtenu (**140**) au cours de cette étude initiale (Schéma 80).

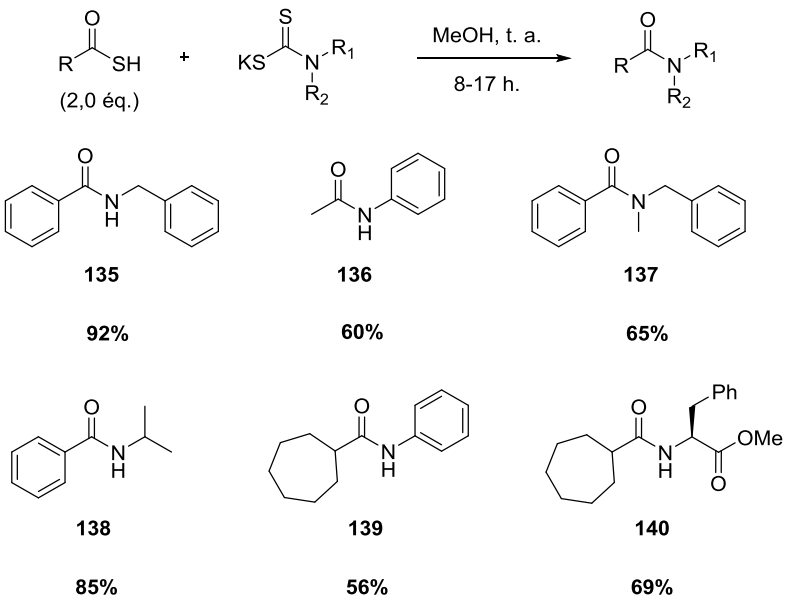


Schéma 80 : Étude initiale, étendue de la réaction

Afin d'étendre cette méthodologie à la construction de peptides, l'équipe de Yu s'est tout d'abord intéressée à la synthèse des peptides dithiocarbamates. Dans les conditions classiques (KOH, MeOH / H_2O), le peptide dithiocarbamate (**142**) cyclise directement pour former une thio-hydantoïne (**143**). Un travail d'optimisation a alors été réalisé et l'utilisation de la pyridine comme base dans le dichlorométhane permet d'éviter cette réaction secondaire et d'obtenir le peptide dithiocarbamate désiré (**142**) (Schéma 81).

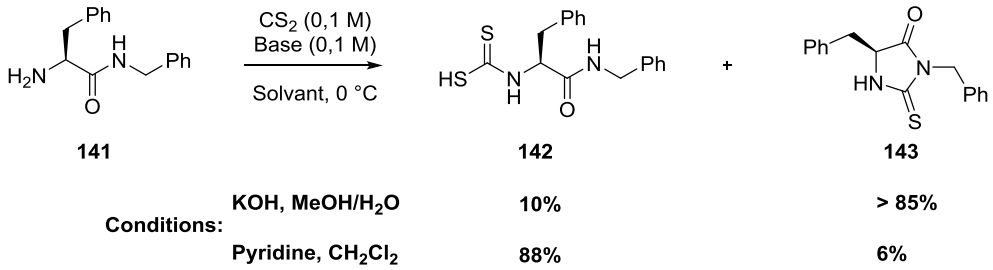


Schéma 81 : Compétition : dithiocarbamate *vs*. thio-hydantoïne

Avec ces conditions établies, l'équipe de Yu a pu appliquer cette méthodologie à la synthèse de nombreux peptides. La réaction se déroule dans le dichlorométhane et les produits sont obtenus avec des rendements modérés à excellents. Le dithiocarbamate est formé *in-situ* dans le milieu en présence de pyridine et de CS_2. La réaction tolère de nombreux acides α-aminés et la présence d'acides α-aminés encombrés (Aib, Val) en position *C*-terminale (**145** et **148**) n'affecte pas le rendement. De la même manière, les acides encombrés en position *N*-terminale ne perturbent pas la réaction (Schéma 82).

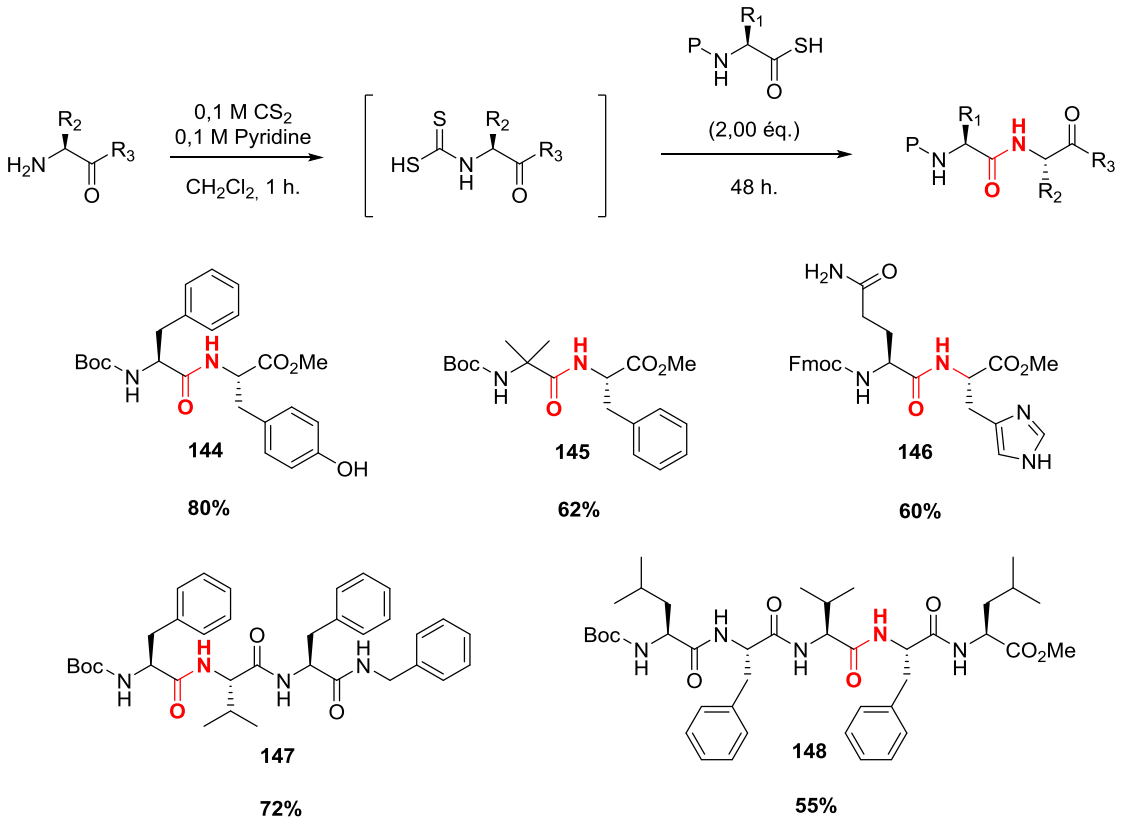


Schéma 82 : Étendue de la réaction

Cette méthodologie a également été appliquée à des couplages peptidiques par fragments. Dans ce cas, la réaction se déroule dans une solution tampon (pH = 7) (Schéma 83). Les produits sont obtenus avec des rendements modérés. La réaction est compatible avec des chaînes latérales déprotégées (CO_2H, OH, Ph-OH…). Cependant, cette méthodologie est incompatible avec des chaînes latérales aminées et soufrées, pouvant réagir avec le CS_2 lors de l'étape de formation du dithiocarbamate. Par conséquent, ces dernières doivent être protégées.

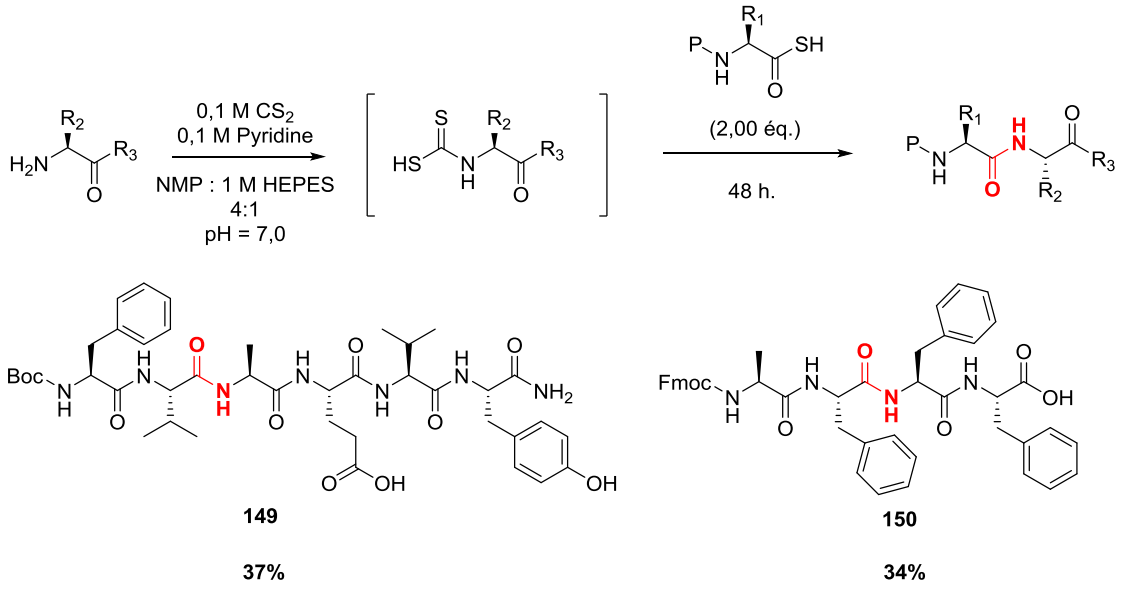


Schéma 83 : Couplages par fragments

Afin de valider ce concept, la question de l'épimérisation a été étudiée :

- Dans un premier temps, les auteurs ont étudié l'éventuelle racémisation pouvant avoir lieu au cours de la réaction sur le centre en position *N*-terminale du peptide dithiocarbamate. Les composés représentés ci-dessous ont été obtenus avec absence totale de racémisation (Schéma 84).

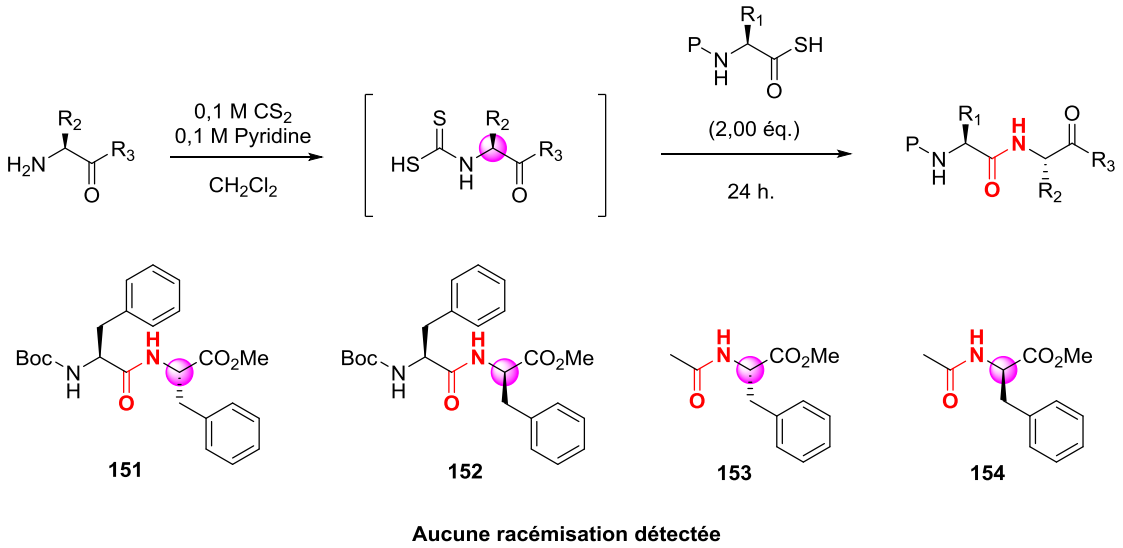


Schéma 84 : Étude de l'épimérisation du peptide dithiocarbamate

- La question de l'épimérisation sur la position *C*-terminale a également fait l'objet d'une étude et la préparation des composés Boc-(L)-Val-(L)-Phe-OMe (**155**) et Boc-(D)-Val-(L)-Phe-OMe (**156**) ont permis de vérifier l'absence d'épimérisation au cours de la réaction (Figure 6).

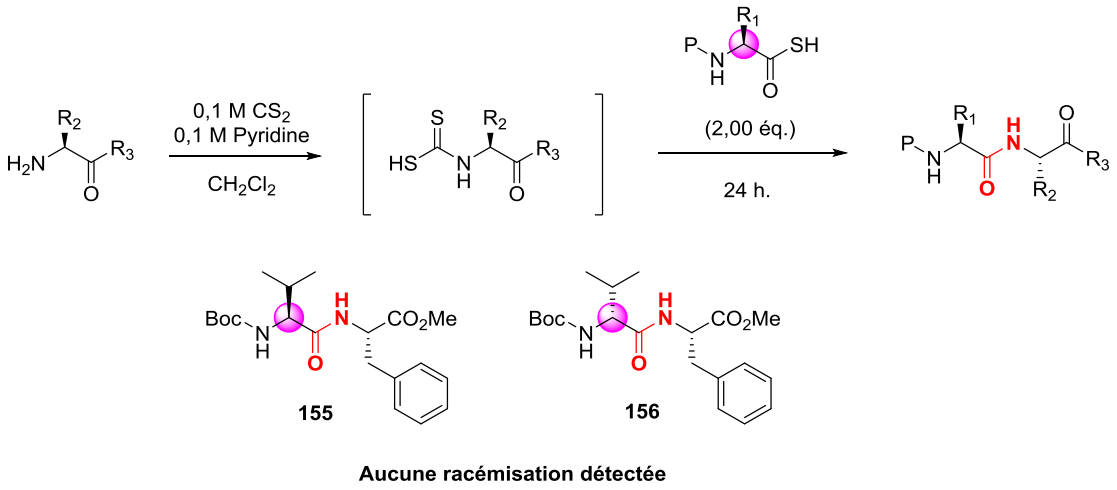


Figure 6 : Étude de racémisation en position *C*-terminale

- <u>Conclusion</u> :

La méthodologie présentée ci-dessus représente un exemple de synthèse peptidique avec activation de l'amine. Les peptides désirés sont obtenus avec des rendements modérés à très bons. Cette méthodologie s'est avérée non-racémisante sur les cas étudiés. Cependant, d'autres cas plus complexes méritaient également d'être étudiés. De plus, la réaction est à forte économie d'atomes puisque seul un équivalent de disulfure de carbone (CS_2) et de disulfure d'hydrogène (H_2S) est dégagé au cours du processus réactionnel. Il est cependant important de préciser que ces derniers sont toxiques.

Récemment, l'équipe de Hutton s'est également intéressée à l'utilisation de thioamides pour la synthèse d'imides.[100] La réaction met en jeu un acide carboxylique, un thioamide et un excès de sel d'argent (Schéma 85).

Après un travail d'optimisation de la réaction sur un substrat test, les auteurs ont pu identifier la stoechiométrie ainsi que la source d'argent idéale pour cette réaction (Ag_2CO_3 ; 1,50 éq.). Il est intéressant de noter que l'emploi d'autres métaux (Cu, Hg) s'avère moins efficace.

Les conditions réactionnelles optimales étant établies, l'étendue de la réaction a été étudiée. À partir de *N*-Phthaloyl acides α-aminés et de thioamide en présence de carbonate d'argent, les imides sont

[100] A.Pourvali, J. R. Cochrane, C. A. Hutton, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 15963-15966.

obtenus avec des très bons rendements en 2 heures dans le dichlorométhane. La réaction est tolérante envers les acides α-aminés encombrés tels que la Valine et la Leucine. Concernant l'épimérisation, les composés ont pu être isolés sans détérioration de leur stéréointégrité (Schéma 85).

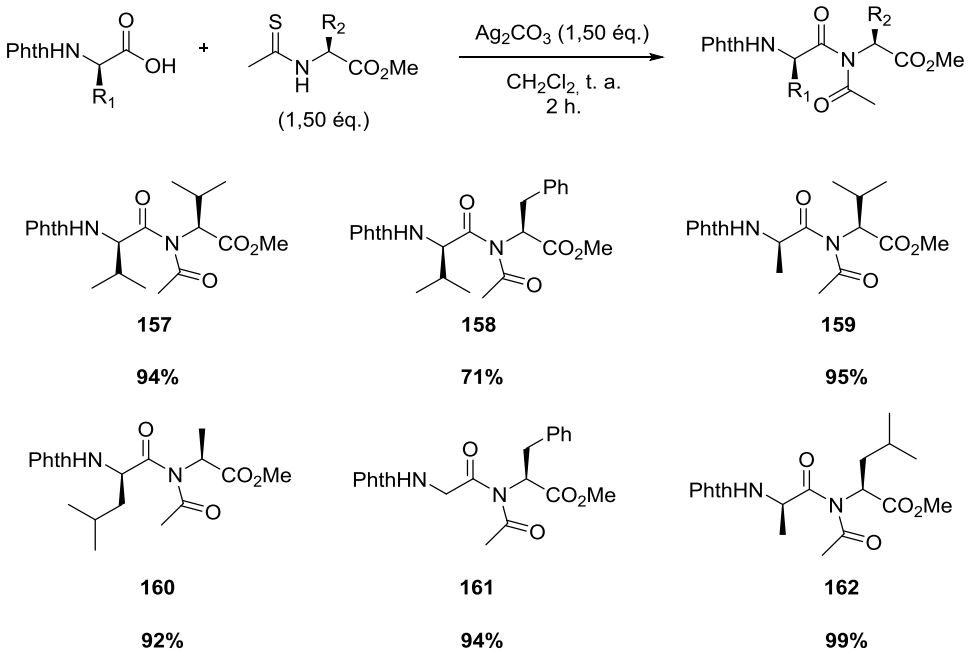


Schéma 85 : Étendue de la réaction

Le mécanisme proposé par les auteurs est détaillé ci-dessous : l'addition du carboxylate d'argent sur le thioamide permet de former l'intermédiaire tétraédrique (**163**). Cet intermédiaire instable peut évoluer, via un transfert d'acyle, vers la formation de l'imide (voie a). Il est également possible d'envisager que cet intermédiaire (**163**) puisse évoluer après expulsion de sulfure d'argent vers l'anhydride mixte (**164**). Cet anhydride peut à son tour subir un réarrangement permettant la formation de l'imide (voie b). Or, ce réarrangement, par ailleurs connu,[101] n'est théoriquement possible qu'à température élevée. À température ambiante, le chemin réactionnel impliquant le réarrangement direct de l'intermédiaire (**163**) est donc à privilégier (voie a) (Schéma 86).

[101] R. M. Wilson, J L. Stockdill, X. Wu, X. Li, P. A. Vadola, P. K. Park, P. Wang, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 2834-2848.

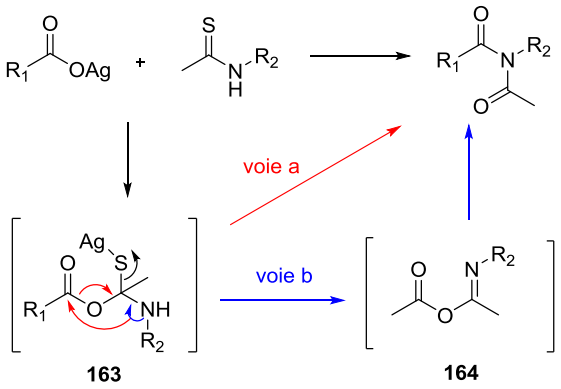


Schéma 86 : Mécanisme proposé

Après avoir obtenu des imides avec de bons rendements, et de manière énantiopure, les auteurs ont étudié l'hydrolyse de ces composés, menant à la formation des amides natifs.

De manière remarquable, l'hydrolyse est régiosélective et permet la formation du peptide natif avec de bons rendements (Schéma 87).[101,102]

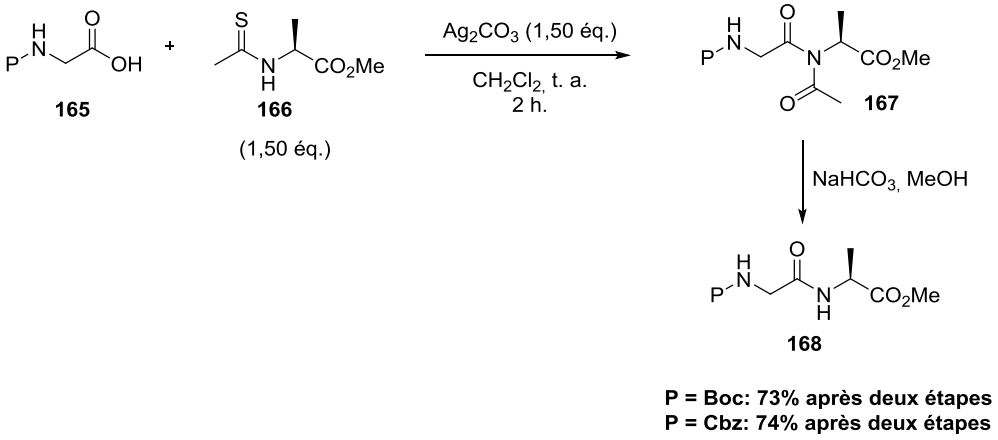


Schéma 87 : Hydrolyse de l'imide

Dans le but d'en illustrer l'intérêt, cette méthodologie a été employée dans la synthèse de la thymopentine dans le sens N→C via un jeu de groupements protecteurs Boc/ester méthylique. Chaque couplage est effectué dans les conditions optimales de la réaction et l'imide alors obtenu est hydrolysé par un mélange $NaHCO_3$/MeOH pour fournir la liaison peptidique correspondante sous forme d'ester méthylique sur l'extrémité *C*-terminale. Ce dernier, transformé en acide carboxylique par l'action de lithine (LiOH), est réengagé dans le couplage suivant. Le pentapeptide final (**170**) est

[102] Y. Yuan, J. Zhu, X. Li, X. Wu, S. J. Danishefsky, *Tetrahedron Lett*. **2009**, 50, 2329-2333.

obtenu avec un rendement global de 10% après déprotection des chaînes principales et latérales (Schéma 88). La co-injection du composé obtenu et d'un échantillon authentique en HPLC, a permis de mettre en évidence la pureté optique du produit.

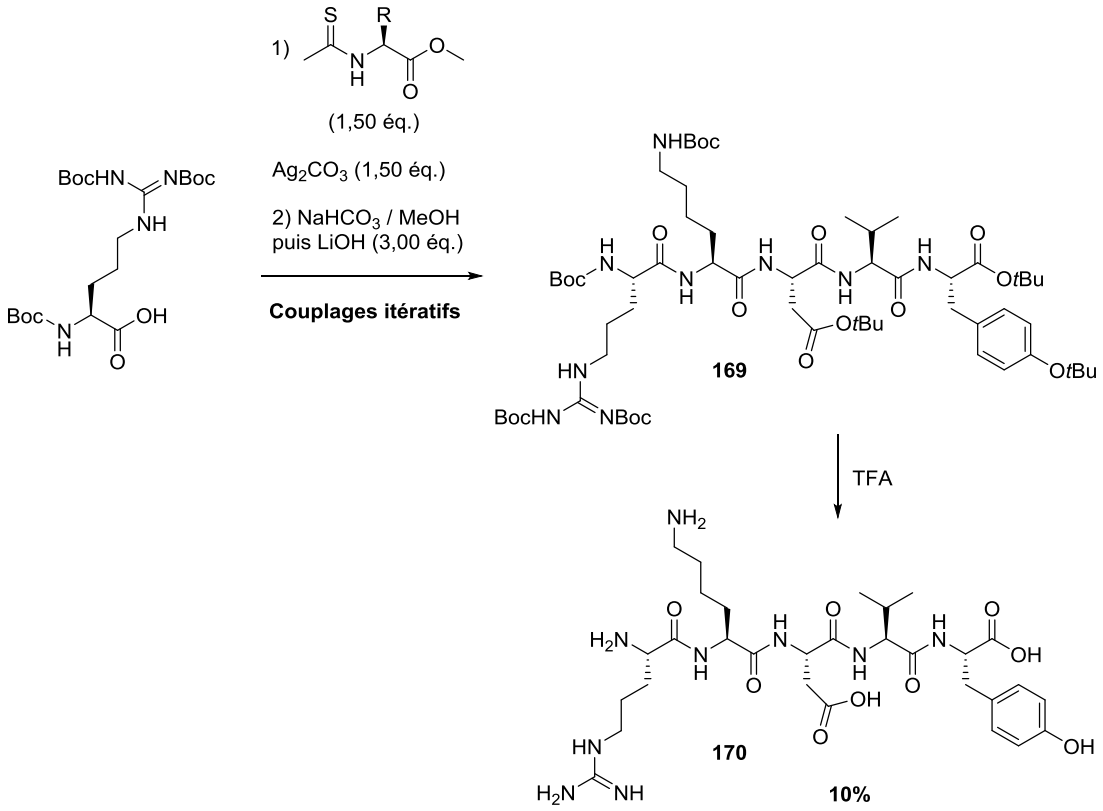


Schéma 88 : Synthèse de la Thymopentine dans le sens N→C

➢ <u>Conclusion</u> :

La méthodologie développée par le groupe d'Hutton permet, de manière efficace, la formation de peptides imides pouvant être hydrolysés régiosélectivement et conduire au peptide correspondant. Les produits sont obtenus avec de bons rendements et sont facilement purifiés, le seul sous-produit de la réaction est du sulfure d'argent (Ag_2S). Cette stratégie synthétique est compatible avec une large gamme d'acides α-aminés. Cependant, aucun couplage n'est décrit avec des acides α-aminés portant des chaînes latérales soufrées (cystéine et méthionine). Pour illustrer l'utilité de cette méthodologie, la synthèse d'un pentapeptide dans le sens N→C via une série de couplages itératifs a été réalisée avec succès.

Cependant, la réaction nécessite une quantité stoechiométrique de sel d'argent et trois étapes sont nécessaires pour accéder au peptide souhaité (1 : préparation du thioamide, 2 : réaction de formation de l'imide, 3 : hydrolyse régiosélective de l'imide).

II.1 Conclusion

Les deux méthodologies abordées ci-dessus sont des méthodes de couplages peptidiques impliquant l'activation de la fonction amine. Ces travaux sont très intéressants sur le plan conceptuel et se rapprochent des perspectives de ce travail de thèse (Schéma 89).

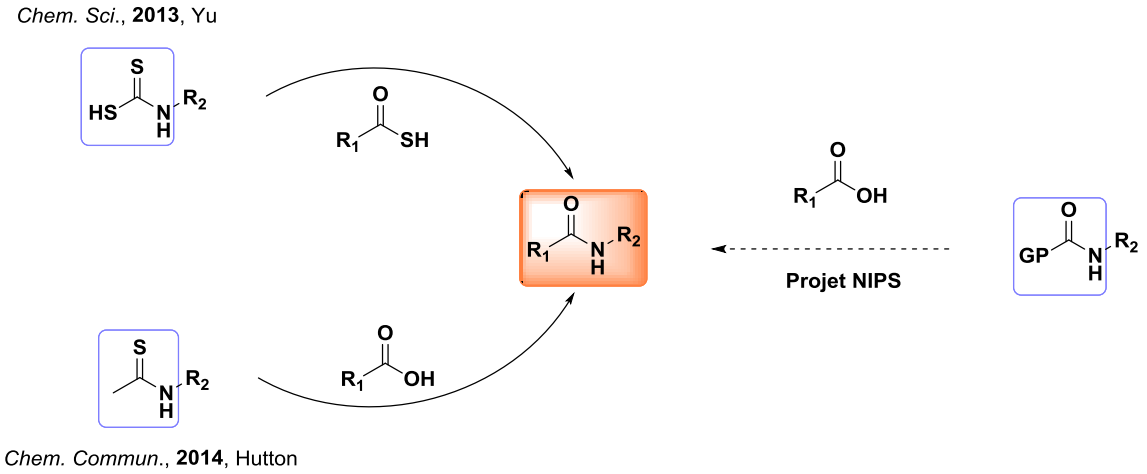


Schéma 89 : Conclusion : Couplages peptidiques via l'activation de l'amine

I. Résultats préliminaires : travaux antérieurs du laboratoire

Avant le début de mon travail de thèse, ce projet faisait déjà l'objet d'études au sein du laboratoire, où de premiers résultats furent obtenus. Dans ce chapitre seront résumées les différentes recherches entreprises, ainsi que les résultats préliminaires obtenus. Ces travaux ont été réalisés par Jonathan Brand et Matthieu Bergès.

I.1 Recherche d'un réactif capable d'activer l'amine

I.1.1 Utilisation du chloroformate de paranitrophénol

Dans l'idée d'activer l'amine pour effectuer un couplage peptidique, il est nécessaire, dans un premier temps de trouver le réactif capable de promouvoir cette réaction. Nous venons de voir que l'hypothèse initiale était d'utiliser un réactif portant deux groupements partants (Schéma 90). Le premier permettant la formation de l'amine activée (**171**), le second permettant de former l'anhydride carbamique (**172**).

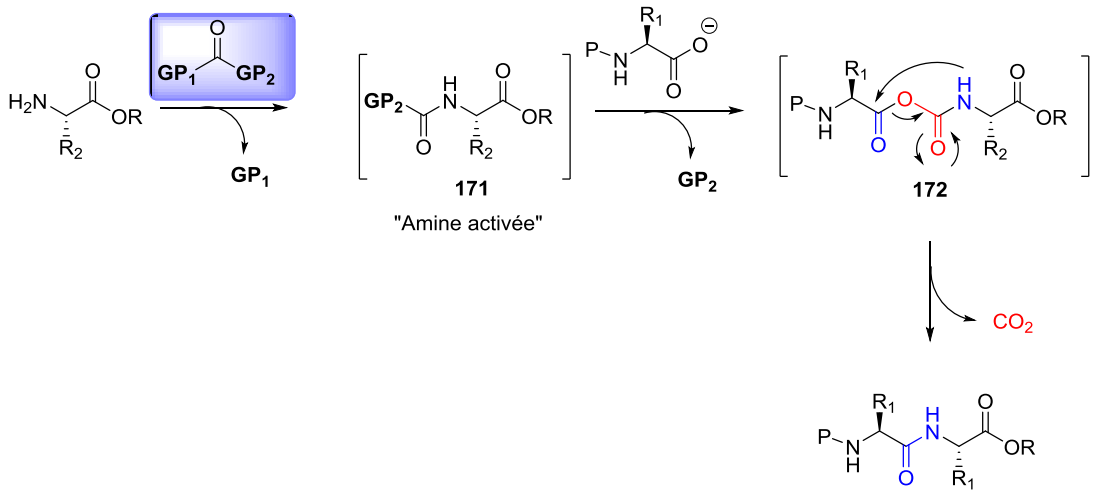


Schéma 90 : Stratégie envisagée

Les premiers essais ont été conduits en présence de chloroformiate de para-nitrophényle. En effet, ce réactif présente, en théorie, les caractéristiques nécessaires pour la réaction, et il semblait que l'amine ainsi activée puisse être stable et isolable.

La réaction modèle choisie est la suivante ; l'acylation de l'alanine dont l'analogue activé est obtenu par addition du chloroformiate de para-nitrophényle sur le sel d'alanine commercial en présence de base. Le composé « activé » est obtenu avec un rendement de 60% (Schéma 91).

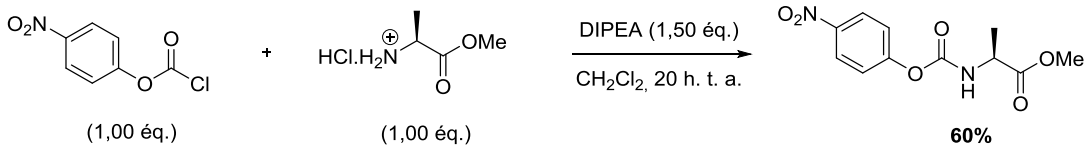


Schéma 91 : Préparation de l'alanine activée

L'alanine « activée » étant obtenue, cette dernière a été engagée dans une réaction de couplage avec la Boc-Phe-OH (1,50 éq.) en présence de triéthylamine (1,50 éq.). Malheureusement, dans ces conditions, seules des traces du produit de couplage ont été isolées (2%) et le substrat est quasi-entièrement retrouvé en fin de réaction (Schéma 92).

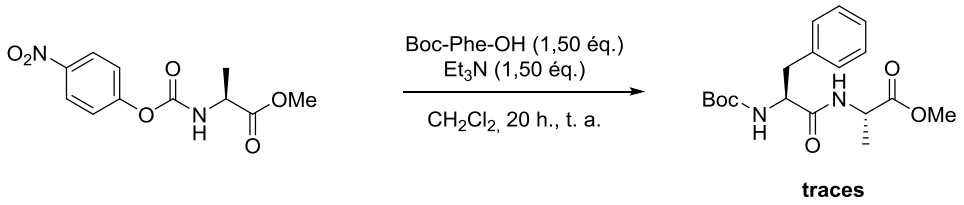
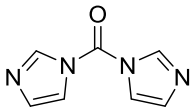


Schéma 92 : Réaction de couplage

Ce premier résultat semble indiquer que le carboxylate n'est pas suffisamment nucléophile pour s'additionner et éliminer le paranitrophénol. En d'autres termes, le paranitrophénol n'est pas un assez bon nucléofuge pour cette réaction. Il a donc fallu envisager l'utilisation d'autres substrats et réactifs.

I.1.2 Utilisation du *N*, *N*'-Carbonyldiimidazole (CDI) avec iodométhane



***N*, *N*'-Carbonyldiimidazole**

Après une brève recherche bibliographique dans le but de trouver un réactif adéquat pour cette réaction, un composé a particulièrement retenu l'attention de l'équipe, le *N*, *N*' Carbonyldiimidazole (CDI), et ce pour plusieurs raisons. Tout d'abord, ce dernier présente, en théorie, les caractéristiques nécessaires pour la réaction : il porte deux groupements partants. Dans un second temps, le CDI est un composé peu coûteux, commercialement disponible et en grande quantité. De plus, les sous-produits de la réaction sont l'imidazole et le dioxyde de carbone, relativement faciles à éliminer. Enfin, ce composé a déjà été utilisé comme étant un agent de couplage peptidique (via une stratégie classique).[103] De plus, comme décrit par Batey, le CDI a été utilisé pour la préparation de

[103] R. Paul, G. W. Anderson, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 4596-4600.

carbamates, d'urées et de thiocarbamates (Schéma 93).[104] Dans un premier temps, le composé (**173**) est synthétisé par addition d'un équivalent d'amine sur le CDI. Afin d'exacerber le pouvoir nucléofuge de l'imidazole, ce dernier est alkylé via l'addition dans le milieu d'un excès d'iodométhane (ou triflate de méthyle) pour former le sel d'imidazolium correspondant (**174**). L'addition sur ce dernier, d'une amine, d'un alcool ou d'un thiol permet l'obtention respective d'urées (**175**), thio-urées (**176**) et carmabates (**177**).

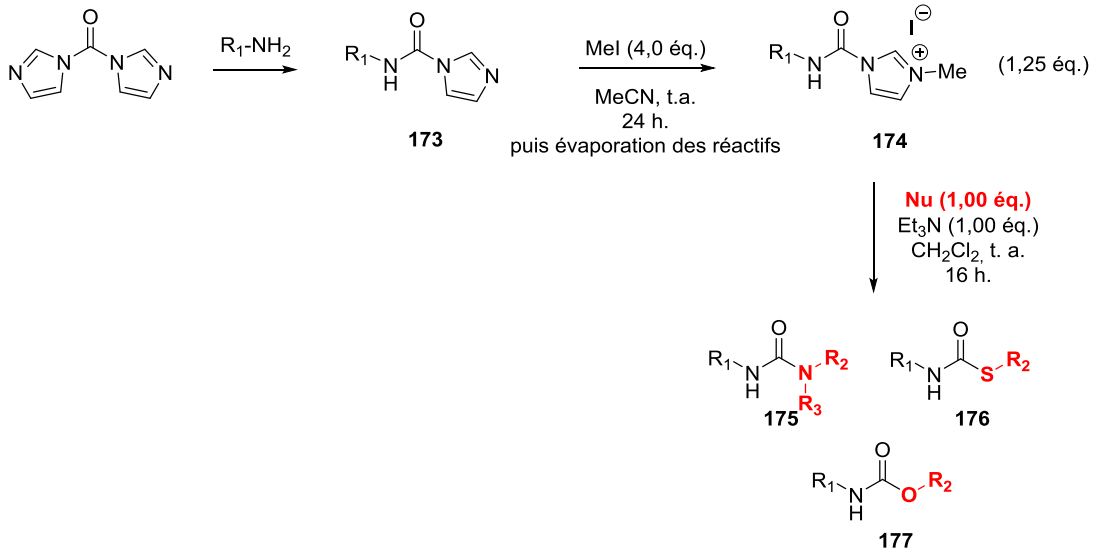


Schéma 93 : Utilisation de CDI pour la préparation de carbamates, urées et thiocarbamates

Quelques exemples de préparation d'amides via cette méthodologie ont également été effectués par Batey (Schéma 94). À partir du sel d'imidazolium et d'une quantité stoechiométrique d'acide carboxylique en présence de base, les amides sont obtenus avec de très bons rendements. Cependant, aucun exemple de préparation d'amides secondaires dérivés d'acides α-aminés n'est décrit. Ainsi, aucun de ces travaux ne traite d'une éventuelle application en synthèse peptidique.

[104] (a) J. A. Grzyb, R. A. Batey, *Tetrahedron Letters* **2003**, 44, 7485-7488. (b) J. A. Grzyb, M. Shen, C. Yoshina-Ishii, W. Chi, R. S. Brown, R. A. Batey, *Tetrahedron*, **2005**, 61, 7153-7175. (c) J. A. Grzyb, R. A. Batey, *Tetrahedron Letters*, **2008**, 49, 5279-5282.

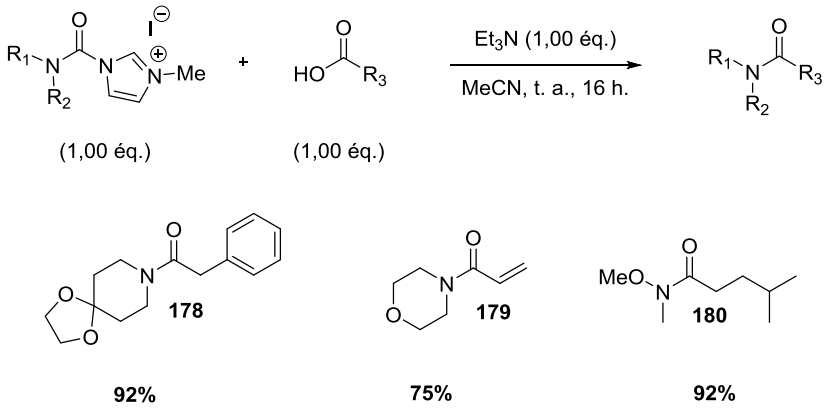


Schéma 94 : Réactions d'amidation

Ces travaux ont permis de conforter l'équipe dans l'idée d'envisager l'utilisation du CDI comme réactif de couplage en synthèse peptidique inversée.

I.1.2.1 Résultats préliminaires

➢ Activation de l'amine : Tout comme dans le cas précédent, nous avons choisi d'étudier la réactivité de l'alanine activée qui est obtenue par ajout d'un excès de CDI (1,50 éq.) sur le sel d'alanine commercial en présence de triéthylamine (1,50 éq.). Cette réaction permet d'obtenir le composé attendu avec un très bon rendement de 92% (Schéma 95).

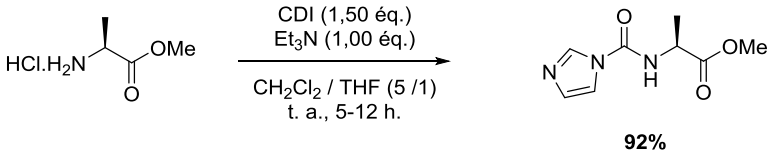
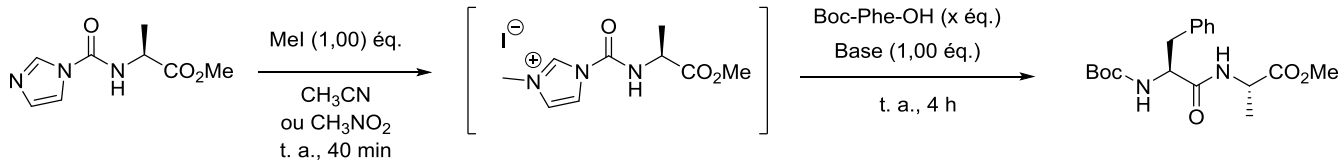


Schéma 95 : Synthèse de l'alanine activée

NB : Au cours des chapitres suivants, et dans un souci de clarté, les amines activées par le CDI seront appelées Imi-AA-OR où -AA représente l'acide α-aminé mis en jeu et –OR le groupement protecteur de ce dernier.

Réaction de couplage : Après avoir obtenu l'alanine activée, un premier travail d'optimisation a été effectué avec la réaction modèle mettant en jeu l'Imi-Ala-OMe, et la Boc-Phe-OH, dans le but de synthétiser le dipeptide Boc-Phe-Ala-OMe. Dans un premier temps, l'Imi-Ala-OMe est méthylée par l'ajout d'un équivalent d'iodométhane, puis après 40 minutes de réaction, la Boc-Phe-OH est alors

ajoutée (Tableau 1). Nous pouvons remarquer dans ce tableau d'optimisation que lorsque la réaction est menée en présence d'un équivalent de triéthylamine ou d'une base plus encombrée (DIPEA), le produit est obtenu avec un rendement modeste de 40% (Entrées 1 et 2). Dans l'hypothèse où l'imidazole dégagé pourrait jouer le rôle de base, la réaction a été menée sans ajout supplémentaire de base et de manière surprenante, le dipeptide Boc-Phe-Ala-OMe est isolé avec d'excellents rendements de 93% (Entrée 3) et 91% (Entrée 4).



Entrée	MeI	Concentration	Boc-Phe-OH	Base (1,00 éq.)	Rendement
1	1, 00 éq.	0,25 M	1,00 éq.	Et_3N	40%
2	1, 00 éq.	0,25 M	1,00 éq.	DIPEA	40%
3	1, 00 éq.	0,25 M	1,50 éq.	-	93%
4	1, 00 éq.	0,25 M	1,30 éq.	-	91%

Tableau 1 : Optimisation de la réaction

Non seulement les rendements obtenus sont excellents, mais l'absence de base dans la réaction constitue une excellente nouvelle dans le contexte de la synthèse peptidique (économie d'atomes, racémisation…).

Après avoir identifié les conditions opératoires optimales, le concept a été validé en effectuant la synthèse de dipeptides dont quelques exemples sont illustrés ci-dessous (Schéma 96). Les dipeptides sont obtenus avec des rendements modérés à très bons. Le relativement faible rendement obtenu pour la préparation du dipeptide Fmoc-Phe-Ala-OMe (44%) peut être expliqué par la faible solubilité du Fmoc-Phe-OH dans le nitrométhane.

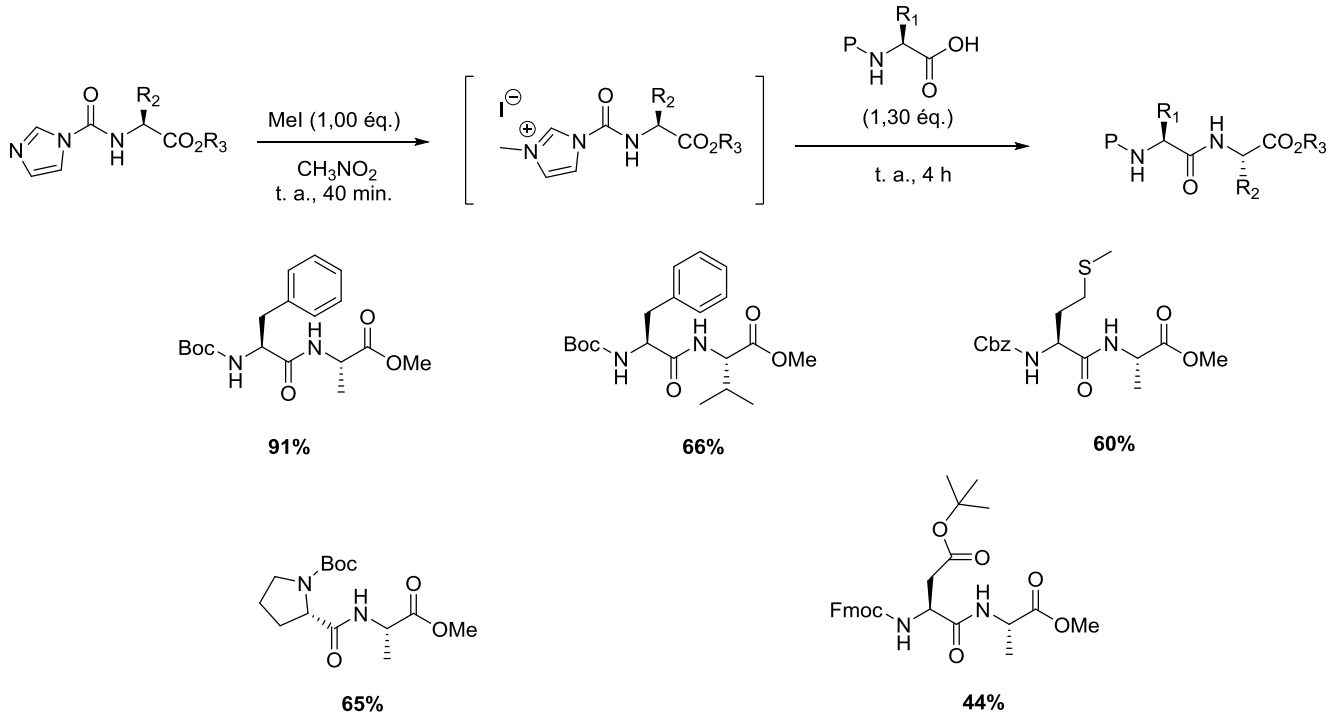


Schéma 96 : Étendue de la réaction

I.1.3 Conclusion

En conclusion, ces travaux préliminaires ont permis de valider le concept de la méthodologie proposée. Il est en effet possible d'effectuer un couplage peptidique via l'activation de l'amine d'un acide α-aminé par le CDI. De manière très surprenante et intéressante, les rendements obtenus sont supérieurs lorsque la réaction est menée en l'absence de base.

Ces observations ont également permis de soulever quelques interrogations d'un point de vue mécanistique, notamment sur le rôle de l'iodométhane dans la réaction :

- Est-il possible de s'affranchir de son utilisation ?
- Pourquoi la réaction fonctionne t'elle sans base ?

Mon travail de thèse s'inscrit dans la continuité de ces travaux et sera détaillé dans les paragraphes suivants.

II. Utilisation du *N*, *N'* Carbonyldiimidazole (CDI) sans iodométhane

II.1 Introduction

Si le concept du projet NIPS a été validé, l'utilisation de quantités stoechiométriques d'iodométhane constitue un frein sérieux quant à son application en synthèse peptidique.

Dans ce chapitre, seront abordés nos efforts pour développer une séquence en l'absence d'iodométhane.

Une étude préliminaire du mécanisme réactionnel sera également détaillée par la suite.

II.1.1 Rôle de l'iodométhane

Afin de développer une méthodologie n'impliquant pas l'utilisation d'iodométhane, il est nécessaire d'en comprendre son rôle. Lors du suivi CCM de nos réactions, il semblait que la conversion en imidazolium n'était pas complète alors que la conversion en dipeptide était excellente. Pour confirmer ceci, nous avons contrôlé par RMN ^{1}H et par CCM la disparition du substrat Imi-Ala-OMe en présence de 4 équivalents d'iodométhane après 24 heures de réaction (Schéma 97). Comme nous pouvons le voir ci-dessous, l'Imi-Ala-OMe n'est pas totalement transformé en sel d'imidazolium dans les conditions décrites.

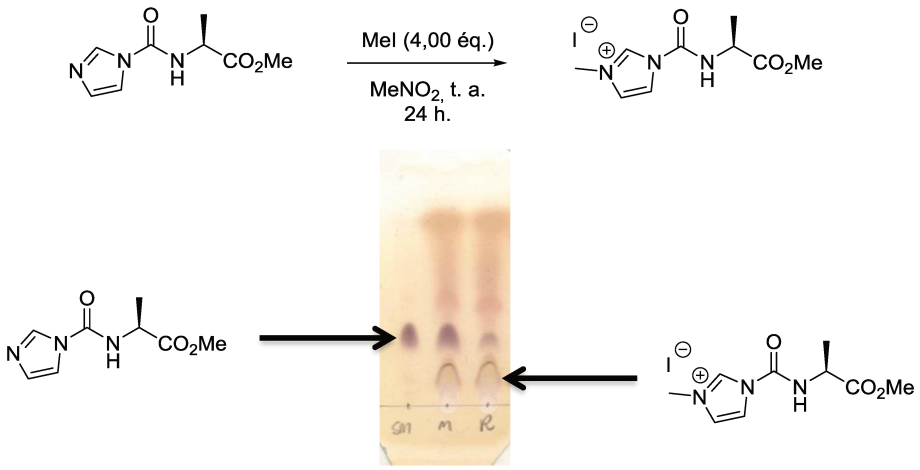


Schéma 97 : Suivi de la réaction par CCM

De plus, dans le travail d'optimisation présenté précédemment (Tableau 1), seul un équivalent d'iodométhane est utilisé et la réaction de méthylation dure 40 minutes. Nous pouvons conclure de cette première observation qu'il est peu probable que l'Imi-Ala-OMe soit totalement transformé en son sel d'imidazolium.

II.1.2 Tentatives de couplage en l'absence d'iodométhane

Les premières observations relatives au rôle de l'iodométhane nous ont poussés à étudier différentes conditions réactionnelles n'impliquant pas ce dernier. La réaction type choisie pour cette étude est la réaction mettant en jeu la Boc-Phe-OH et l'Imi-Ala-OMe.

Dans l'idée de générer un carboxylate, plus nucléophile, nous avons dans un premier temps étudié la réaction en présence d'un équivalent de base par rapport à l'acide carboxylique Boc-Phe-OH, mais aucun produit de couplage n'a été observé (Schéma 98).

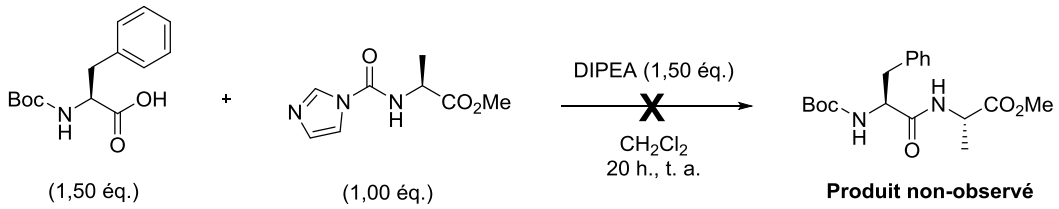
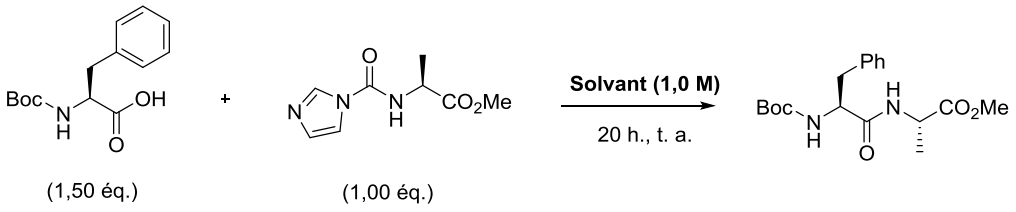


Schéma 98 : Étude de la réaction en présence de base

Suite à ces résultats, nous avons envisagé d'effectuer la réaction en l'absence de base. Pour cela, les deux réactifs (Imi-Ala-OMe et Boc-Phe-OH) sont mis en réaction dans différents solvants, à température ambiante pendant 20 heures (Tableau 2).

Nous avons été très agréablement surpris de voir que dans le dichlorométhane et l'acétonitrile, en l'absence de base, le dipeptide Boc-Phe-Ala-OMe était obtenu avec des rendements respectifs de 63% et 60% (Entrées 1 et 3). Notons cependant que le dichlorométhane utilisé ne doit pas contenir d'éthanol (stabilisant), en effet, le carbamate résultant de l'addition de ce dernier sur l'amine activée a été observé lors des réactions de couplage. Pour ces raisons, le dichlorométhane stabilisé sur amylène est utilisé. Nous pouvons observer un léger effet de la concentration sur la réaction, lorsque la réaction est menée dans le dichlorométhane à une concentration de 0,5 M, le produit est isolé avec un rendement de 51% (Entrée 2). En revanche, une chute de rendement (22%) est observée lorsque le DMF est utilisé en tant que solvant (Entrée 4).

Il est assez difficile d'expliquer l'influence de ces différents solvants. Ils sont tous trois aprotiques et relativement polaires. Aucune réactivité secondaire, qui pourrait expliquer ce faible rendement, n'est observée lorsque la réaction est menée dans le DMF.



Entrée	Solvant	Rendement
1	CH_2Cl_2	63%
2	CH_2Cl_2	51%*
3	MeCN	60%
4	DMF	22%

*La concentration est de 0,5 M

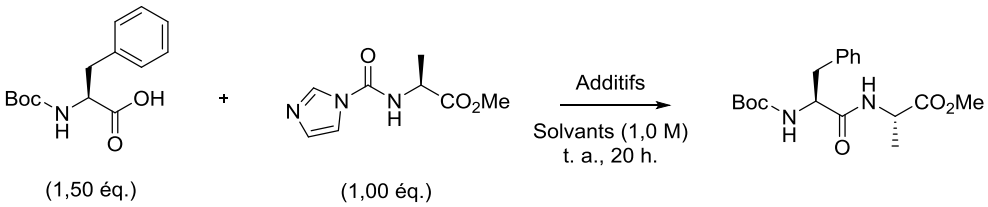
Tableau 2 : Réaction sans base, étude de solvants

Suite à ces premiers résultats prometteurs, l'influence de l'ajout de différents additifs au milieu réactionnel a été évaluée (Tableau 3).

Dans la perspective de pouvoir « amorcer » le processus réactionnel, nous avons effectué la réaction en présence d'une quantité catalytique d'imidazole. Toutefois, dans ce cas, le produit est isolé avec un rendement légèrement inférieur de 53%. (Entrée 3). Nous nous sommes ensuite tournés vers l'utilisation d'acides de Brønsted pour catalyser cette réaction. Le rendement de la réaction est augmenté (75% et 77%) lorsque 10 mol% d'HOBt (Entrée 4) ou d'APTS (Entrée 5) sont ajoutés. Si la quantité d'APTS est augmentée, une baisse de rendement est alors observée. En effet, en présence de 50 mol% d'APTS, le produit est obtenu avec un rendement de 42%. L'ajout dans le milieu d'un équivalent d'APTS conduit à un rendement de 22% (Entrées 6 et 7). Après avoir évalué l'effet de l'utilisation d'acides et bases de Brønsted, nous avons jugé intéressant d'utiliser des acides de Lewis, et plus particulièrement des sels de cuivre(II). Ces derniers, utilisés en quantité stoechiométique, sont déjà connus en synthèse peptidique comme étant des « suppresseurs » de racémisation.[105] L'ajout d'une quantité catalytique de l'acide de Lewis $CuBr_2$ permet d'obtenir un rendement similaire de 77% (Entrée 8). Enfin, un effet synergique est observé lorsque 10 mol% d'HOBt et 10 mol% de $CuBr_2$ sont ajoutés au milieu réactionnel, le dipeptide souhaité est alors isolé avec un rendement de 90% (Entrée 9). Ces conditions optimales définies, l'utilisation de solvants aqueux a été envisagée, notamment dans la perspective de couplages de plus gros peptides peu solubles dans des solvants organiques. En

[105] F. S. Gibson, H. Rapoport, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 2615-2617.

présence de CH_3CN/H_2O (1/1) (Entrée 10) et de THF/H_2O (1/1) (Entrée 11), des rendements respectifs de 48% et 43% ont été obtenus.



Entrée	Solvant	Additifs	Rendement
1	CH_2Cl_2	Et_3N (1,50 éq.)	-
2	CH_2Cl_2	-	63%
3	CH_2Cl_2	Imidazole (10 mol%)	53%
4	CH_2Cl_2	HOBt (10 mol%)	75%
5	CH_2Cl_2	APTS (10 mol%)	77%
6	CH_2Cl_2	APTS (50 mol%)	42%
7	CH_2Cl_2	APTS (1,00 éq.)	22%
8	CH_2Cl_2	$CuBr_2$ (10 mol%)	77%
9	**CH_2Cl_2**	**$CuBr_2$/HOBt (10 mol%)**	**90%**
10	CH_3CN/H_2O	$CuBr_2$/HOBt (10 mol%)	48%
11	THF/H_2O	$CuBr_2$/HOBt (10 mol%)	43%

Tableau 3 : Étude de l'ajout d'additifs

Avec ces conditions optimisées, nous avons souhaité étudier la portée et les limites de cette réaction à travers la synthèse de quelques dipeptides.

II.1.3 Étendue et limites de la réaction

II.1.3.1 Préparation des amines activées

Dans le but d'étendre cette réaction à la synthèse de plusieurs dipeptides, il est dans un premier temps nécessaire de s'intéresser à la préparation des amines activées. Ces composés sont préparés via des conditions similaires décrites dans la littérature par Batey.[104] Le sel commercial est solubilisé dans un mélange CH_2Cl_2/THF sur lequel sont ajoutés un équivalent de base et un excès de CDI (Schéma 99).

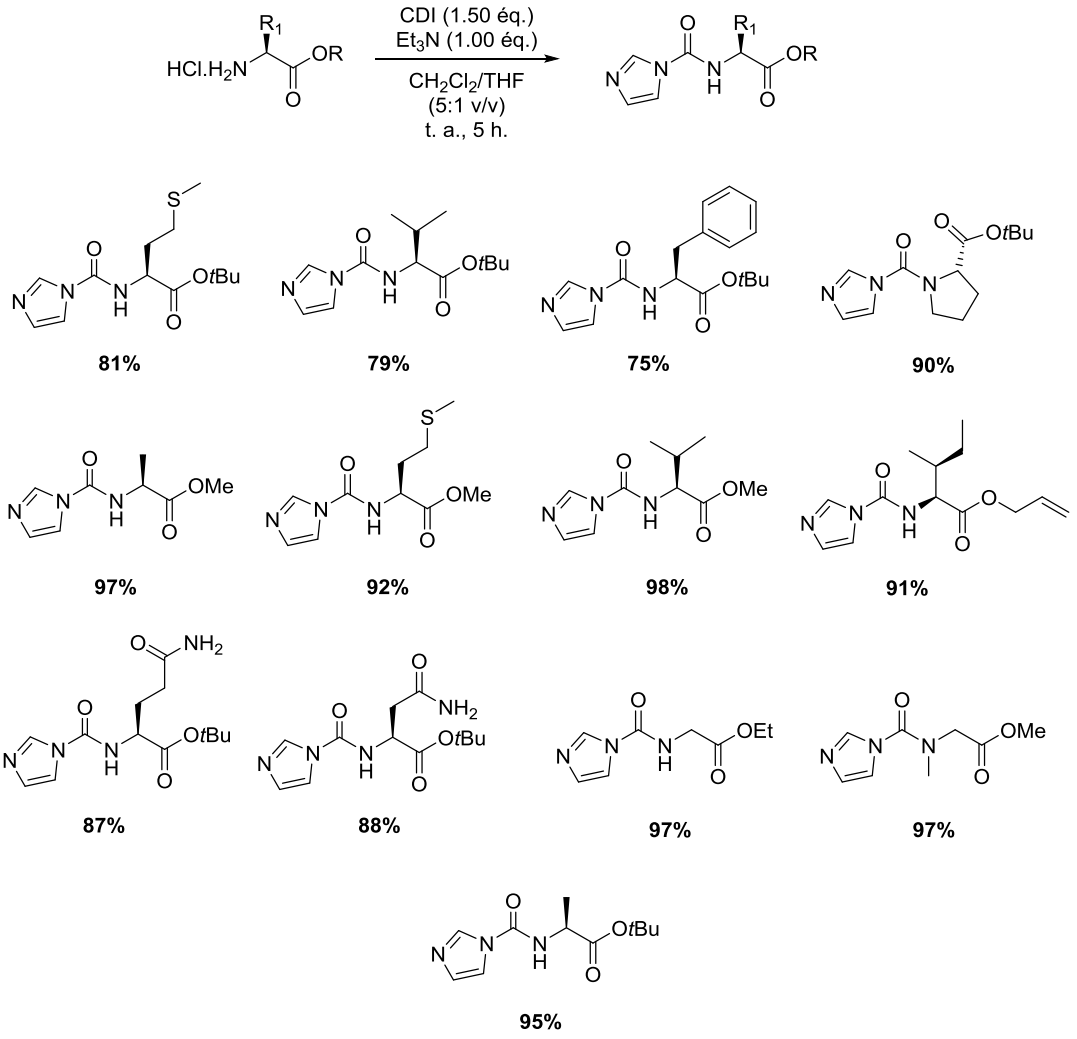
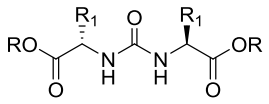


Schéma 99 : Préparation des amines activées

Nous pouvons voir que les amines activées sont obtenues avec de très bons rendements, dans des conditions opératoires simples et douces. La plupart d'entre elles sont très aisément purifiées par simple filtration sur colonne de silice et peuvent être stockées des mois au réfrigérateur sans qu'aucune dégradation ne soit observée.

Une large gamme d'acides α-aminés est tolérée par la réaction, notamment des acides α-aminés encombrés tels que la valine ainsi que des acides α-aminés présentant des chaînes latérales non-protégées (asparagine et glutamine). Les amines secondaires (sarcosine, proline) activées sont, elles aussi, obtenues avec d'excellents rendements.

Nous pouvons également noter que les différents groupements protecteurs de la position *C*-terminale (O*t*Bu, OMe, OEt, OAllyl) sont tolérés par la réaction.



Il est également important de souligner que dans certains cas, par addition de l'amine libre sur l'amine activée, une petite quantité d'urée symétrique est obtenue (<5%).

II.1.3.2 Synthèse de dipeptides

Après avoir obtenu ces produits, nous nous sommes tournés vers l'étude du champ d'application que la méthodologie pouvait offrir. Pour ce faire, nous nous sommes intéressés à la synthèse de différents dipeptides. Ainsi, chaque couplage a été effectué dans les conditions optimales de la réaction : en présence de l'amine activée, d'un excès de l'acide carboxylique (1,50 éq.) et d'une quantité catalytique d'HOBt (10 mol%) et de $CuBr_2$ (10 mol%) pendant 20 heures, à température ambiante dans le dichlorométhane (1,0 M).

- Dérivés Boc : Comme illustré sur le Schéma 100, les produits sont obtenus avec des rendements allant de bons à très bons. Des amines encombrées telles que la valine et l'isoleucine peuvent être couplées avec de bons rendements (62% et 69%). L'asparagine et la glutamine activée, sans protection de la chaîne latérale, conduisent à des rendements modérés et bons (49% et 65%). Enfin, différents groupements protecteurs de la fonction *C*-terminale (O*t*Bu, OMe, OEt, OAllyl) sont tolérés par la réaction.

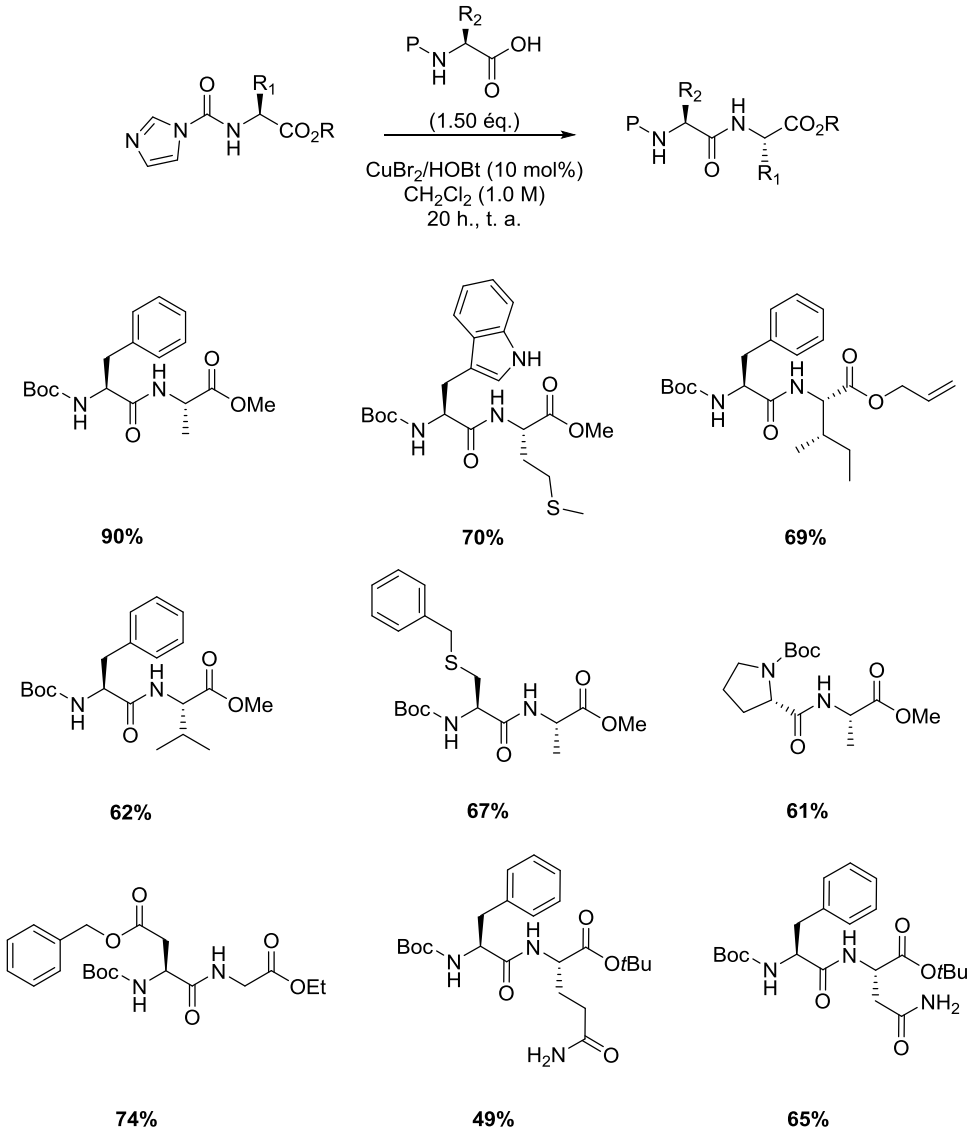


Schéma 100 : Étendue de la réaction, dérivés Boc

- <u>Dérivés Fmoc</u> : Globalement, les dipeptides protégés sous forme de Fmoc sont obtenus avec des rendements légèrement inférieurs par comparaison à leurs homologues Boc. Ceci peut être attribué à la faible solubilité des dérivés Fmoc dans le dichlorométhane à cette concentration (Schéma 101).

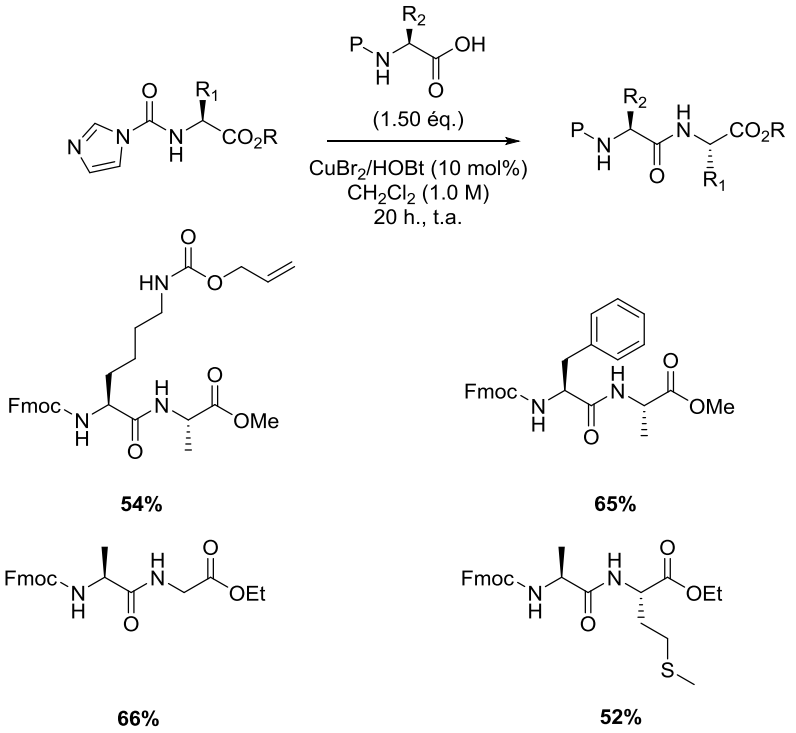


Schéma 101 : Étendue de la réaction, dérivés Fmoc

- <u>Dérivés Cbz</u> : Après avoir étudié les acides α-aminés protégés par les groupements Boc et Fmoc sur la position *N*-terminale, nous nous sommes intéressés aux dérivés Cbz (Schéma 102). Comme pour les dérivés précédemment décrits, les produits sont isolés avec des rendements bons à très bons.

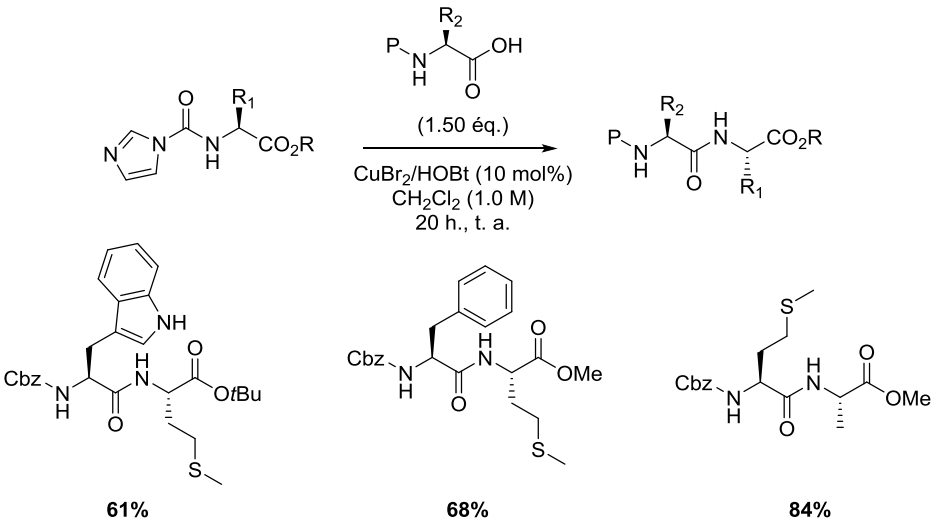


Schéma 102 : Étendue de la réaction, dérivés Cbz

Nous pouvons noter que la réaction est très propre et qu'aucune réaction secondaire n'est observée. Les sous-produits de la réaction, le dioxyde de carbone et l'imidazole, ainsi que les réactifs pouvant subsister à la fin de la réaction sont très facilement éliminés par des traitements acides et basiques (plaque CCM ci-contre représentant le dipeptide Boc-Phe-Ala-OMe après traitement acide et basique). Ainsi, une simple filtration sur colonne de silice permet d'obtenir les dipeptides avec d'excellentes puretés. En conclusion, ces conditions opératoires sont très encourageantes, notamment en vue d'une application à plus grande échelle.

II.1.3.3 Étude de cas

II.1.3.3.1 Cas des amines secondaires

Bien que représentant une très faible proportion parmi l'ensemble des acides α-aminés, les amines secondaires telles que la proline sont essentielles notamment pour la structure des protéines. Pour ces raisons, il est important que les méthodes de couplages peptidiques impliquant ces acides α-aminé soient efficaces. Nous avons alors souhaité appliquer les conditions précédemment développées à des amines secondaires ; la proline et la sarcosine.

- <u>Cas de la proline activée</u> :

Nous avons dans un premier temps étudié le cas de la proline activée, mise en réaction avec le dérivé Boc-Phe-OH dans les conditions optimales précédemment décrites.

Nous avons été navrés de constater que, dans ces conditions, le produit de couplage peptidique n'est observé qu'à l'état de traces. Le substrat Imi-Pro-O*t*Bu est quasi-intégralement retrouvé à la fin de la réaction (Schéma 103).

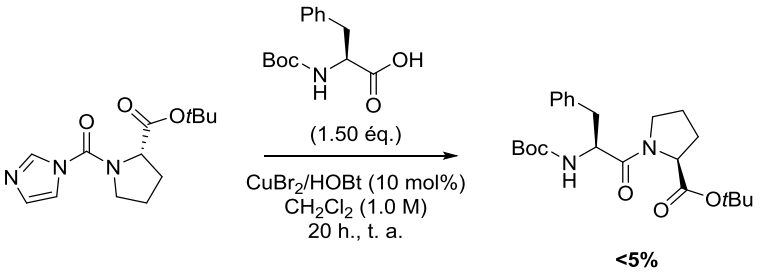


Schéma 103 : Couplage de la proline activée

Pour justifier ce résultat surprenant, nous avons dans un premier temps envisagé des raisons stériques : la présence d'une amine secondaire gênerait l'addition du carboxylate sur le composé.

Par curiosité, et pour obtenir de plus amples informations, le même couplage a été effectué, à partir du sel d'imidazolium de la proline suivant les conditions décrites par Batey (Schéma 104).[104] Ce dernier est obtenu par l'addition d'un très large excès d'iodométhane sur l'Imi-Ala-OMe pendant 20 heures. Après la disparition totale du substrat, l'évaporation du solvant (et de l'excès d'iodométhane) est effectuée et permet d'obtenir le sel d'imidazolium. Ce dernier, mis à réagir dans le dichlorométhane pendant 4 heures, en présence de Boc-Phe-OH (1,30 éq.) et de triéthylamine (1,30 éq.) permet l'obtention du dipeptide Boc-Phe-Pro-O*t*Bu avec un excellent rendement de 95%.

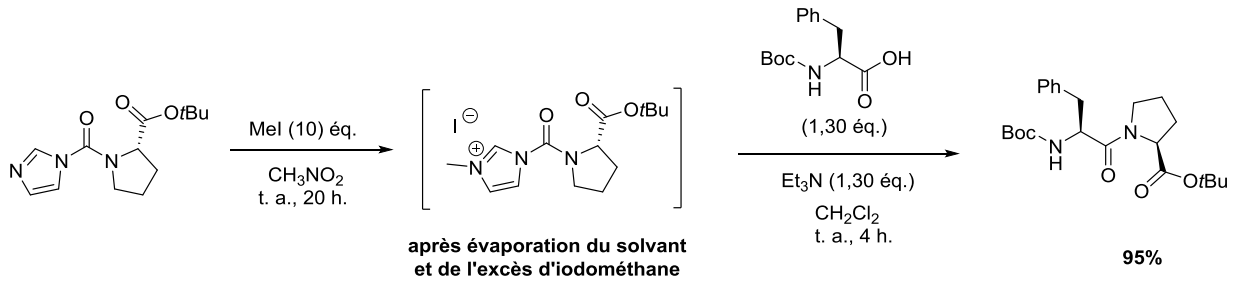


Schéma 104 : Couplage à partir du sel d'imidazolium

Cette expérience semble indiquer que la faible réactivité ne semble pas provenir seulement d'un problème d'encombrement stérique. Elle pourrait provenir de l'impossibilité à former un intermédiaire, dans le cas de l'imidazole, mais qui serait formé dans le cas de l'imidazolium.

- <u>Cas de la sarcosine</u> :

Si l'introduction des dérivés de type proline ne pose généralement que peu de problèmes, l'incorporation d'acides α-aminés *N*-méthylés est souvent plus complexe.[98] En effet, l'encombrement stérique engendre une réactivité plus faible, entrainant l'accumulation de l'acide α-aminé activé dans le milieu réactionnel et favorisant l'apparition, via la formation d'une oxazolone, de produits secondaires non-désirés. C'est particulièrement le cas pour les acides α-aminés protégés NH-Boc, qui peuvent, via la perte du cation tert-butylique sur la forme oxazolone, se décomposer en *N*-carboxyanhydride (Schéma 105).

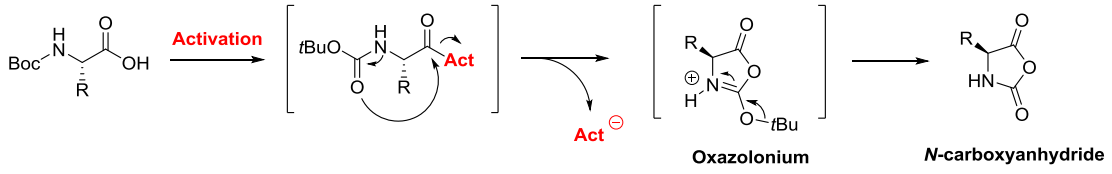


Schéma 105 : Formation de *N*-carboxyanhydride

Nous avons alors souhaité appliquer notre méthodologie au cas particulier de la sarcosine (*N*-méthyl glycine) en la couplant avec la Boc-Phe-OH, toujours dans les conditions optimales de la réaction (Schéma 106). Malheureusement, seules des traces de produit désiré sont obtenues et le substrat Imi-Sar-OMe est entièrement récupéré à la fin de la réaction.

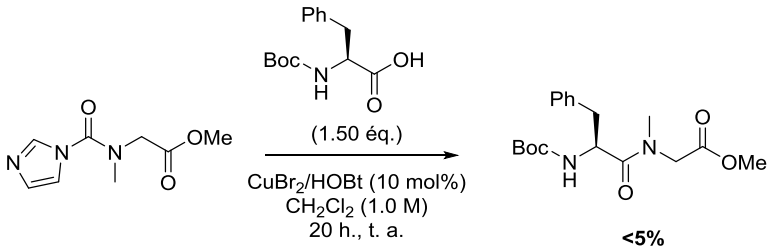
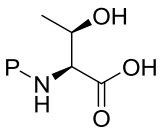


Schéma 106 : Couplage de la sarcosine activée

Notons ici la première limitation de la méthodologie développée, qui se révèle inefficace dans les couplages peptidiques impliquant des amines secondaires activées. L'utilisation d'iodométhane et le passage, dans une étape initiale, par un sel d'imidazolium permet d'obtenir un dipeptide avec un excellent rendement (cas de la proline). Cependant, l'iodométhane étant un réactif toxique, cette méthode parait par conséquent plus difficilement applicable.

Après avoir étudié le cas des amines secondaires, nous nous sommes intéressés à la sélectivité de la réaction à travers l'utilisation d'acides α-aminés présentant des chaînes latérales qui, lorsqu'elles sont non-protégées, sont potentiellement réactives.

II.1.3.3.2 Cas de la thréonine non-protégée



Le premier cas étudié est celui de la thréonine. Pour cela, la Boc-Thr-OH est couplée à l'Imi-Ala-OMe en présence de 10 mol% d'HOBt et de $CuBr_2$ pendant 20 heures à température ambiante (Schéma 107). Le dipeptide Boc-Thr-Ala-OMe est obtenu avec

un rendement de 51% en mélange avec l'urée symétrique de l'alanine (20%). Il est également intéressant de noter que le produit de couplage est isolé sans qu'aucune épimérisation de la thréonine ne soit observée par RMN ^{1}H.

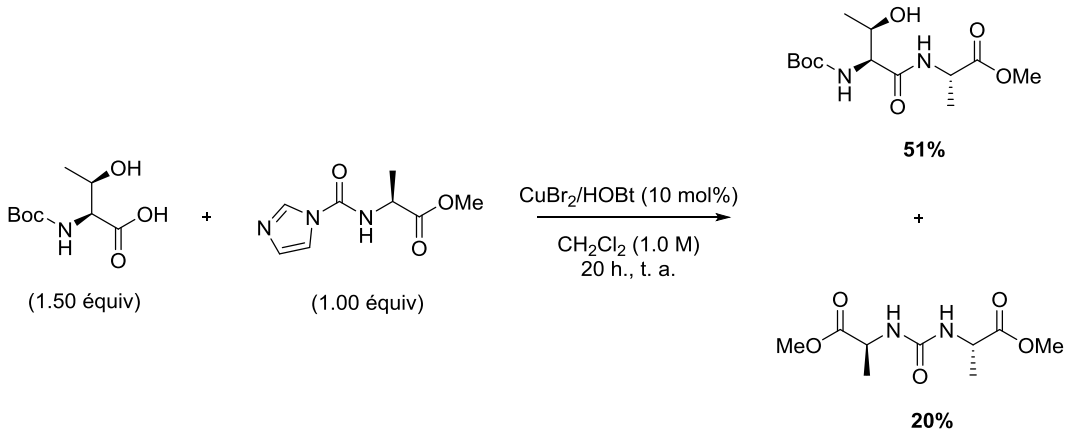
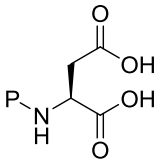


Schéma 107 : Couplage de la thréonine

II.1.3.3.3 Cas de l'acide aspartique non-protégé



Nous avons par la suite étudié la réactivité de l'acide aspartique non-protégé dans nos conditions réactionnelles afin d'évaluer l'éventuelle chimiosélectivé de la réaction. En effet, sur l'acide aspartique non-protégé, deux fonctions acides carboxyliques sont présentes. Il est possible, en théorie, d'observer la réaction d'amidation sur l'une des deux positions, ou bien sur les deux.

Pour cette étude, nous avons étudié la réaction de couplage entre l'acide aspartique et l'alanine activée. Les acides carboxyliques étant difficiles à séparer et purifier, nous avons décidé, en fin réaction, de les transformer en ester méthylique afin de simplifier les conditions d'analyse et de purification.

Pour cela, nous avons dans un premier temps synthétisé les produits susceptibles d'être présents en fin de réaction afin de les utiliser comme références (Schéma 108).

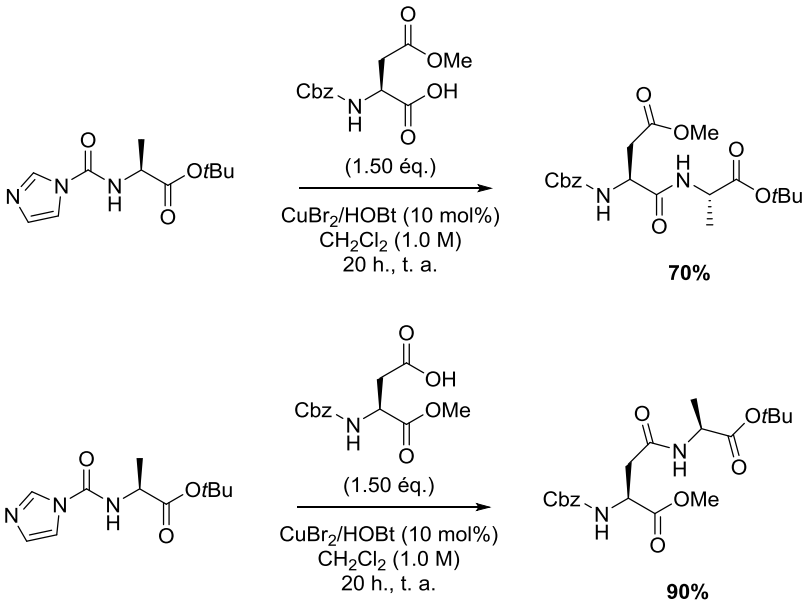
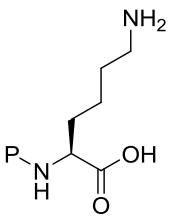


Schéma 108 : Synthèse des références

L'acide aspartique non-protégé a par la suite été couplé à l'Imi-Ala-O*t*Bu, après 20 heures de réaction, seul un traitement acide est effectué afin d'éliminer l'Imi-Ala-O*t*Bu résiduel. Le produit brut est alors traité en milieu basique par un excès d'iodométhane afin de méthyler l'acide carboxylique n'ayant pas réagi. Malheureusement, cette dernière étape n'a pas fonctionné et aucun produit méthylé n'est retrouvé en fin de réaction. Une analyse LC/MS a été effectuée sur le mélange brut, mais s'est révélée infructueuse.

Faute de temps, nous n'avons pas été en mesure de reproduire cette expérience et nous ne pouvons malheureusement rien conclure sur cette étude. Il serait cependant intéressant d'approfondir les conditions d'analyses LC/MS ou de tester d'autres méthodes d'estérification afin de pouvoir analyser la proportion des différents produits présents dans le mélange final.

II.1.3.3.4 Cas de la lysine non-protégée



Le dernier cas étudié est celui de la lysine, le but ici est donc de voir si la réaction de l'amine de la chaîne latérale sur l'amine activée est prépondérante, ou si nous pouvons effectuer le couplage peptidique de façon sélective.

La Cbz-Lys-OH n'étant pas soluble dans le dichlorométhane, nous avons dans un premier temps cherché le solvant adéquat pour cette réaction. Après plusieurs tests de solubilité dans différents solvants organique, la Cbz-Lys-OH s'est révélée soluble en milieu aqueux.

Nous avons donc utilisé le mélange H_2O/CH_3CN (1/1) pour ce couplage. La Cbz-Lys-OH est alors solubilisée dans ce milieu, l'Imi-Ala-OMe ainsi que les additifs sont par la suite ajoutés (Schéma 109). Après 20 heures de réaction, seule l'urée correspondant à l'addition de l'amine de la chaîne latérale de la lysine sur le substrat Imi-Ala-OMe a été isolée. Ce résultat semble en effet peu surprenant si l'on considère qu'une amine est beaucoup plus nucléophile qu'un carboxylate.

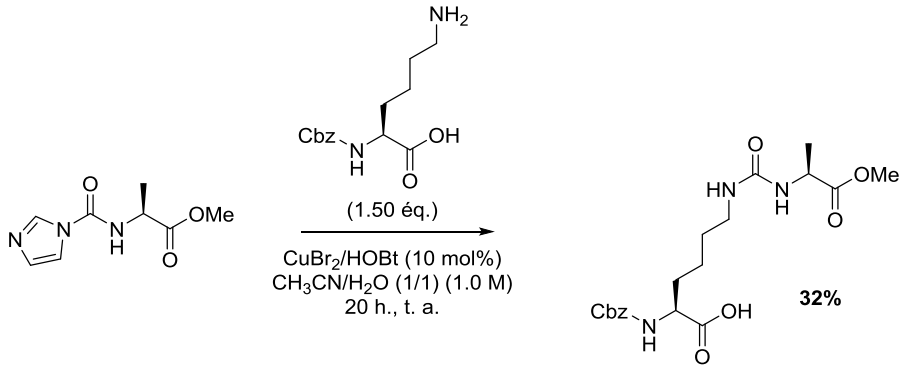
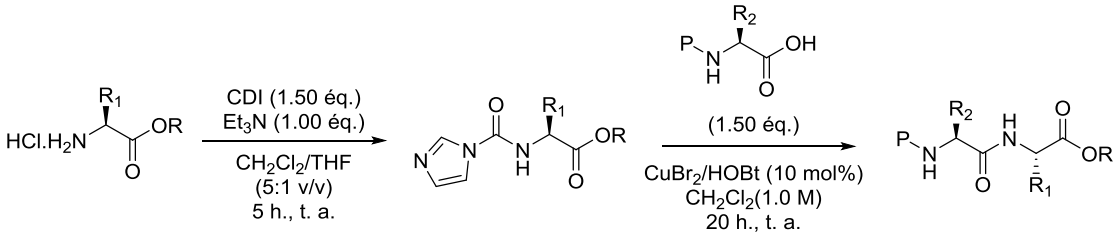


Schéma 109 : Couplage de la lysine non-protégée

II.1.4 Conclusion

Pour conclure ce paragraphe, nous avons pu développer une méthodologie de couplage peptidique via l'intermédiaire d'une amine activée. Cette stratégie se déroule en deux étapes, la première étape consistant en la synthèse de l'amine activée, suivie d'une seconde correspondant au couplage en lui-même. Les amines activées sont obtenues avec de très bons rendements et dans des conditions douces. Ces composés, mis en réaction avec un acide carboxylique et différents additifs [HOBt/$CuBr_2$ (10 mol%)] permettent l'obtention des dipeptides correspondants avec des rendements allant de modérés à très bons. Les conditions du couplage sont douces et la méthode est compatible avec les groupements protecteurs couramment utilisés en synthèse peptidique (Boc, Fmoc, Cbz pour la partie *N*-terminale et OMe, OEt, OAllyl, O*t*Bu pour la partie *C*-terminale). Par ailleurs, nous avons pu effectuer un couplage peptidique impliquant une thréonine non-protégée. Les autres tests effectués sur la lysine et l'acide aspartique non-protégés n'ont pas été concluants. L'une des limitations majeures de cette méthodologie est l'échec des couplages lorsqu'une amine secondaire est utilisée (proline et sarcosine). Cet échec peut être contourné par l'utilisation d'iodométhane (cas de la proline) via la formation d'un sel d'imidazolium, mais il semble peu valorisable, dans le cadre d'une chimie éco-compatible, d'utiliser un tel réactif.

Enfin, nous avons été agréablement surpris de constater que la réaction fonctionne sans ajout de base dans le milieu réactionnel, ce qui nous a semblé être de bon augure pour la suite du projet concernant l'étude de la racémisation.



- **Très bons rendements**
- **Purification aisée**
- **Conditions douces**
- **Composés stables**

- **Bons rendements**
- **Conditions douces**
- **Absence de base**
- **Purification aisée**
- **Compatibilité Fmoc, Cbz, Boc**
- **Temps de réaction long (20 h.)**
- **Amines secondaires**

II.1.5 Étude de la racémisation

Après avoir étendu notre méthodologie à la synthèse de quelques dipeptides, nous avons souhaité évaluer son efficacité dans les cas où l'utilisation d'agents de couplages classiques montre ses limites ; la racémisation. Si notre hypothèse mécanistique est bonne, il serait alors possible d'atténuer, voir éliminer les problèmes inhérents à la stratégie classique.

II.1.5.1 Cas de la cystéine

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au cas de la cystéine, qui lorsqu'elle est activée, conduit à des produits de couplages avec de hauts niveaux d'épimérisation.[106] Celle-ci est favorisée par la création, lors de l'activation de l'acide, d'une liaison hydrogène avec l'atome de soufre, formant un intermédiaire stabilisé à 6 chaînons. Il a également été suggéré, suite à la déprotonation par une base, que le carboxylate généré soit stabilisé par les orbitales d vacantes du soufre (Schéma 110).[17]

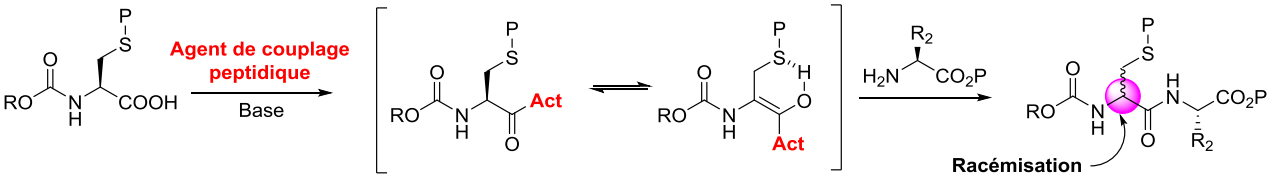


Schéma 110 : Racémisation de la cystéine

Pour cette étude, le dipeptide Boc-Cys(Bn)-Ala-OMe issu du couplage entre la Boc-Cys(Bn)-OH et l'alanine activée a été choisi comme substrat modèle (Schéma 111).

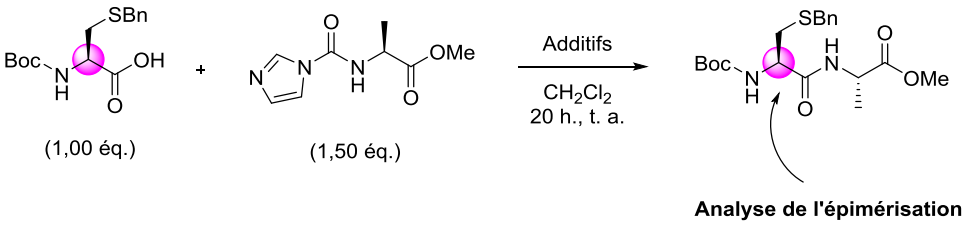
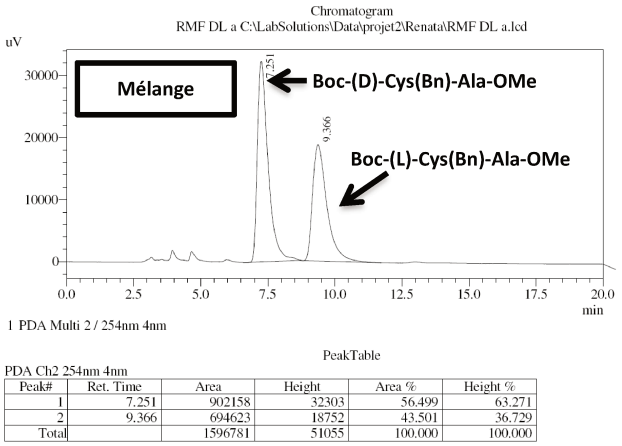


Schéma 111 : Analyse de l'épimérisation

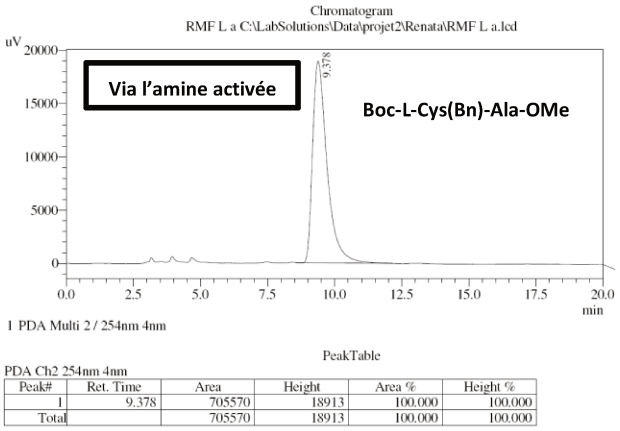
Après avoir trouvé des conditions analytiques par HPLC chirale permettant d'évaluer les éventuels taux d'épimérisation, différentes conditions réactionnelles ont été étudiées (Tableau 4). Lorsque la réaction

[106] H. Li, X. Jiang, Y.- H. Ye, C. Fan, T. Romoff, M. Goodman, *Org. Lett.* **1999**, 1, 91-93.

est menée en l'absence d'additifs, aucune épimérisation n'est détectée et le produit est isolé avec un rendement de 60% (Entrée 1). L'ajout d'une quantité catalytique d'imidazole (10 mol%) conduit également au produit de couplage non-épimérisé (Entrée 2). Il en est de même lorsque des acides de Brønsted (APTS et HOBt) et l'acide de Lewis $CuBr_2$ sont utilisés (Entrées 3-5). Enfin, dans les conditions optimales de la réaction, le produit est isolé avec un rendement de 67% sans qu'aucune épimérisation ne soit détectée (Entrée 6).



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	7.251	902158	32303	56.499	63.271
2	9.366	694623	18752	43.501	36.729
Total		1596781	51055	100.000	100.000



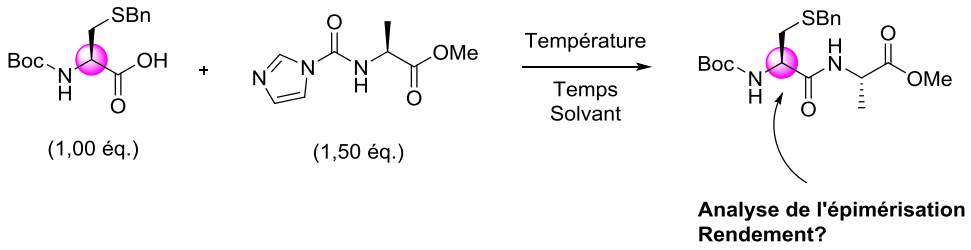
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	9.378	705570	18913	100.000	100.000
Total		705570	18913	100.000	100.000

Entrée	Additifs	Rendement	Épimérisation
1	-	60%	non-détectée
2	Imidazole (10 mol%)	55%	non-détectée
3	$CuBr_2$ (10 mol%)	64%	non-détectée
4	APTS (10 mol%)	65%	non-détectée
5	HOBt (10 mol%)	61%	non-détectée
6	HOBt/$CuBr_2$ (10 mol%)	67%	non-détectée

Tableau 4 : Epimérisation de la cystéine via l'activation de l'amine

Suite à ces résultats encourageants obtenus à température ambiante, nous avons souhaité évaluer l'effet de la température sur notre réaction. En effet, les temps de réaction étant relativement longs (20 h.), nous avons jugé intéressant d'utiliser un chauffage micro-ondes pour accélérer la réaction. Cet effet bénéfique d'un point de vue cinétique ne doit pas avoir lieu au détriment d'une épimérisation ou d'une réactivité parasite quelconque. C'est pour cette raison que les premiers essais aux micro-ondes ont été effectués sur le cas de la cystéine et ces résultats sont résumés sur le Tableau 5. Nous pouvons voir qu'un rendement correct de 49% est obtenu lorsque la réaction est effectuée dans le CH_2Cl_2, à 60

°C pendant 45 minutes. Cependant, alors qu'à température ambiante, le produit est isolé sans épimérisation, dans ce cas, un pourcentage non-négligeable de produit épimérisé est détecté (8,9%) (Entrée 1). Il est intéressant de remarquer une baisse de l'épimérisation (0,6%) lorsque le DMF est utilisé comme solvant (Entrée 2). Cependant, le produit est isolé avec un très faible rendement de 10%. De plus, en réalisant la réaction à une température légèrement inférieure (45 °C) pendant 75 minutes, un taux d'épimérisation de 2,4% est détecté accompagné d'un rendement de 55% (Entrée 3).



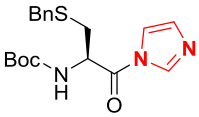
Entrée	Température	Temps de réaction	Solvant	Rendement	Épimérisation
1	60 °C	45 min.	CH_2Cl_2	49%	8,9%
2	60 °C	45 min.	DMF	10%	0,6%
3	45 °C	75 min.	CH_2Cl_2	55%	2,4%

Tableau 5 : Essais micro-ondes

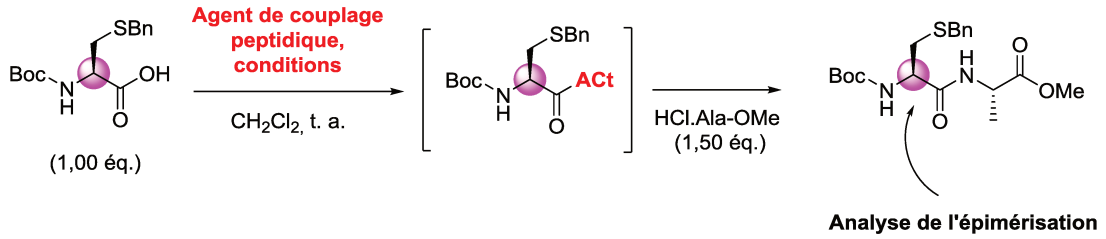
En analysant ces résultats, nous pouvons remarquer l'impact bénéfique d'une augmentation de la température sur la cinétique de la réaction. En effet, le produit est isolé avec un rendement de 60% à température ambiante durant 20 heures (Tableau 4, Entrée 1) alors qu'un chauffage micro-ondes à 45 °C pendant 75 minutes permet de l'isoler avec un rendement similaire de 55% (Tableau 5, Entrée 3). Cependant, l'épimérisation sensiblement supérieure nous a conduits à « abandonner » cette étude micro-ondes.

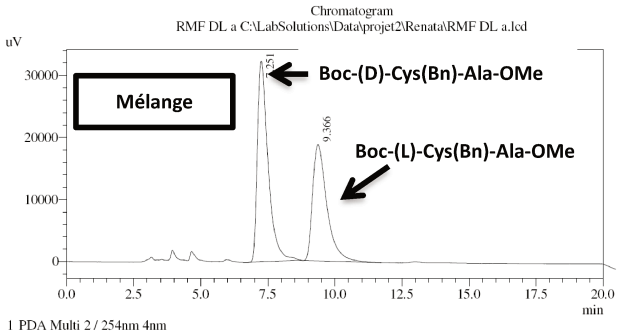
À titre comparatif, nous avons souhaité évaluer le degré d'épimérisation de la cystéine, lorsqu'elle est activée, et ce dans différentes conditions. La sensibilité de la cystéine, d'un point de vue de l'épimérisation, peut être vérifiée sur le Tableau 6. En effet, lorsqu'elle est préactivée par le BOP durant 5 minutes en présence de 4 équivalents de base encombrée (DIPEA), le produit de couplage est obtenu avec un très bon rendement de 87%, mais une épimérisation de 35% (Entrée 1). Sans surprise, si le temps de préactivation diminue, l'épimérisation diminue également, mais reste tout de même de 12% (Entrée 2). Afin d'évaluer l'influence de la quantité de base utilisée, cette même réaction a été

menée en présence de deux équivalents de DIPEA conduisant à un degré d'épimérisation moins important (7%), mais une chute considérable du rendement est observée (Entrée 3). Toujours dans le but de diminuer la quantité de base utilisée, la réaction a été réalisée en présence d'un seul équivalent de DIPEA et en ajoutant l'alanine (le sel étant préalablement déprotoné). Dans ce cas, il n'est pas surprenant d'observer une sévère chute de rendement (27%) malgré l'obtention du produit de couplage présentant un faible degré d'épimérisation (1,5%) (Entrée 4).



Enfin, lorsque le CDI est utilisé en tant qu'agent de couplage classique, permettant de générer un intermédiaire acide activé de type acyl-imidazole (voir figure ci-contre), le produit est isolé avec un rendement de 80% et 8% d'épimérisation ont été détectés (Entrée 5). Sans surprise, lorsque le temps de préactivation est prolongé jusqu'à 30 minutes, une épimérisation de 30% est alors observée (Entrée 6).

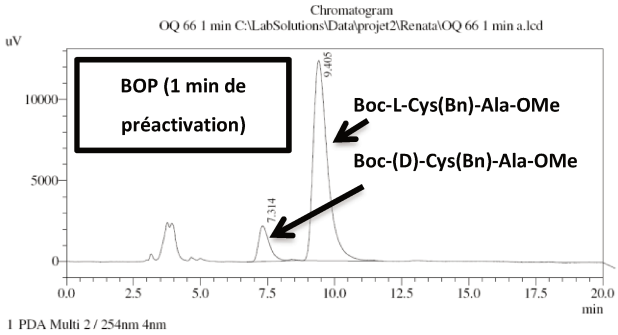




PeakTable

PDA Ch2 254nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	7.251	902158	32303	56.499	63.271
2	9.366	694623	18752	43.501	36.729
Total		1596781	51055	100.000	100.000



PeakTable

PDA Ch2 254nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	7.314	61889	2204	11.856	15.117
2	9.405	460135	12374	88.144	84.883
Total		522024	14578	100.000	100.000

Entrée	Conditions	Temps de préactivation	Rendement	Épimérisation
1	BOP (1,50 éq.) DIPEA (4,00 éq.)	5 min.	87%	35%
2	BOP (1,50 éq.) DIPEA (4,00 éq.)	1 min.	80%	12%
3	BOP (1,50 éq.) DIPEA (2,00 éq.)	5 min.	41%	7,0%
4	BOP (1,50 éq.) DIPEA (1,00 éq.), H_2N-Ala-OMe	5 min.	27%	1,5%
5	CDI (1,00 éq.)	5 min.	80%	8,0%
6	CDI (1,00 éq.)	30 min	82%	30%

Tableau 6 : Epimérisation de la cystéine via la stratégie classique

Suite à ces résultats encourageants concernant l'étude de l'épimérisation de la cystéine au cours de la formation d'un dipeptide, nous avons souhaité évaluer l'efficacité de notre méthodologie lors de la synthèse d'un tripeptide. Nous nous sommes alors tournés vers l'étude de l'éventuelle épimérisation pouvant avoir lieu au cours de la synthèse du composé Cbz-Gly-Phe-Gly-OEt.

II.1.5.2 Test d'Anderson: Cbz-Gly-Phe-Gly-OEt

L'une des méthodes classiques pour tester l'efficacité d'un couplage peptidique vis-à-vis la racémisation est le test d'Anderson.[95] Le but de ce test consiste en la synthèse du tripeptide Cbz-Gly-Phe-Gly-OEt à partir du dipeptide Cbz-Gly-Phe-OH. Comme nous l'avons vu précédemment, via la stratégie classique, une réaction intramoléculaire de l'acide activé peut conduire à la formation d'une oxazolone sensible à l'épimérisation potentielle. L'ouverture de cette dernière par l'amine de la glycine conduirait à un produit partiellement racémisé.

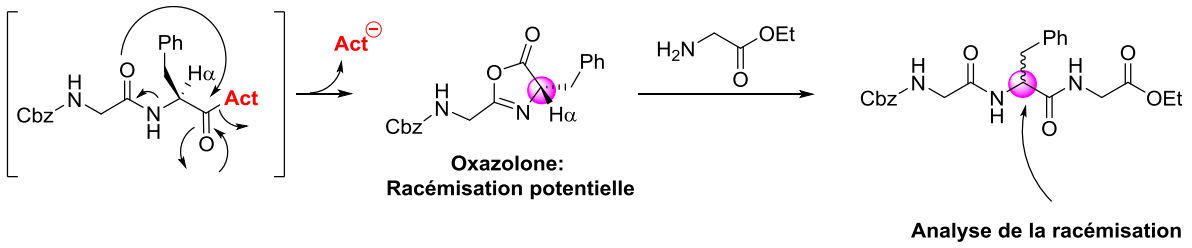
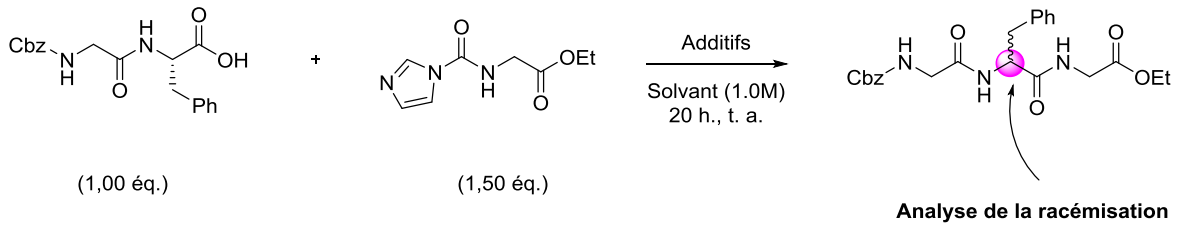


Schéma 112 : Racémisation au cours du test d'Anderson

La popularité de ce test provient, à l'origine, de la méthode d'analyse de la racémisation : le racémate obtenu était cristallisé et quantifié par pesée. Pour des raisons de précision de mesure, nous avons choisi d'analyser la racémisation potentielle par HPLC chirale et après avoir trouvé les conditions de séparation adéquates, différentes conditions réactionnelles ont été testées. Les résultats obtenus sont référencés dans le Tableau 7. Notons que pour des soucis de répétabilité de la réaction, chaque test a été effectué deux fois, les valeurs données ci-dessous représentent la valeur moyenne des deux résultats.

Dans un premier temps, la réaction a été menée sans ajout d'additifs et nous a permis d'isoler le tripeptide avec un rendement de 55% et un degré de racémisation de 5,5% (Entrée 1). Afin d'évaluer l'influence potentielle du solvant, le CH_3NO_2 a été utilisé et dans ce cas, la racémisation est similaire (5,9%) et le produit est obtenu avec un rendement de 63% (Entrée 2). Nous nous sommes ensuite intéressés à l'ajout de différents additifs afin de voir leur impact sur la réaction. En l'occurrence, l'ajout d'une quantité catalytique d'imidazole (10 mol%) conduit à un taux de racémisation légèrement plus élevé (7,9%) et une légère chute du rendement (47%) (Entrée 3). L'ajout d'APTS (10 mol%) ne permet pas d'observer de diminution significative de la racémisation au cours de la réaction, en effet, le produit est obtenu avec une racémisation de 5,7% et isolé avec un rendement de 57% (Entrée 4). En revanche, lorsque la réaction est menée en présence d'HOBt (10 mol%), le pourcentage de racémisation diminue (3,3%) pour un rendement de 60% (Entrée 5). Le taux de racémisation est de

1,2% lorsque la réaction est menée en présence de 10 mol% de $CuBr_2$ (Entrée 6). Si la charge catalytique est de 5 mol%, le produit présente alors un degré de racémisation de 2,7%. La source de sel de cuivre a également été brièvement étudiée et des rendements similaires sont obtenus lorsque le $Cu(OTf)_2$ est utilisé (Entrée 8). Enfin, la combinaison d'une quantité catalytique d'HOBt (10 mol%) et de $CuBr_2$ (10 mol%) permet d'obtenir le tripeptide avec un rendement de 55% et une valeur de racémisation inférieure à 1% (Entrée 9).



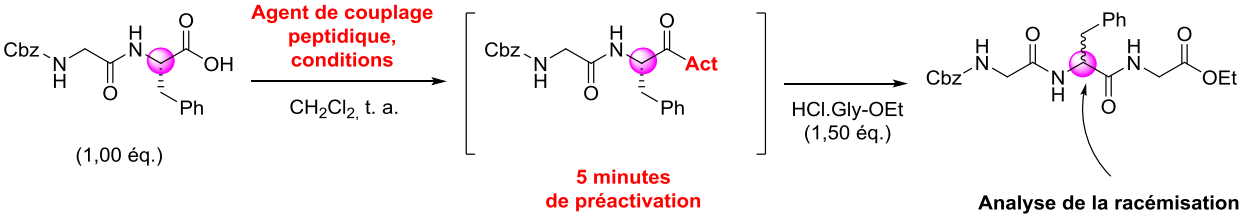
Entrée	Solvant	Additifs	Rendement	Racémisation
1	CH_2Cl_2	-	55%	5,5%
2*	CH_3NO_2	-	63%	5,9%
3	CH_2Cl_2	Imidazole (10 mol%)	47%	7,9%
4	CH_2Cl_2	APTS (10 mol%)	57%	5,7%
5	CH_2Cl_2	HOBt (10 mol%)	60%	3,3%
6	CH_2Cl_2	$CuBr_2$ (10 mol%)	62%	1,2%
7	CH_2Cl_2	$CuBr_2$ (5 mol%)	50%	2,7%
8	CH_2Cl_2	$Cu(OTf)_2$ (10 mol%)	50%	1,5%
9	CH_2Cl_2	HOBt/$CuBr_2$ (10 mol%)	55%	<1,0%

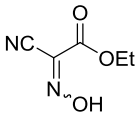
*Pour des raisons de solubilité, la concentration est de 0,25M.

Tableau 7 : Test d'Anderson via l'activation de l'amine

Parallèlement à ce travail, et en guise de comparaison, le test d'Anderson a également été appliqué suivant la stratégie classique. Pour ce faire, la Cbz-Gly-Phe-OH est couplée au sel de glycine via l'utilisation d'un agent de couplage et avec un temps de préactivation de 5 minutes. Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus (Tableau 8). Lorsque le dipeptide Cbz-Gly-Phe-OH est préactivé par le BOP en présence de 4 équivalents de DIPEA, le tripeptide d'Anderson est isolé avec un rendement de 57% et une racémisation de 39,9% (Entrée 1). Au vu de ce fort degré de racémisation obtenu via l'utilisation du BOP, nous avons envisagé de tester un autre agent de couplage couramment utilisé en synthèse peptidique : le DIC. Cet agent de couplage est très souvent utilisé en combinaison

d'un additif (HOBt…) jouant le rôle de nucléophile relai. Récemment, Albericio a reporté l'utilisation d'un de ces additifs, particulièrement efficace quant à la racémisation ; l'oxyma®.[107] C'est en effet le cas pour le test d'Anderson, lorsque la réaction est menée en présence de DIC et de cet additif (Oxyma), le tripeptide est isolé avec un rendement de 55% sans trace visible de racémisation (<1,0%) (Entrée 2). Précisions tout de même que dans ce cas, le sel de glycine est préalablement mis en réaction avec un équivalent de DIPEA avant d'être ajouté au milieu. Lorsque le CDI est utilisé comme agent de couplage classique, le produit est obtenu avec un rendement de 54% et un pourcentage de racémisation de 8,6% (Entrée 3). Dans le but de se rapprocher de nos conditions, le test d'Anderson a également été effectué par l'ajout de CDI sur la Cbz-Gly-Phe-OH et une quantité catalytique d'HOBt (10 mol%) et de $CuBr_2$ (10 mol%). Dans ce cas, un degré de 5,8% de racémisation est détecté pour un rendement de 61%.





Oxyma

Entrée	Conditions	Rendement	Racémisation
1	BOP (1,50 éq.) DIPEA (4,00 éq.)	57%	39,9%
2	DIC (1,50 éq.) Oxyma (1,50 éq.) H_2N-Gly-OEt (1,50 éq.)	55%	<1,0%
3	CDI (1,00 éq.)	54%	8,6%
4	CDI (1,00 éq.) HOBt/$CuBr_2$ (10 mol%)	61%	5,8%

Tableau 8 : Test d'Anderson via la stratégie classique

En conclusion, la méthodologie développée au cours de ce travail de thèse semble être efficace d'un point de vue de la racémisation. En effet, dans le cas de la cystéine, si les méthodologies classiques permettent l'obtention de produits partiellement épimérisés, lorsque la réaction est effectuée via l'activation de l'amine, aucune épimérisation n'est détectée. En revanche, de faibles pourcentages de

[107] R. S. Funosas, R. Prohens, R Barbas, A. El-Faham, F. Albericio, *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 9394 - 9403.

racémisation ont été détectés dans le cas du test d'Anderson suivant les conditions utilisées. Cependant, dans les conditions optimales de la réaction (HOBt/$CuBr_2$ (10 mol%)), le produit d'Anderson est obtenu sans dégradation de la stéréointégrité du centre chiral (<1%).

II.1.6 Synthèse d'un tétrapeptide dans le sens naturel (N→C)

Comme décrit précedemment, la synthèse peptidique dans le sens ribosomal, via l'utilisation d'agents de couplages classiques n'est pas recommandée. En effet, chaque couplage résulterait en une épimérisation partielle de l'acide α-aminé. Il est donc apparu intéressant d'évaluer l'efficacité de notre méthodologie, en particulier vis-à-vis de l'épimérisation, à travers la synthèse N→C d'un tétrapeptide modèle.

- Synthèse du tétrapeptide :

Le composé modèle choisi pour « valider le concept » est le tétrapeptide Cbz-Trp-Met-Val-Phe-O*t*Bu. Concrètement, chaque couplage est effectué dans les conditions optimales de la réaction, en présence d'une quantité catalytique d'HOBt (10mol%) et de $CuBr_2$ (10 mol%), dans le dichlorométhane à température ambiante. La chaîne principale du peptide en élongation est protégée sous forme d'ester *tert*-butylique et la déprotection s'effectue donc dans des conditions acides (TFA/TIS/H_2O). Après chaque étape de couplage, le composé est isolé par simple filtration sur colonne de silice (Schéma 113).

La première étape de la synthèse consiste en le couplage entre la Cbz-Trp-OH et l'Imi-Met-O*t*Bu et nous a permis d'isoler le produit de couplage avec un rendement de 82%. L'ester tert-butylique est par la suite déprotégé pour fournir le dipeptide Cbz-Trp-Met-OH. Ce dernier est de nouveau engagé dans un couplage pour donner le tripeptide Cbz-Trp-Met-Val-O*t*Bu avec un rendement modéré de 55%. Après avoir été déprotégé, une dernière réaction de couplage est menée en présence d'Imi-Phe-O*t*Bu permettant ainsi d'isoler le tétrapeptide final avec un rendement de 56%.

NB : Les amines activées ont été préparées sur une échelle de 2 grammes. Dans ce cas, les urées symétriques de la valine et de la phénylalanine (<10%) ont été observées et sont difficilement séparables des amines activées.

D'autre part, un suivi LC/MS des cycles de déprotection de l'ester tert-butylique a permis de révéler que cette réaction n'était pas totale. L'acide correspondant a alors été précipité et utilisé dans le couplage suivant.

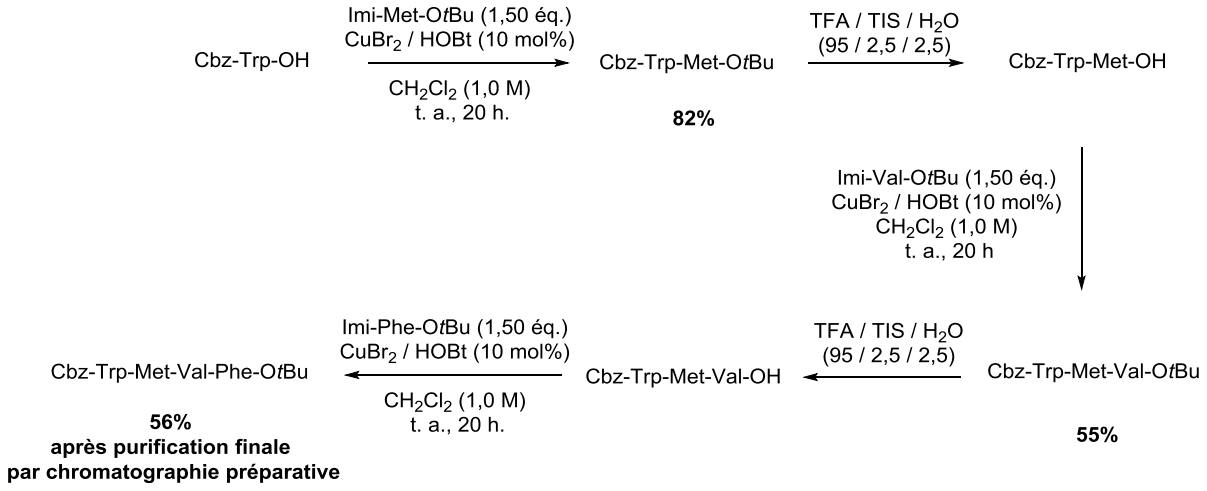


Schéma 113 : Synthèse N→C via l'amine activée

De façon parallèle à la stratégie classique, le même composé a été synthétisé, dans le même sens, mais en utilisant un agent de couplage peptidique classique (Schéma 114). Chaque réaction est alors menée en présence d'un excès de PyBOP (1,50 éq.), de sel d'acide α-aminé (1,5 éq.) et de DIPEA (4,00 éq.). Si dans notre cas une simple filtration sur colonne de silice est suffisant, il est inévitable dans ce cas de purifier le composé après chaque étape afin d'éliminer les sous-produits du couplage (oxyde de phosphine...).

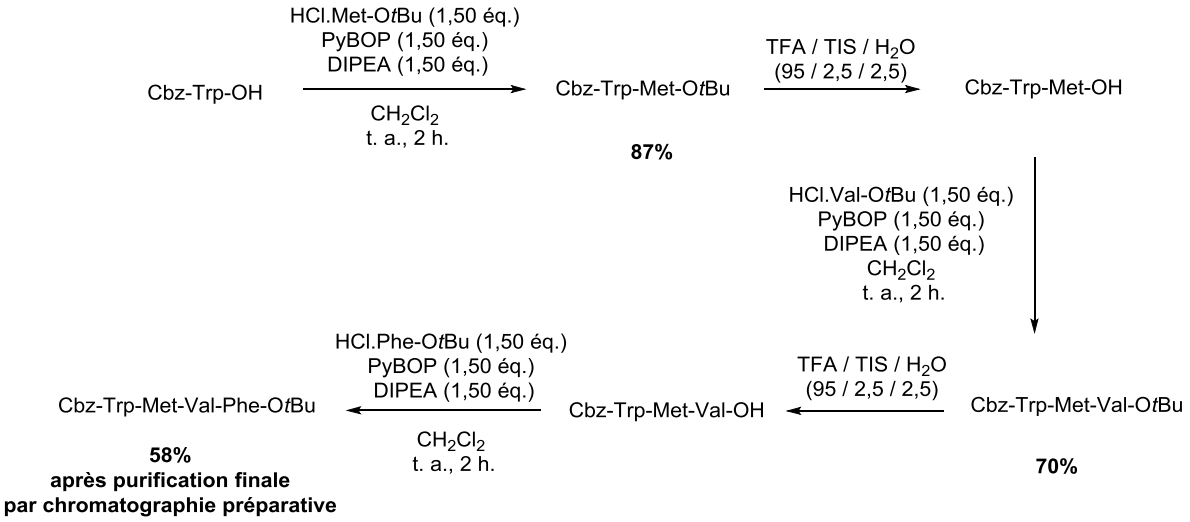


Schéma 114 : Synthèse N→C via l'utilisation de PyBOP

➢ Purification et comparaison des résultats :

Les deux produits « bruts » issus de la stratégie NIPS et de la stratégie « PyBOP » ont été analysés par LC/MS :

a) dans le cas de la stratégie NIPS, le chromatogramme ne présente que peu de sous-produits hormis la présence des urées symétriques provenant de l'étape d'activation de la valine et de la phénylalanine (Figure 7, chromatogramme a).

b) En revanche, dans le cas de la stratégie PyBOP, l'étape de purification par colonne de silice réalisée après chaque couplage permettant d'éliminer les sous-produits de couplage (notamment l'oxyde de phosphine) a permis d'obtenir un produit « brut » relativement propre, bien qu'il ne semble pas libre de sous-produits « entourant » le pic du tétrapeptide (Figure 7, chromatogramme b).

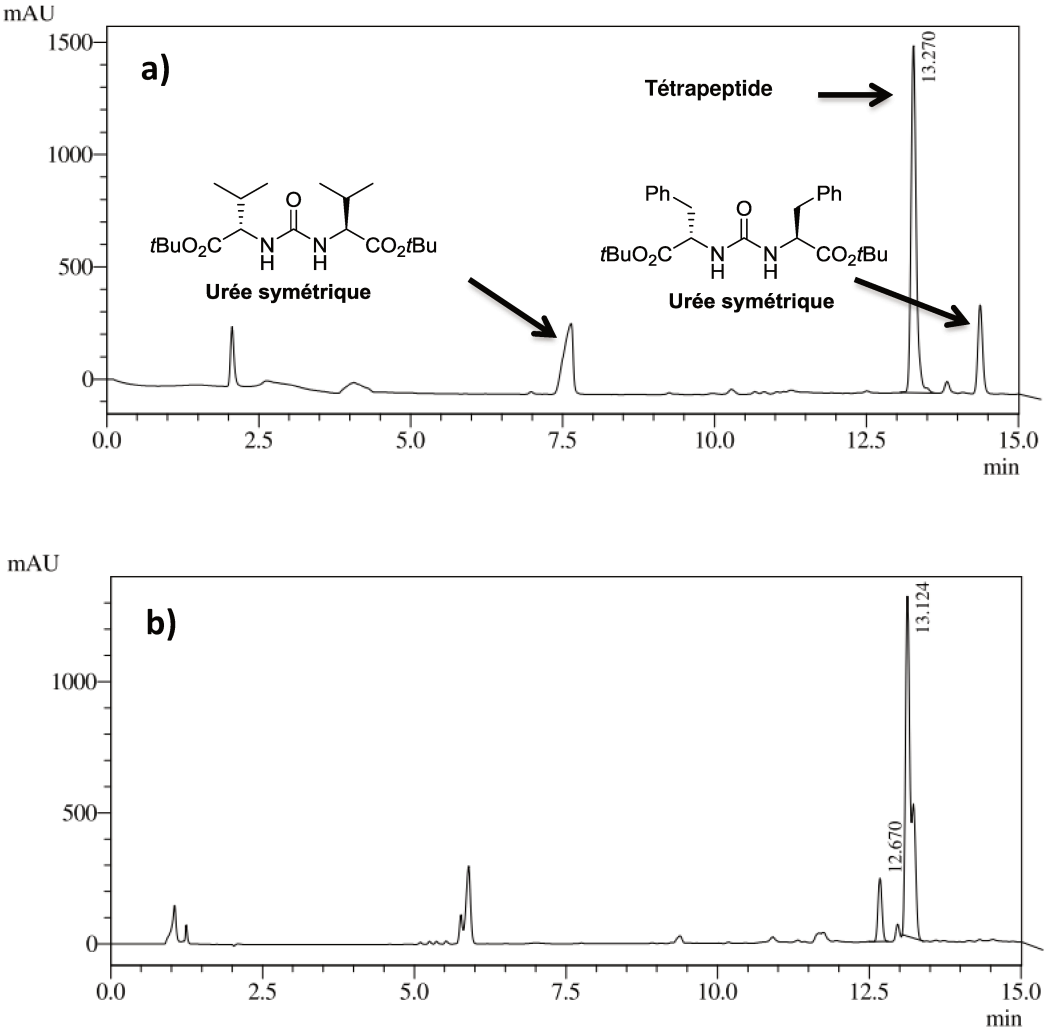


Figure 7 : Chromatogrammes HPLC, produits bruts : a) stratégie NIPS et b) stratégie « PyBOP »

Enfin, la purification finale des deux tétrapeptides a été réalisée par HPLC. Les chromatogrammes des produits purs sont représentés ci-dessous (Figure 8, chromatogrammes a et b). Nous pouvons noter la présence d'une impureté difficilement séparable, présente en plus grande quantité dans le produit issu de la stratégie « PyBOP » (Figure 8, chromatogramme b). Une analyse LC/MS nous a permis d'identifier cette impureté comme étant un mélange de diastéréoisomères très certainement dû au phénomène de racémisation. La comparaison du profil HPLC des deux composés indique que ce dernier est bien plus important dans le cas de la stratégie « PyBOP » que dans le cas de la stratégie « NIPS ».

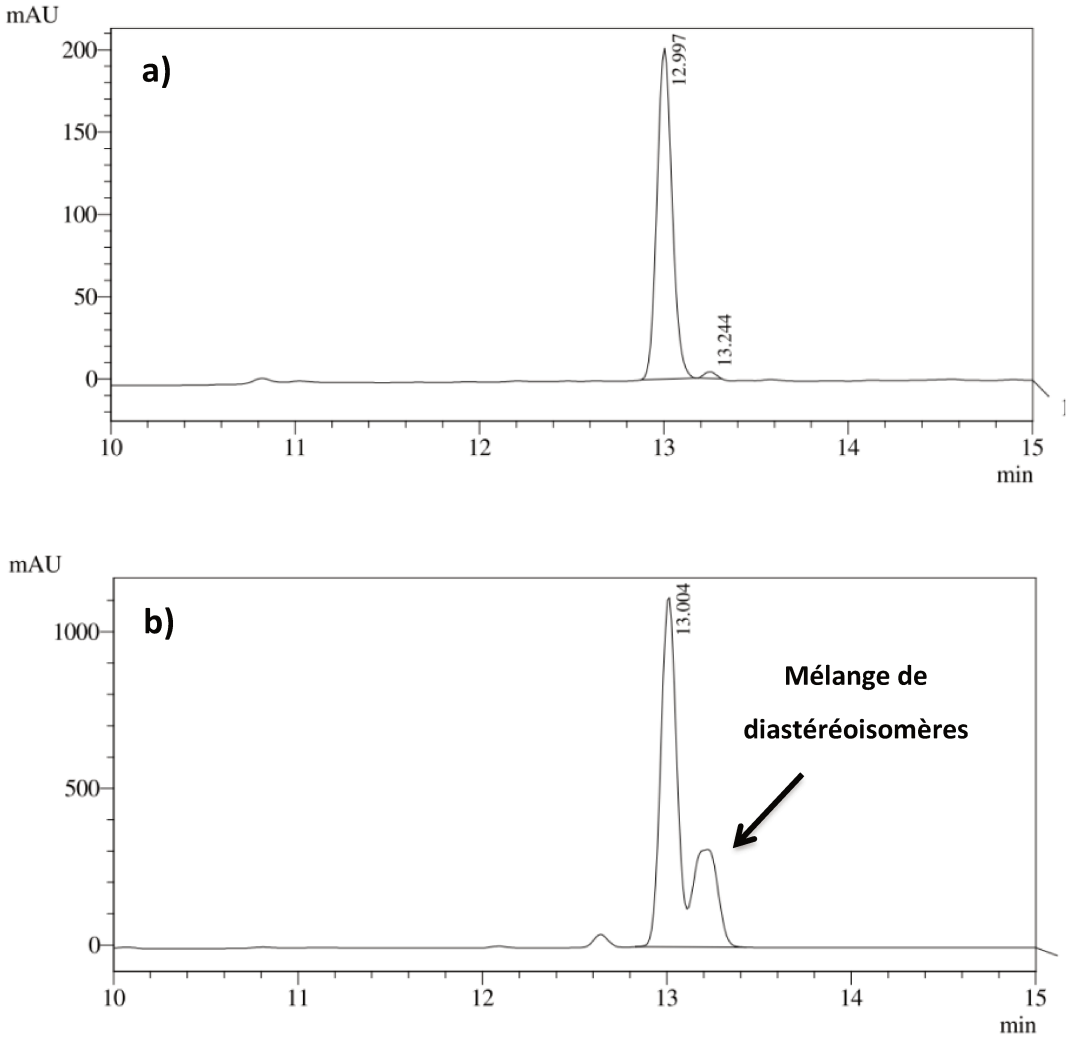


Figure 8 : Chromatogrammes HPLC, produits purifiés : a) stratégie « NIPS »et b) stratégie « PyBOP »

Ces informations étant qualitatives, nous avons souhaité avoir une analyse plus précise et quantitative de la racémisation ayant eu lieu au cours de cette synthèse. Pour ce faire, l'idée envisagée a été d'utiliser le test de Marfey.[108]

- Test de Marfey :

- Principe :

L'une des méthodes couramment utilisées pour analyser la pureté optique d'un peptide est le test de Marfey. Ce test est basé sur la dérivatisation des acides α-aminés ; une première étape est donc nécessaire et consiste en la coupure de chaque liaison peptidique permettant de générer tous les acides α-aminés « nus ». Ces derniers sont alors mis en réaction avec un agent de dérivatisation, en l'occurrence le réactif de Marfey afin de former des paires de diastéréoisomères pouvant être analysées dans un « environnement achiral ». Une analyse LC/MS permet alors de séparer chaque couple de diastéréoisomères (LC), puis le rapport de masse (m/z) permet d'identifier chaque acide α-aminé (MS) (Schéma 115).

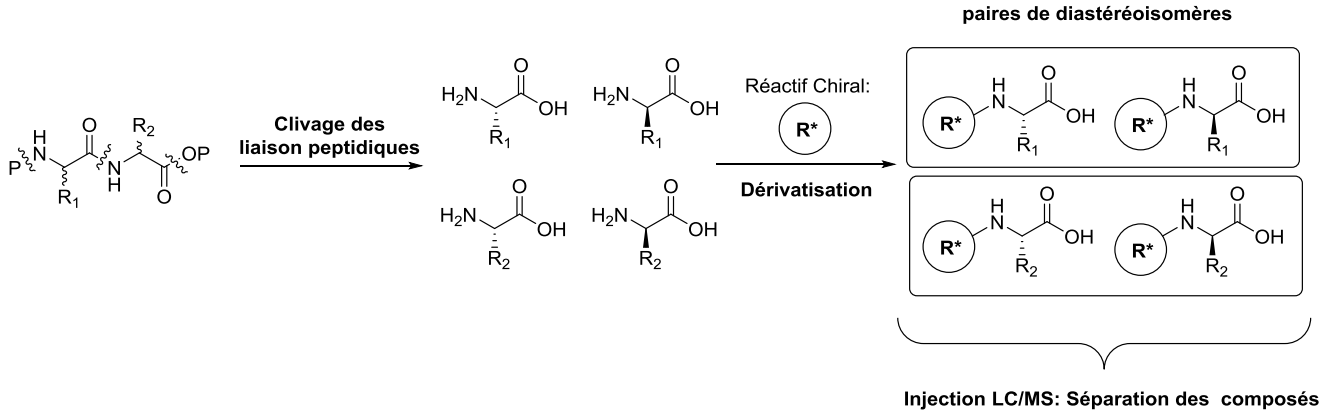


Schéma 115 : Principe de dérivatisation d'acides α-aminés

De façon plus concrète, le réactif de Marfey représenté ci-dessous peut subir une réaction de substitution nucléophile aromatique pour conduire au produit de dérivatisation possédant deux centres stéréogènes et un groupement chromophore (Schéma 116).

[108] R. Bhushan, H. Bruckner, *Amino Acids* **2004**, 27, 231–247.

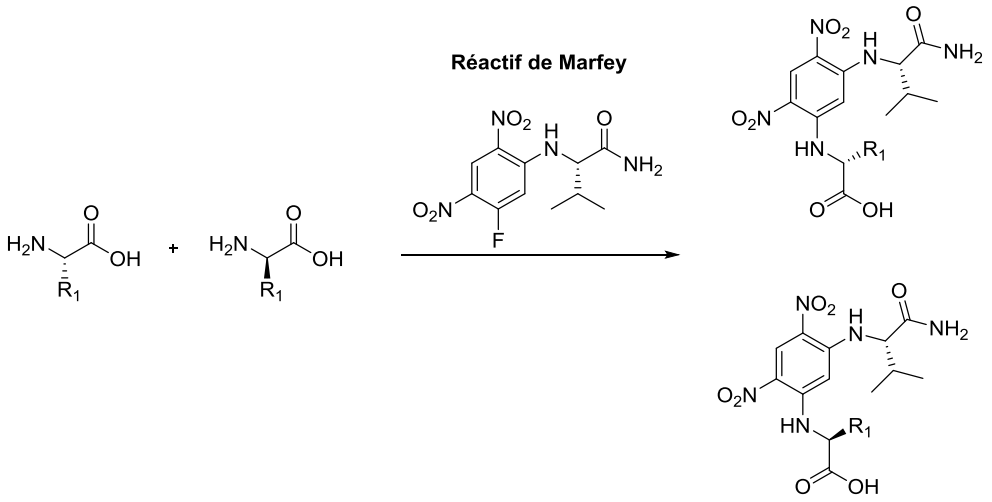


Schéma 116 : Dérivatisation via le réactif de Marfey

- <u>Résultats</u> :

La première étape consiste à trouver les conditions d'analyse des différents composés, pour cela, chaque acide α-aminé a été dérivatisé ; un mélange racémique de ces derniers a été mis à réagir avec le réactif de Marfey dans des conditions basiques (1 M $NaHCO_3$) et le mélange est placé au sonicateur à 40 °C pendant 1 heure.[109]

Les différents acides α-aminés dérivatisés ont ensuite été réunis et après un travail d'optimisation des conditions d'analyse, chaque acide α-aminé a pu être séparé et identifié. Nous pouvons en effet retrouver sur le chromatogramme ci-dessous chacun des 4 couples d'acides α-aminés dérivatisés (Trp, Met, Val, Phe).

[109] R. Bhushan, H. Bruckner, *Amino Acids* **2004**, 27, 231-247.

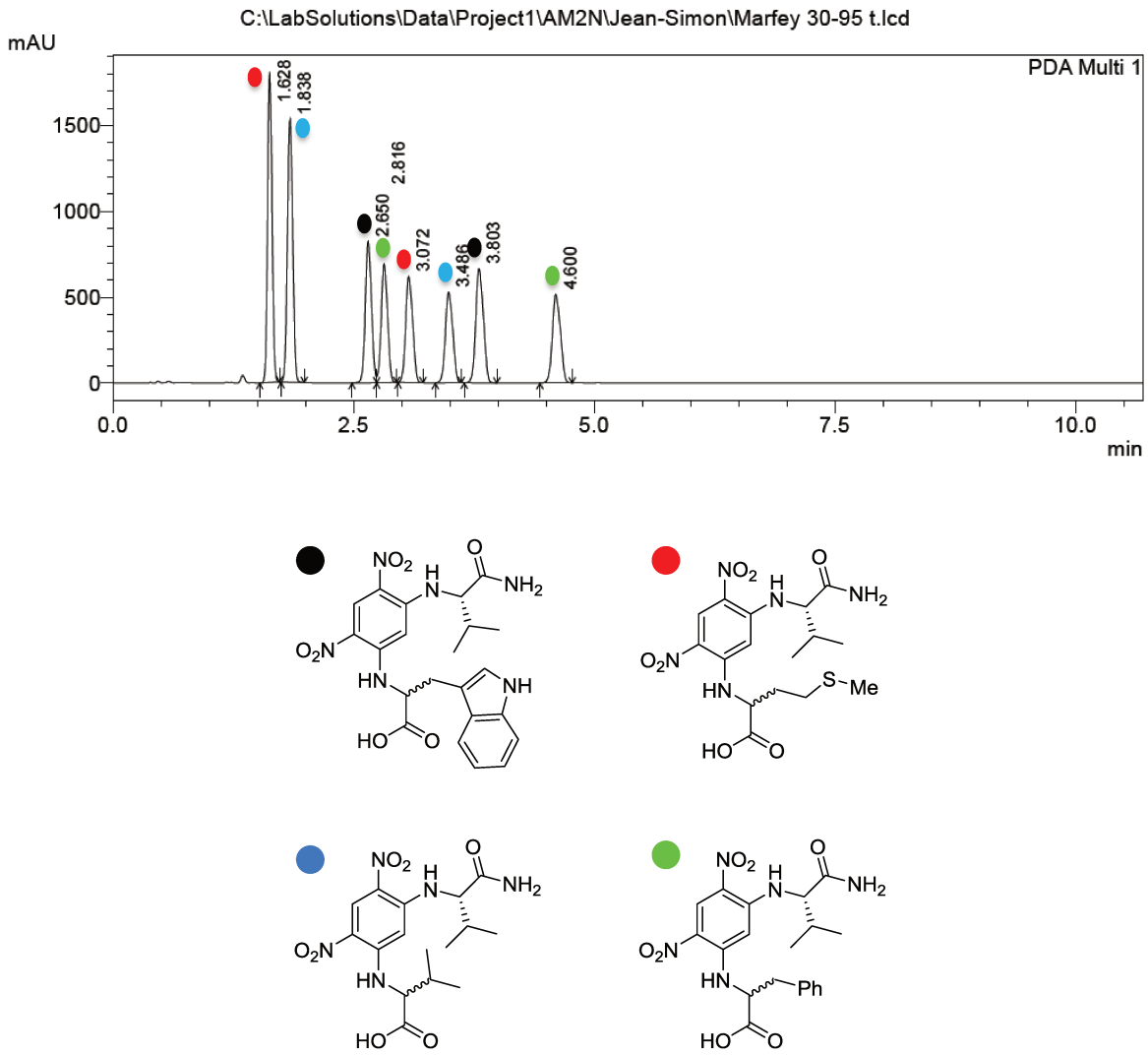


Figure 9 : Séparation des acides α-aminés dérivatisés

Après avoir trouvé les conditions analytiques, nous avons appliqué le protocole de Marfey au tétrapeptide Cbz-Trp-Met-Val-Phe-O*t*Bu. Ce dernier est alors placé dans un mélange acide (6 M HCl) à 110 °C afin de régénérer les acides α-aminés « nus », puis le protocole de dérivatisation décrit précédemment a été appliqué. Malheureusement, lors de l'injection LC/MS du produit brut, un chromatogramme très complexe a été obtenu. En effet, les pics observés sont très mal résolus et nous n'avons pas été en mesure d'interpréter ces résultats.

- <u>Conclusion</u> :

La méthodologie développée a pu être appliquée avec succès à la synthèse d'un tétrapeptide dans le sens naturel (N→C). Cette méthode a pu être comparée à la stratégie « PyBOP ». Les profils LC/MS

semblent montrer un faible taux d'épimérisation au cours du processus réactionnel, mais malheureusement, nos efforts pour essayer de quantifier le taux d'épimérisation par une analyse de type Marfey n'ont pas été concluants.

Il serait par ailleurs intéressant, toujours à titre de comparaison, d'effectuer la synthèse du tétrapeptide dans la direction classique (C→N) en utilisant un agent de couplage classique. De plus, et afin d'obtenir des informations plus précises sur la racémisation, il serait intéressant d'optimiser les conditions opératoires du test de Marfey.

II.1.7 Synthèse à plus grande échelle

Dans le cadre d'une invitation du journal « *Organic Syntheses* », il nous a été proposé de soumettre une procédure de synthèse reproductible à grande échelle.[110] Nous nous sommes alors intéressés à la synthèse du dipeptide Boc-Phe-Ala-OMe sur une échelle d'une dizaine de grammes.

- Préparation de l'alanine activée :

Il est donc nécessaire de préparer l'alanine activée en grande quantité. Pour cela, nous avons employé les conditions initialement développées : le sel d'alanine est alors solubilisé dans un mélange de CH_2Cl_2/THF sur lequel est ajouté 1,00 équivalent de triéthylamine ainsi qu'un excès de CDI (1,50 éq.) (Schéma 117). Alors que sur « petite » quantité, le produit est isolé avec un rendement de 97%, dans ce cas, un rendement de 67% a été obtenu. Ce plus faible rendement peut s'expliquer en partie par l'obtention d'une quantité non-négligeable d'urée symétrique isolée avec un rendement de 23%.

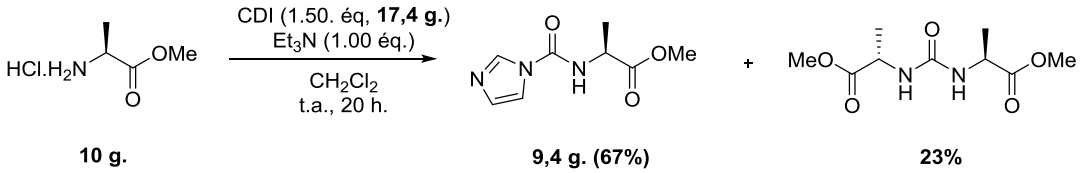


Schéma 117 : Préparation de l'alanine activée

La formation de l'urée lors d'un processus à grande échelle peut être expliquée par des effets thermodynamiques ; une augmentation de la température est observée lorsque la base est ajoutée au milieu réactionnel et pourrait favoriser la double addition de l'alanine sur le CDI.

Afin de limiter ce problème, la réaction a été menée à 0 °C, l'amine et la base, préalablement solubilisées dans le CH_2Cl_2 ont été additionnées au goutte à goutte eu CDI en solution dans le CH_2Cl_2.

[110] J.- S. Suppo, R. Marcia de Figueiredo, J.- M. Campagne, *Org. Synth*. **2015**, *92,* 296-309.

Après l'addition, le milieu réactionnel est placé à température ambiante. Le mélange de triéthylamine et de sel d'alanine n'étant que partiellement soluble dans le solvant utilisé, la diisopropyléthylamine (DIPEA) a été utilisée. La réaction a été menée dans deux conditions différentes ; une première en présence d'un excès de CDI et une seconde où ce dernier est utilisé en quantité stoechiométrique (Schéma 118). En présence d'un excès de CDI, le produit est obtenu avec un rendement de 86%. L'utilisation du CDI en quantité stoechiométrique permet l'obtention du produit désiré avec un rendement de 77%. Il est très intéressant de noter que la limitation de la formation de l'urée a permis de simplifier les conditions de purification sur colonne de silice.

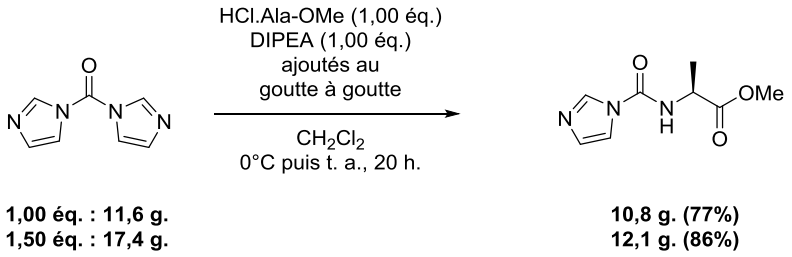


Schéma 118 : Préparation de l'alanine activée

- <u>Synthèse du dipeptide Boc-Phe-Ala-OMe</u> :

La réaction est menée dans les conditions « classiques » précédemment décrites, en présence d'un excès de Boc-Phe-OH, d'une quantité catalytique de $CuBr_2$ et d'HOBt dans le dichlorométhane. À partir de 8 grammes d'alanine activée, une quantité de 12,4 grammes de dipeptide est obtenue, correspondant à un rendement de 87% (Schéma 119).

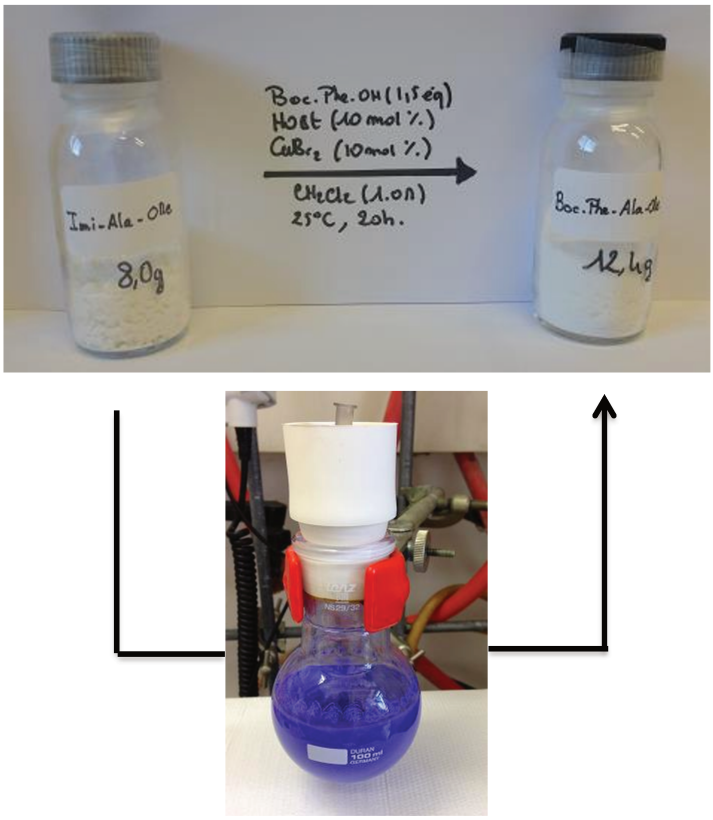


Schéma 119 : Synthèse du dipeptide

L'un des aspects importants de la synthèse organique sur grande échelle est l'étape de purification. Cette étape peut très rapidement être la source de nombreux problèmes, et rendre inintéressante une méthodologie prometteuse à petite échelle.

Dans notre cas, le produit est purifié par une simple filtration sur colonne de silice afin d'éliminer les traces de cuivre résiduelles. En effet, un lavage acide permet d'éliminer l'imidazole et les traces d'alanine activée n'ayant pas réagi et un lavage basique permet d'éliminer l'excès de Boc-Phe-OH. La réaction est très propre comme en témoignent les spectres RMN ^{1}H des produits bruts et purifiés (Figure 10 et 10).

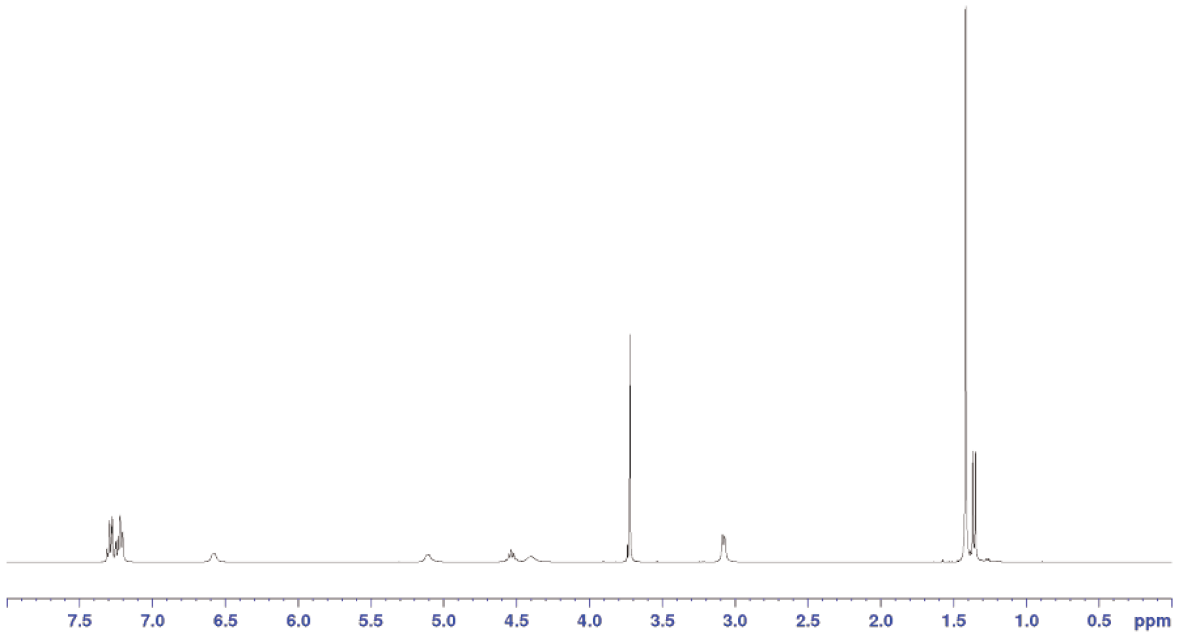


Figure 10 : RMN ^{1}H Boc-Phe-Ala-OMe Brut

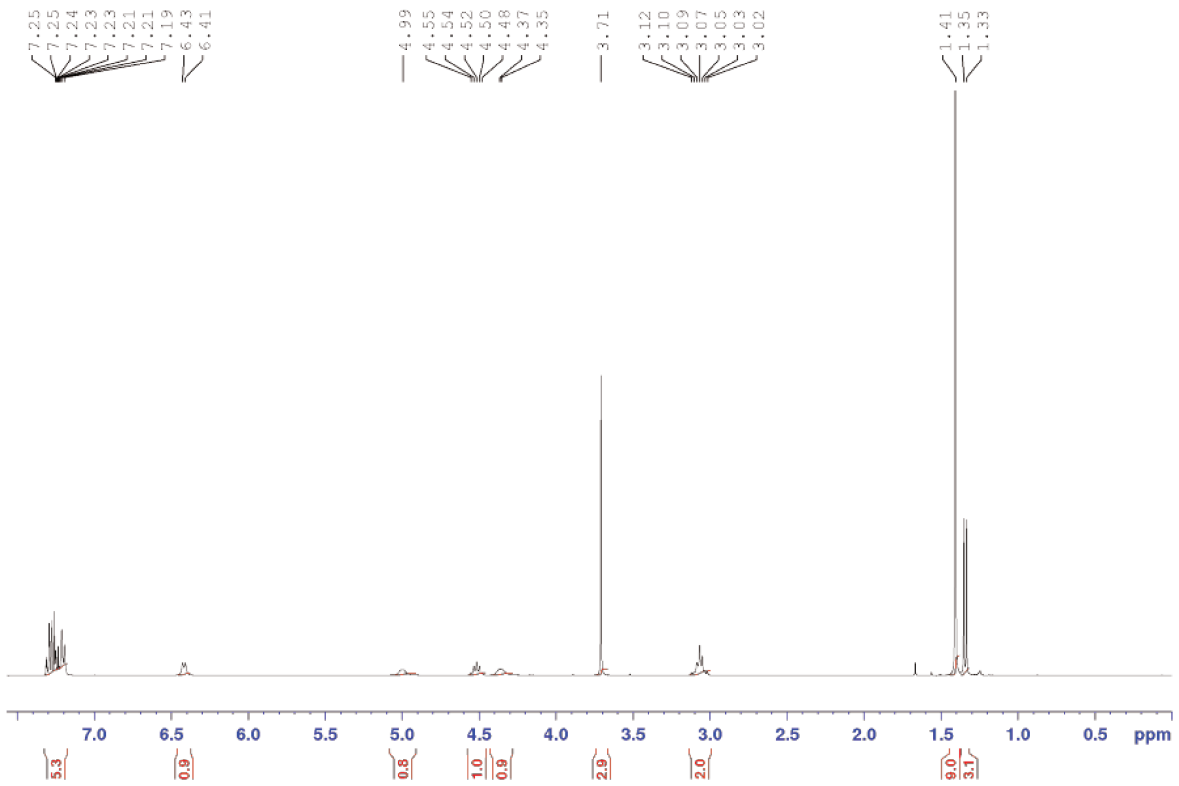


Figure 11 : RMN ^{1}H Boc-Phe-Ala-OMe Purifié

- Aspect économique :

La synthèse sur grande échelle implique également des coûts financiers importants. À ce titre, nous avons évalué le coût de notre synthèse en se basant sur les prix actuels proposés chez le fournisseur Sigma Aldrich. En guise de comparaison, nous avons également estimé le prix de la même synthèse en utilisant un agent de couplage classique, en admettant que : 1) ce dernier soit utilisé en quantité stoechiométrique, 2) le rendement obtenu soit quantitatif et sans prendre en compte, le prix de l'excès de base généralement utilisé.

Les résultats comparatifs sont représentés sur le tableau ci-dessous (Tableau 9). Le coût des réactifs pour notre synthèse est de 28 €, soit en moyenne 10 fois moins cher que via l'utilisation d'un agent de couplage peptidique classique. Cependant, notre méthodologie nécessite deux étapes avant d'obtenir le produit désiré.

Entrée	Réactifs	Masse à utiliser	Prix
1	**CDI**	**8,6 grammes**	**23 €**
	HOBt	**549 milligrammes**	**1 €**
	$CuBr_2$	**947 milligrammes**	**4 €**
2	PyBOP	18,8 grammes	252 €[a]
3	EDCI	6,8 grammes	201 €[b]
4	HATU	13,3 grammes	451 €[c]

Basé sur des pots de 25 grammes, [a] pureté >98%, [b] pureté >99%, [c] pureté >98%

Tableau 9 : Comparatif des prix des agents de couplages

Cette méthodologie pourrait s'avérer très efficace pour la synthèse de dipeptides à grande échelle. Le protocole est facile à mettre en œuvre et les produits sont obtenus avec de bons rendements et une purification très aisée. De plus, le coût des réactifs nécessaires à la réaction est faible par comparaison aux agents de couplages classiques.

Après avoir étudié la réactivité des amines activées pour la synthèse de dipeptides, tripeptides et tétrapeptide via une stratégie pas à pas, nous nous sommes intéressés à leur utilisation pour des réactions de couplage par fragments.

II.1.8 Essais de couplages par fragments

Nous avons pu remarquer au cours des différents chapitres que le « meilleur ennemi » de la synthèse peptidique était la racémisation. Parmi les conséquences de ce phénomène ; l'incapacité à effectuer des couplages par fragments (et donc la synthèse de peptides cycliques) sans racémisation (Schéma 120). En effet, l'activation de l'acide terminal peut conduire à la formation d'une oxazolone potentiellement épimérisable, l'ouverture de l'oxazolone par l'amine de second fragment conduirait à l'obtention d'un peptide épimérisé.

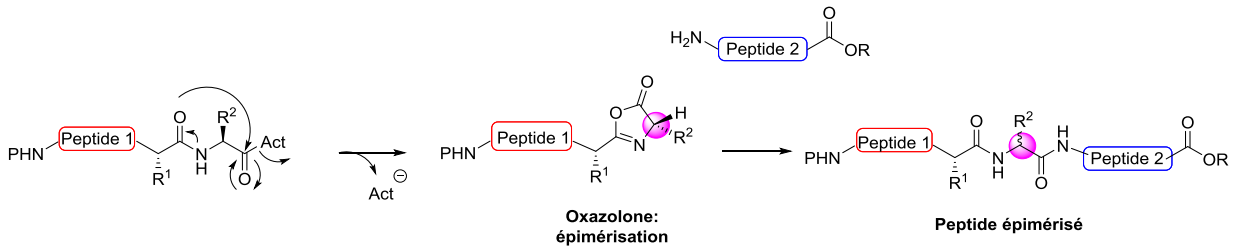


Schéma 120 : Couplages par fragments

Nous avons alors souhaité appliquer notre méthodologie, peu racémisante, aux couplages par fragments. Il est donc nécessaire, dans un premier temps d'activer l'amine d'un premier fragment et d'en étudier la réactivité avec un second fragment. Nous avons commencé cette étude en s'intéressant à l'activation du plus petit fragment qui soit, un dipeptide.

Afin d'éviter la formation potentielle d'une dicétopipérazine (DKP), courante avec ce type de dérivés, le substrat modèle choisi pour cette étude est le composé TFA.H_2N-Leu-Phe-NH_2. Ce dernier a été placé dans les conditions initialement décrites d'activation de l'amine; en présence d'un excès de CDI (1,50 éq.) et d'une quantité stoechiométrique de base pendant 20 heures à température ambiante. Nous avons eu la mauvaise surprise de constater la formation avec un très bon rendement d'une hydantoïne. Ce produit semble provenir de la cyclisation directe de l'amine activée (Schéma 121).

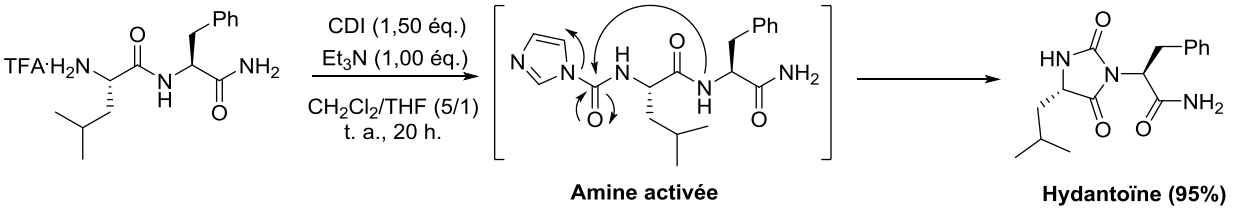


Schéma 121 : Formation d'une hydantoïne

Suite à ce résultat, et afin de vérifier s'il s'agissait d'un cas particulier, un autre dipeptide (TFA.H_2N-Asp(Bn)-Val-OMe) a été préparé et engagé à son tour dans l'étape d'activation (Schéma 122). Dans ce cas encore, l'hydantoïne correspondante est isolée avec un rendement de 94%. Notons qu'aucune trace de dicétopipérazine n'a été observée.

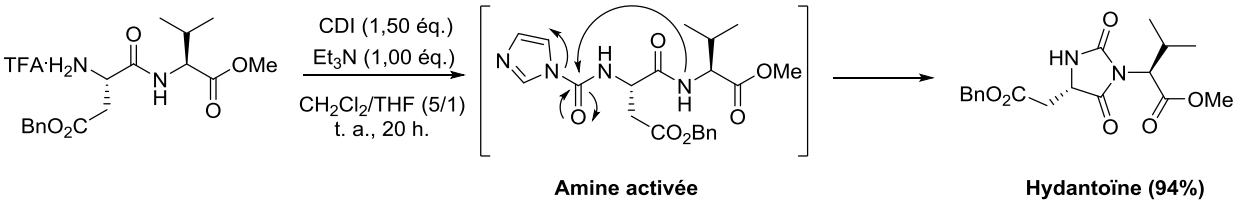


Schéma 122 : Formation d'une hydantoïne

Après une brève recherche bibliographique, nous avons pu constater qu'en effet, le CDI était l'un des réactifs de choix pour la synthèse d'hydantoïnes.[111] Cependant, nous nous sommes par la suite demandés s'il était possible d'éviter la formation de l'hydantoïne en diminuant le temps de réaction et en menant la réaction en l'absence de base. En effet, lorsque le sel de TFA du dipeptide H_2N-Phe-Ala-OMe est mis en présence d'un léger excès de CDI (1,30 éq.) pendant 2 heures, l'amine activée correspondante est obtenue avec un rendement de 64%.

[111] D. Zhang, X. Xing, G. D. Cuny, *J. Org. Chem*. **2006**, 71, 1750-1753.

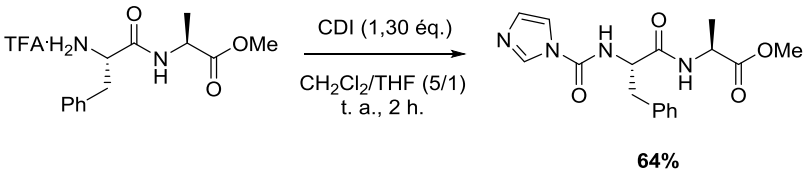


Schéma 123 : Synthèse de l'amine activée

NB : Cette réaction a été reproduite plusieurs fois et des rendements très inférieurs ont été obtenus.

Après avoir obtenu ce composé, nous l'avons engagé dans un couplage par fragments suivant les conditions optimales de la réaction ; l'amine activée a été mise à réagir avec le dipeptide Cbz-Ala-(D)-Phe-OH (1,50 éq.) en présence d'HOBt (10 mol%) et de $CuBr_2$ (10 mol%) dans le CH_2Cl_2 pendant 20 heures (Schéma 124). Dans ces conditions, une fois de plus, l'hydantoïne correspondante est obtenue avec un excellent rendement de 96% et aucun produit de couplage n'est observé. Ces résultats semblent indiquer, sans surprise, que la réaction de cyclisation est plus rapide que l'addition du carboxylate sur l'amine activée.

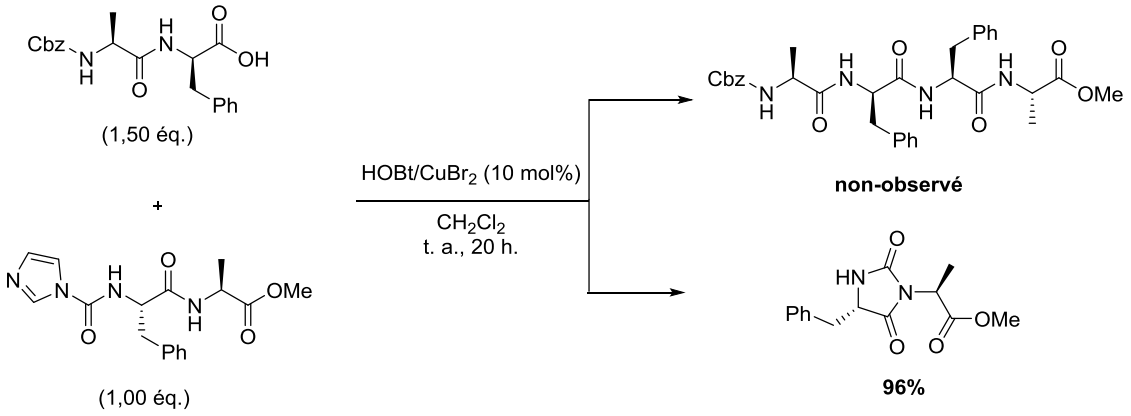


Schéma 124 : Test de couplage par fragments

La réaction de cyclisation conduisant à la formation de l'hydantoïne semble difficile à éviter. Cependant, il serait intéressant d'étudier cette même réaction en présence d'un amide tertiaire sur l'acide α-aminé situé « à côté » de l'amine activée. Nous pouvons en effet penser que dans ce cas, la réaction de cyclisation serait défavorisée, car elle conduirait à un composé théoriquement instable. Cet amide tertiaire pourrait provenir d'un acide α-aminé secondaire (proline, *N*-Me acide α-aminé) ou d'un auxiliaire pouvant être éliminé après la réaction.

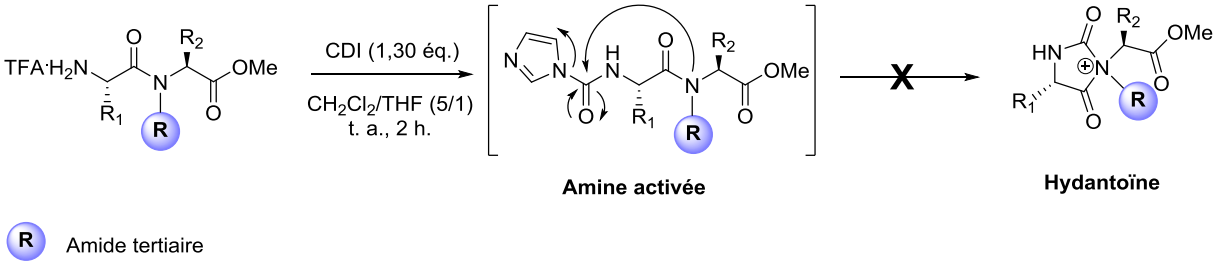


Schéma 125 : Perspectives

II.1.9 Développement d'une réaction monotope

L'un des inconvénients liés à notre méthodologie, comparativement aux méthodes classiques, réside en le fait que deux étapes sont nécessaires pour obtenir le produit de couplage ; une première étape d'activation de l'amine et la réaction de couplage elle-même. Pour cette raison, nous avons envisagé le développement de notre méthodologie de manière monotope. La réaction modèle choisie pour cette étude est la synthèse du dipeptide Boc-Phe-Ala-OMe. Pour ce faire, nous avons dans un premier temps contrôlé la cinétique de formation de l'alanine activée dans les conditions initiale. Lorsque que le sel d'alanine est mis à réagir avec un équivalent de CDI et un équivalent de triéthylamine, nous avons pu constater la disparition totale du CDI au bout de deux heures de réaction dans le dichlorométhane à température ambiante. C'est ensuite qu'un excès de Boc-Phe-OH a été ajouté au milieu réactionnel permettant, après 20 heures, d'isoler le dipeptide correspondant avec un très faible rendement de 7% (Schéma 126).

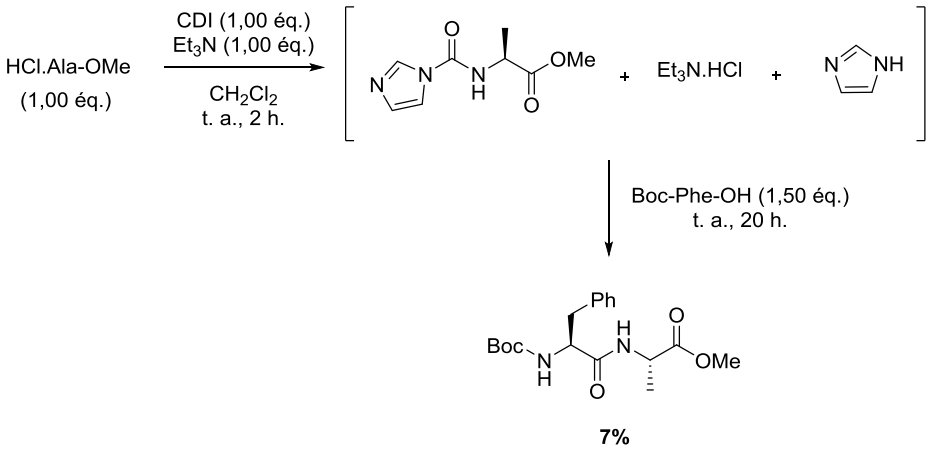


Schéma 126 : Premier essai en présence de triéthylamine

Ce résultat semble être en accord avec ceux obtenus précédemment (Schéma 127). En effet, nous avions pu remarquer l'échec de la réaction lorsqu'elle était menée en présence d'un équivalent de base (par rapport à l'acide). Nous pouvons donc penser, pour la réaction monotope, que l'alanine activée est obtenue en mélange avec un sel de triéthylamine et un équivalent d'imidazole. Ce dernier pouvant jour le rôle de base et plaçant ainsi la réaction dans les conditions décrites ci-dessous (Schéma 127).

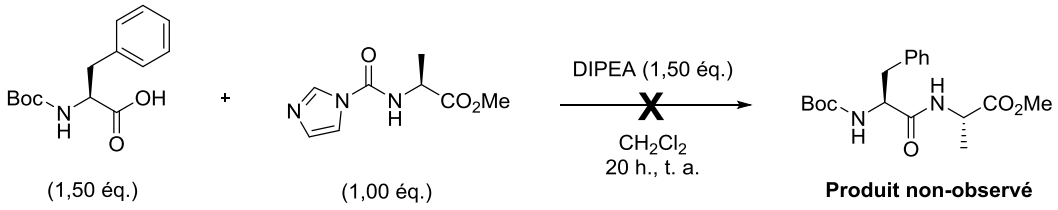
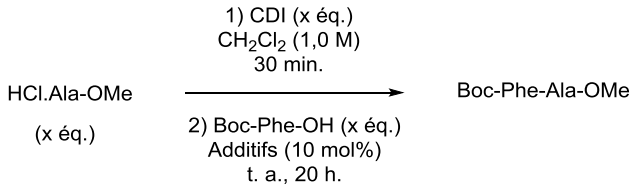


Schéma 127 : Réaction en présence de base

Ces considérations nous ont donc menés à effectuer la réaction d'activation de l'amine en l'absence de triéthylamine. La première interrogation était de savoir si le sel d'alanine était réactif vis-à-vis du CDI. Pour ce faire, seul le sel d'alanine et un équivalent de CDI ont été mis à réagir dans le dichlorométhane et après 30 minutes de réaction, nous avons pu constater la disparition totale du CDI laissant place à la formation de l'alanine activée. De plus, au cours de cette réaction, la formation d'un précipité a été observée. Après analyse RMN, ce composé a été identifié comme étant le sel de chlorure d'imidazolium. Il est très intéressant de noter que la formation de ce précipité pourrait représenter un moyen de suivi visuel de la réaction. Notons cependant que ce précipité n'est pas observé pour toutes les amines activées.

Figure 12 : Précipitation du sel d'imidazolium dans le cas de l'alanine

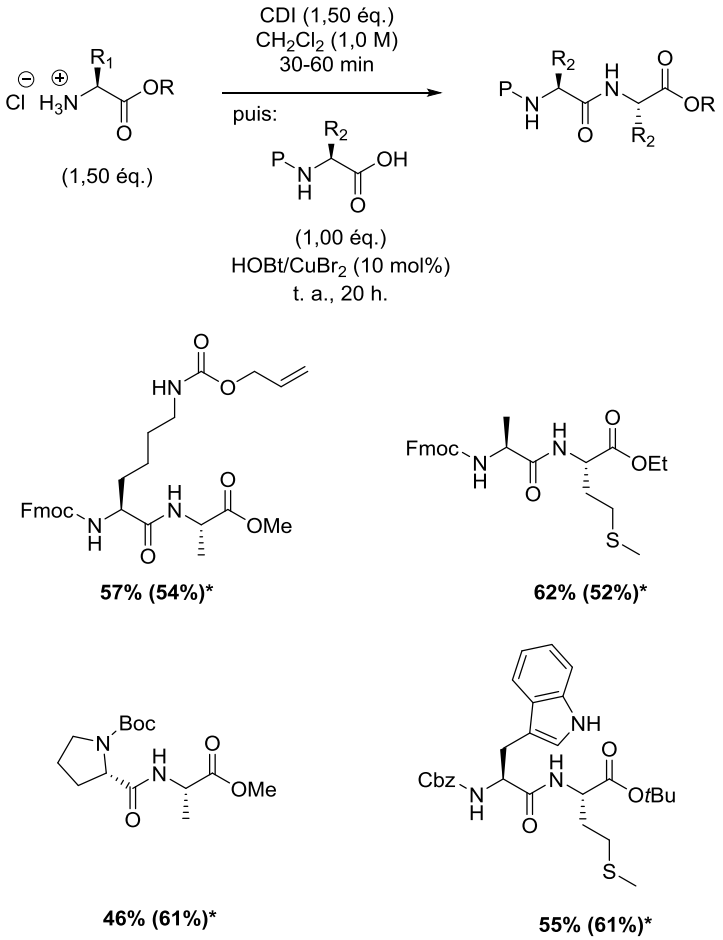
Après avoir constaté qu'il était possible de synthétiser l'alanine activée en l'absence de base, différents essais ont pu être réalisés pour effectuer la réaction de façon monotope. Dans un premier temps, le sel d'alanine (1,00 éq.) a été mis à réagir dans le CH_2Cl_2 avec le CDI (1,00 éq.) pendant 30 minutes. Lorsque le CDI est totalement consommé, la Boc-Phe-OH a été ajoutée au milieu réactionnel et a permis, après 20 heures de réaction, d'isoler le dipeptide souhaité avec un rendement de 53% (Entrée 1). Suite à ce premier résultat encourageant, nous nous sommes placés directement dans les conditions optimales de la réaction en présence d'une quantité catalytique d'HOBt (10 mol%) et de $CuBr_2$ (10 mol%). Le dipeptide a alors pu être isolé avec un rendement de 65% (Entrée 2). Considérant que la réaction de formation de l'alanine activée n'était pas totale, la stoechiométrie des réactifs a alors été modifiée. Si le sel d'alanine et le CDI sont utilisés en excès (1,50 éq.), le composé final est obtenu avec un très bon rendement de 87% (Entrée 3).



Entrée	HCl.Ala-OMe	CDI	Boc-Phe-OH	Additifs	Rendement
1	1,00 éq.	1,00 éq.	1,50 éq.	-	53%
2	1,00 éq.	1,00 éq.	1,50 éq.	HOBt/$CuBr_2$ (10 mol%)	65%
3	**1,50 éq.**	**1,50 éq.**	**1,00 éq.**	**HOBt/$CuBr_2$ (10 mol%)**	**87%**

Schéma 128 : Essais de la réaction monotope

Avec ces conditions, la synthèse de quelques dipeptides a été réalisée. Nous nous sommes plus particulièrement penchés sur les dipeptides étant obtenus avec des rendements modérés via la méthodologie en deux étapes. Les résultats sont résumés ci-dessous (Schéma 129), la valeur entre parenthèses est donnée à titre indicatif ; elle représente le rendement obtenu lorsque la réaction est menée directement à partir de l'amine activée (travail précédent). Alors que dans le travail précédent, deux étapes étaient nécessaires pour obtenir le dipeptide final, nous pouvons remarquer que la réaction monotope permet d'isoler les dipeptides avec des rendements similaires, ce qui représente une amélioration notable dans le cadre de ce travail.



*Entre parenthèses: rendement de couplage obtenu par la stratégie en deux étapes

Schéma 129 : Dipeptides synthétisés via la stratégie monotope

Par mesure de précaution, il serait cependant intéressant d'évaluer l'efficacité de la réaction monotope quant à la racémisation.

Après avoir appliqué cette méthodologie en phase homogène, nous nous sommes intéressés à sa transposition en support solide. La synthèse sur support solide (SPPS) est aujourd'hui la méthode de choix pour la synthèse de gros peptides.

Dans ce paragraphe, sera traité de manière succincte le principe de la synthèse sur support solide, nous aborderons par la suite les résultats obtenus dans ce domaine.

II.1.10 La synthèse sur support solide (SPPS)

II.1.10.1 Introduction et principes de la synthèse sur support solide

L'introduction de la synthèse en phase solide a révolutionné la synthèse peptidique. En 1963, Merrifield eut la brillante idée d'ancrer un premier acide α-aminé sur une matrice de polymère insoluble.[12] Le protocole de synthèse pas à pas, jusqu'ici développé en phase homogène, pouvait ensuite être appliqué.

Le premier avantage de la synthèse peptidique en phase solide est lié au fait que le composé d'intérêt, est ancré sur une phase solide insoluble. Ainsi, en guise de purification, un simple lavage et une filtration sont effectués et permettent d'éliminer les réactifs restés en solution. À l'inverse, en phase homogène, des étapes de purification plus fastidieuses et chronophages auraient été nécessaires. De façon plus concrète, les réactions supportées s'effectuent dans un réacteur muni d'un fritté chargé de « billes » de résine (Figure 13). La synthèse se décompose en une succession de déprotections, de lavages et de couplages peptidiques pour faire croitre le peptide désiré. Après avoir ancré le premier acide α-aminé sur la résine, la fonction amine est déprotégée, puis une filtration permet d'éliminer les excès de réactifs. Un second acide α-aminé est alors ajouté et après le couplage, une nouvelle séquence de lavages et filtrations permet d'obtenir la bille de polymère sur laquelle est ancrée, à ce stade, un dipeptide. Un nouveau cycle de couplage peut alors recommencer jusqu'à l'obtention du composé final désiré.

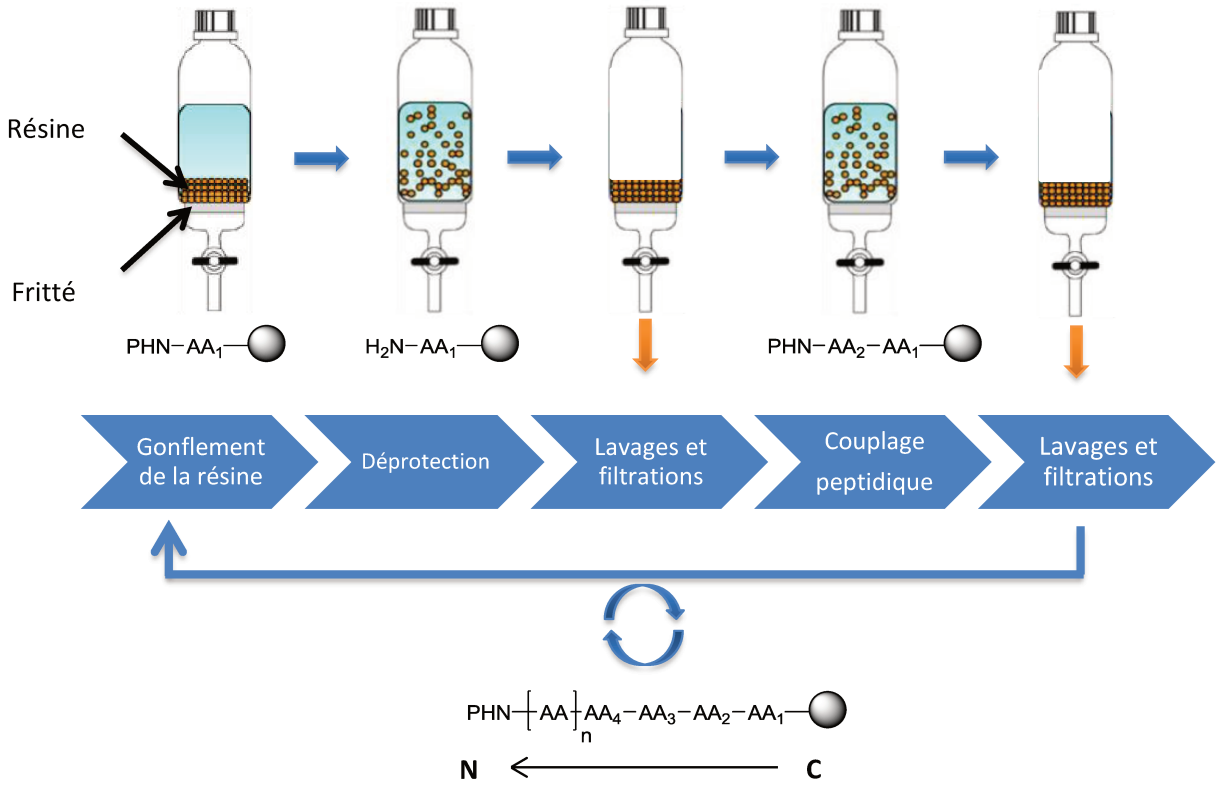


Figure 13 : Principe de la synthèse sur support solide (C→N)

Le second avantage, qui découle du premier, réside dans le fait qu'il n'est pas dérangeant d'utiliser de larges excès de réactifs, ces derniers étant très facilement éliminés via l'étape de lavage et filtration. Il est important de préciser qu'en synthèse peptidique sur support solide, il convient de « raisonner » en tant que « chimiste peptidiste » et non en tant que « chimiste organicien ». En effet, il n'est pas choquant d'utiliser de larges excès de réactifs, ou de répéter plusieurs fois le même couplage. Pour des raisons de simplicité de purification finale, le but est, dans l'idéal, de n'obtenir que le peptide souhaité. Il est donc nécessaire qu'un rendement proche de 100% soit obtenu lors de chaque réaction (Schéma 130). En effet, si à chaque étape la réaction n'est pas totale, le peptide n'ayant pas réagi pourrait réagir après d'un cycle de couplage suivant, menant à un mélange de produits difficilement séparable lors de l'étape de clivage. Ce type de produits secondaires est appelé peptides de délétion, il est cependant possible d'effectuer une étape de « capping »permettant de bloquer l'éventuelle fonction amine n'ayant pas réagit.

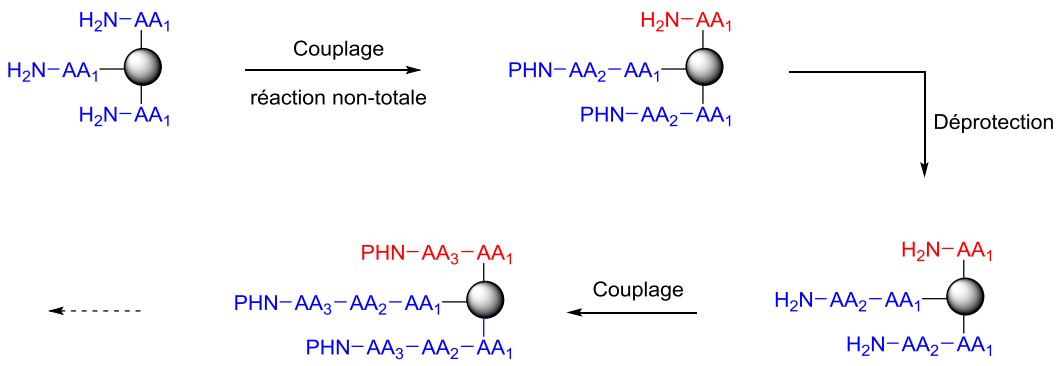


Schéma 130 : Formation des peptides de délétion

II.1.10.2 Les stratégies utilisées en synthèse sur support solide

D'un point de vue stratégie de synthèse, les groupements protecteurs temporaires et semi-permanents utilisés doivent être judicieusement choisis. Nous pouvons définir un groupement protecteur temporaire comme étant le groupement protecteur de la fonction amine *N*-terminale et les groupements protecteurs semi-permanents comme étant les groupements protecteurs des fonctions présentes sur la chaîne latérale.[112]

La stratégie la plus répandue aujourd'hui est la stratégie Fmoc/*t*Bu (Schéma 131). Cette méthode implique le Fmoc comme étant le groupement protecteur de l'amine *N*-terminale. Chaque fonction présente sur la chaîne latérale est alors protégée sous forme *t*Bu. La labilité du groupement Fmoc dans des conditions basiques bien précises permet de déprotéger la chaîne principale sélectivement. La déprotection des chaînes latérales et le clivage sont ensuite effectués, suivant différentes conditions en fonction de la résine utilisée.

[112] M. Amblard, J. – A. Fehrentz, J. Martinez, G. Subra, *Mol. Biotechnol*. **2006**, 33, 239-254.

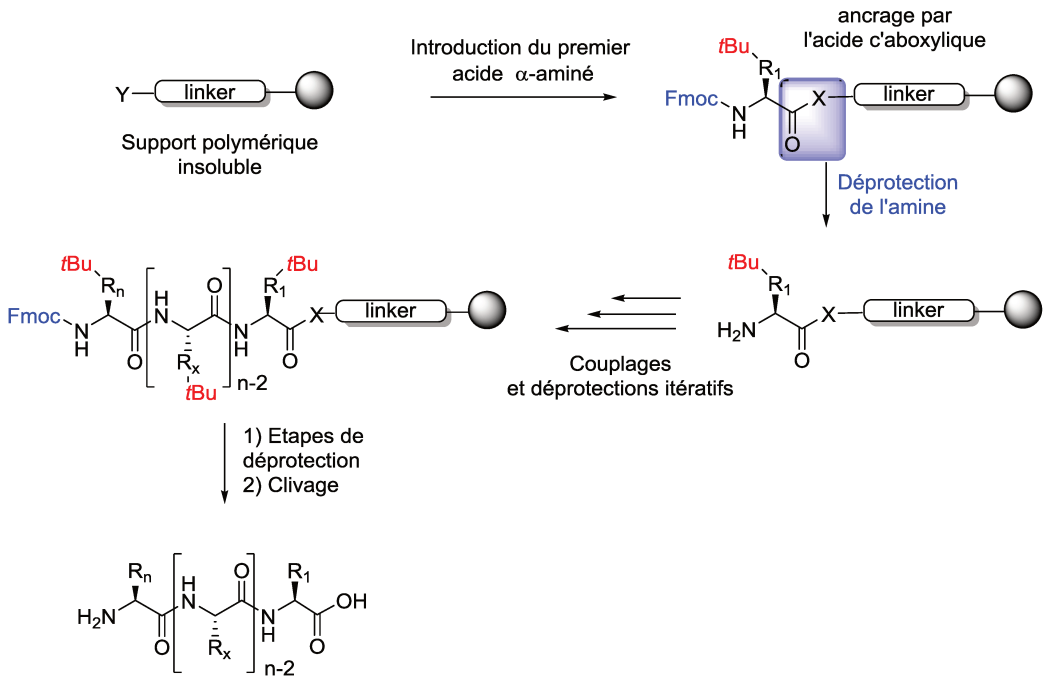
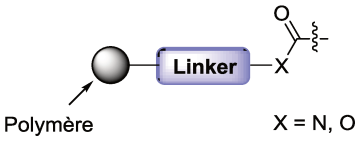


Schéma 131 : Stratégie Fmoc/*t*Bu dans le sens C→N

II.1.10.3 Le support solide, les résines



Le terme de support solide sous-entend l'association « matrice polymérique/linker ». Parmi les différents types de matrices polymériques (polyamide, polyéthylène glycol) ont été développées, la plus répandue étant la matrice de type polystyrène. Cette matrice polymérique est alors liée de manière covalente à un « linker », qui à son tour sera lié au premier acide α-aminé.

Généralement, la charge d'une résine (ou loading) est comprise entre 0,3 et 1,3 mmol/g, c'est-à-dire qu'il est possible, en théorie, d'ancrer entre 0,3 et 1,3 mmol de composé pour 1 gramme de résine donnée.

Il est très important de préciser que le linker n'est pas situé à la surface de la bille polymérique. En effet, cette dernière étant poreuse, le linker se situe « à l'intérieur » de la bille. Pour cette raison, le solvant utilisé pour la synthèse doit permettre le gonflement de la bille afin de favoriser l'accès des réactifs au site réactionnel. En d'autres termes, nous pouvons considérer la paire « solvant/support solide » comme étant le solvant de la réaction. À titre d'exemple, un bon solvant pour un couplage en phase homogène peut se révéler inefficace en support solide s'il rétracte les billes. Les solvants couramment utilisés sont le CH_2Cl_2 et le DMF, alors que le méthanol et l'eau, ont pour conséquence de « rétracter » la bille.

La nature des « linkers » est également très importante, elle offre les différentes conditions de clivage. Ainsi, un clivage peut avoir lieu en présence d'acide fluorhydrique pour une résine donnée, et en présence d'acide acétique pour une autre. Quelques résines couramment utilisées sont représentées ci-dessous (Figure 14).

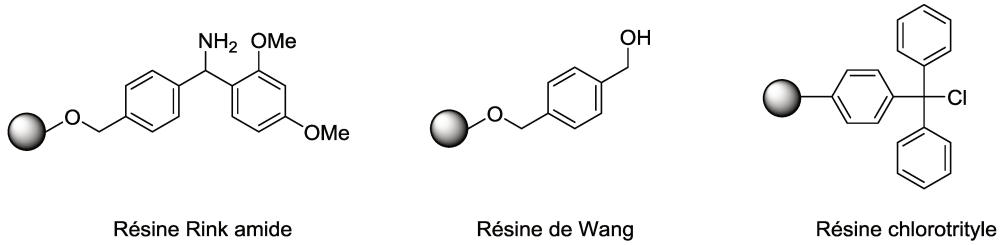


Figure 14 : Résines commercialisées

Ces stratégies de synthèse (résines, conditions de clivage…) ont été développées pour des synthèses s'effectuant dans la direction C→N. C'est aujourd'hui la méthode de choix pour l'élongation d'un peptide, en raison du gain de temps engendré et de sa simplicité de mise en œuvre.

Or, la stratégie de synthèse que nous proposons se déroule dans le sens naturel (N→C), il est donc nécessaire de repenser la stratégie de synthèse. Il est, dans un premier temps, primordial de trouver un support solide sur lequel nous pourrions ancrer le premier acide α-aminé par la fonction amine. Une fois celui-ci trouvé, il s'agit de pouvoir déprotéger l'acide carboxylique *C*-terminal sans cliver le peptide du support (Schéma 132).[113]

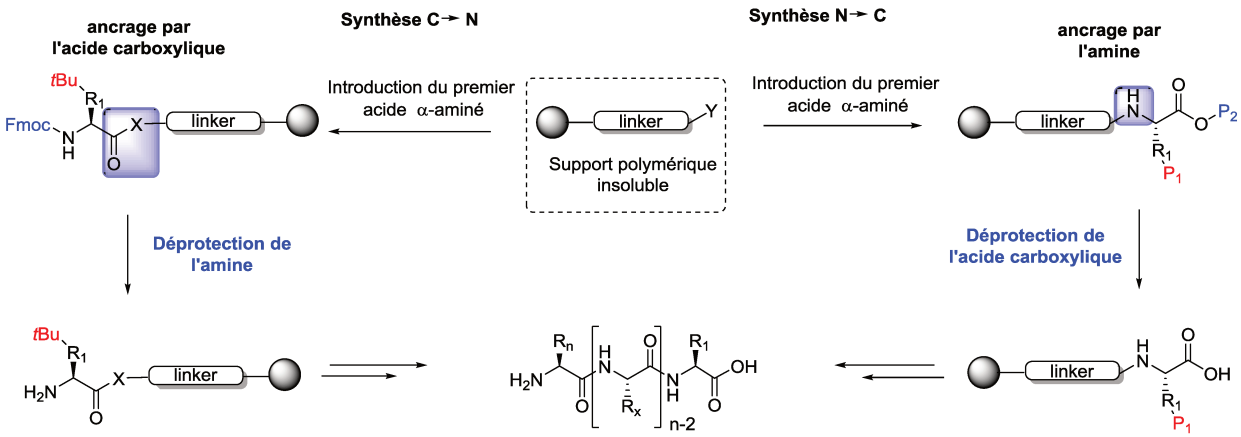


Schéma 132 : SPPS : C→N *vs.* N→C

[113] N. Thieriet , F. Guibé ,- F. Albericio, *Org. Lett*. **2000**, 2, 1815-1817.

II.1.10.4 Résultats obtenus

Pour appliquer la méthodologie développée précédemment en phase homogène, nous avons dans un premier temps envisagé une stratégie consistant à utiliser des acides α-aminés protégés par un groupement allyle en position *C*-terminale. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Professeur Gilles Subra de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) et une partie des travaux présentés ont été réalisés par Douae Boukhriss (stagiaire de master 2).

II.1.10.5 Stratégie O-Allyle, résine pipécolique

Récemment, l'équipe de Gilles Subra a développé un linker permettant l'immobilisation de différents nucléophiles (amines, anilines, alcools…) sur support solide.[114] Ce « linker » pipécolique, clivable en milieu acide (TFA), nous a alors semblé être compatible avec une stratégie O-Allyle. La déprotection de l'acide carboxylique allylé, en présence de palladium(0) et de phénylsilane, devrait etre compatible avec la résine pipécolique ;

II.1.10.5.1 Préparation de la résine pipécolique

À partir d'une résine aminométhyle, le « linker » pipécolique a été préparé directement sur le support solide (Schéma 133). Pour ce faire, l'acide cyclohexane 1,4 dicarboxylique est préactivé au DIC pendant 10 minutes, l'ajout de la résine aminométhyle polystyrène permet l'immobilisation de ce dernier sur le support (**182**). L'acide pipécolique (**183**) est à son tour ancré via une réaction de couplage en présence de PyBOP, cette réaction est répétée deux fois et conduit à l'intermédiaire (**184**). Une dernière étape de saponification par la lithine à 40 °C permet l'obtention de la résine pipécolique.

[114] P. Zajdel, G. Nomezine, N. Masurier, M. Amblard, M. Pawłowski, J. Martinez, G. Subra, *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 7547-7553.

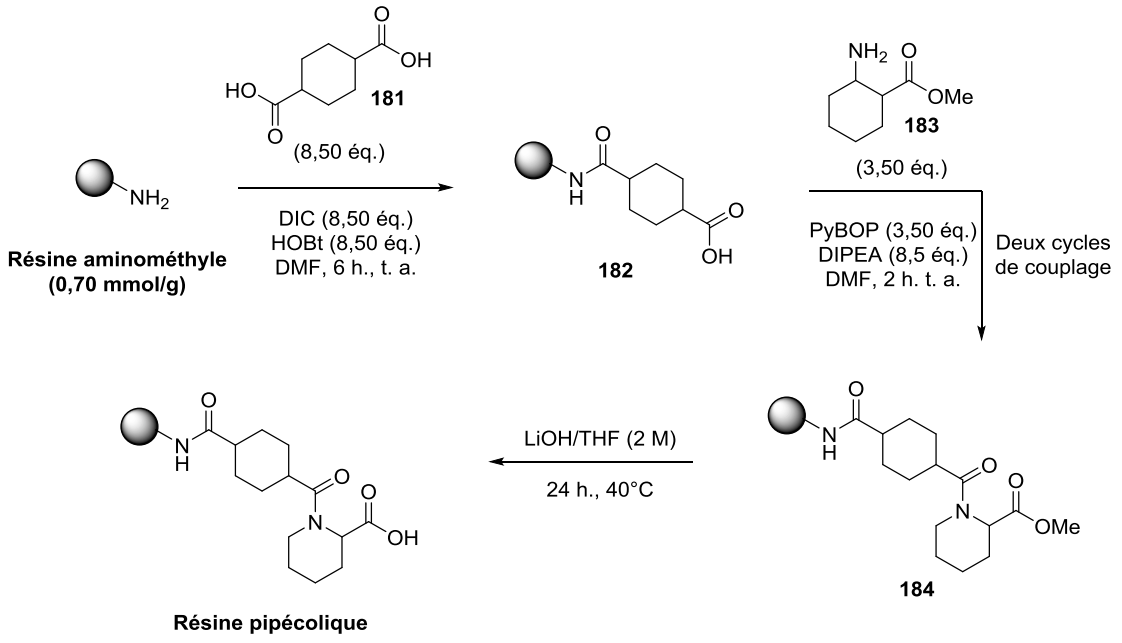


Schéma 133 : Préparation de la résine pipécolique

II.1.10.5.2 Dosage de la résine

Après la fixation du « linker » sur la résine, il est nécessaire de la « doser ». Il est en effet essentiel de connaitre la quantité de sites réactifs présents sur la résine. La méthode classique pour ce dosage consiste à ancrer un premier acide α-aminé dont la chaîne latérale est protégée par un groupement Fmoc, puis de déprotéger la chaîne latérale par la pipéridine afin de doser, par spectrophotométrie, l'adduit de Fmoc (dibenzofulvène) sur lequel s'est additionné la pipéridine.

Pour ce faire, nous avons immobilisé le dérivé lysine sur la résine pipécolique via un couplage peptidique au PyBOP. Ce couplage est répété deux fois afin de s'assurer que l'ancrage soit total (Schéma 134). Une quantité très précise de résine est alors déprotégée par un mélange DMF/pipéridine, puis le dosage peut être effectué. Cette expérience a été effectuée trois fois afin d'obtenir des résultats répétables et a permis d'indiquer un « loading » de 0,44 mmol/g.

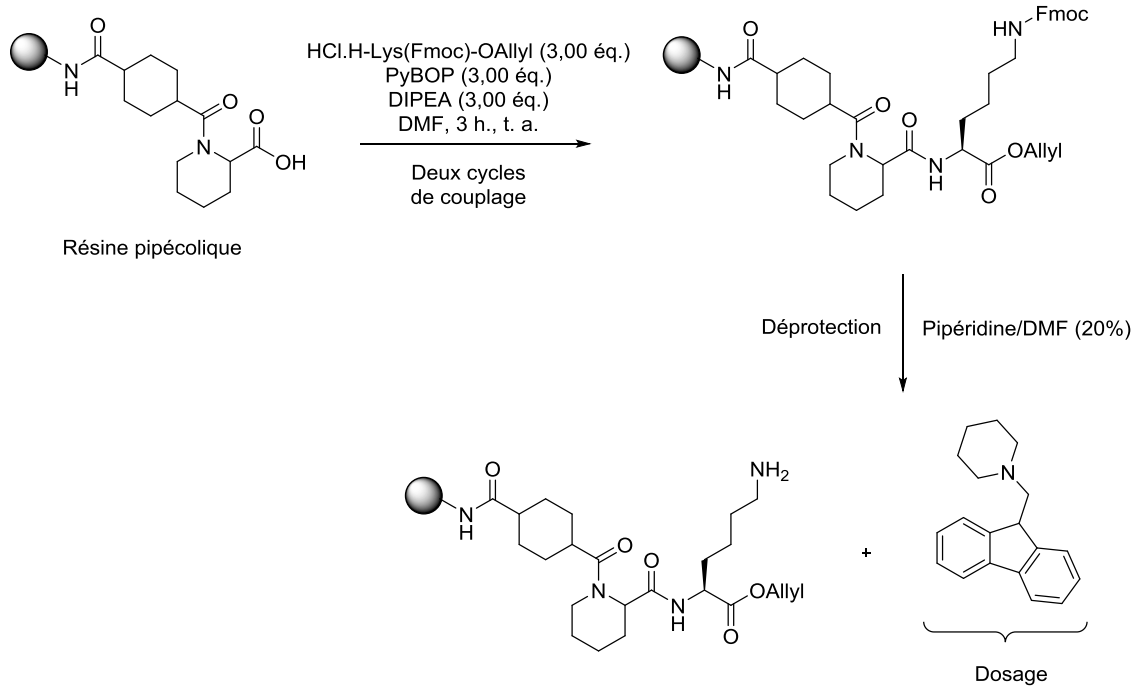


Schéma 134 : Dosage de la résine pipécolique

Nous pouvons noter que le « loading » de la résine pipécolique (0,44 mmol/g) est inférieure au loading de la résine aminométhyle (0,71 mmol/g) de départ. Cette différence peut être expliquée par le phénomène d'incrémentation de masse.

II.1.10.5.3 Essais de couplage

Après l'avoir synthétisée, cette résine a été testée à travers la stratégie NIPS. Nous avons, dans un premier temps, décidé d'étudier chaque étape de la synthèse d'un tétrapeptide. Pour ce faire, l'idée est d'effectuer un micro-clivage après chaque étape et d'analyser par LC/MS l'évolution de la réaction.
Après avoir ancré le résidu HCl.H-Lys(Fmoc)-OAllyl, une étape de déprotection de l'ester allylique dans des conditions classiques ($Pd(PPh_3)_4$, phénylsilane) puis un micro-clivage ont été effectués. Alors que nous nous attendions à observer par LC/MS la lysine déprotégée, un produit très largement majoritaire correspondant à la lysine décarboxylée a été obtenu (Schéma 135).

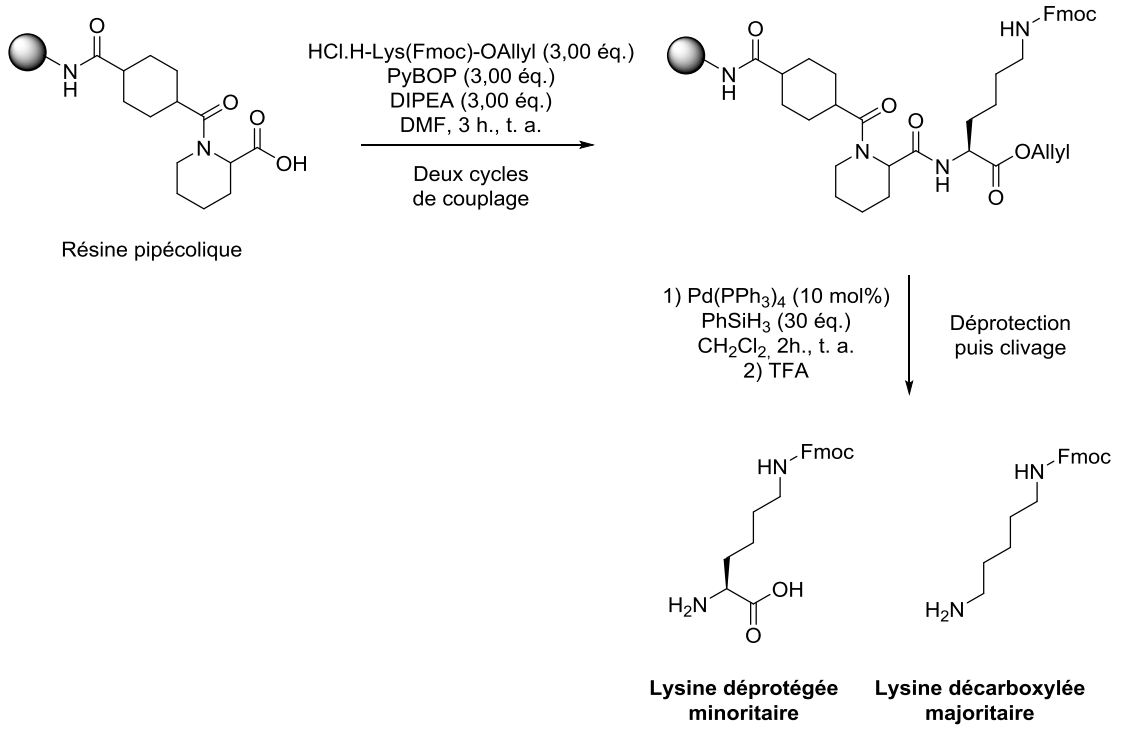
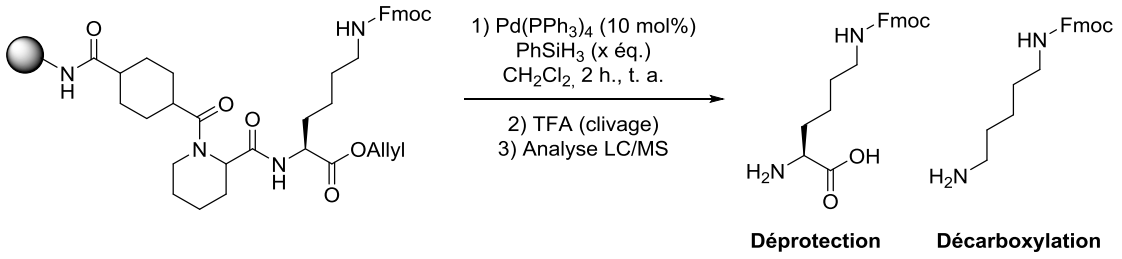


Schéma 135 : Déprotection de l'ester allylique

Suite à ce résultat très surprenant, différentes conditions réactionnelles ont été testées et ont toutes menées très majoritairement à la réaction de décarboxylation (Tableau 10).

En effet, ni la température, ni la stoechiométrie et la nature des réactifs, ni le temps de réaction n'ont permis d'observer la lysine déprotégée.



Entrée	$Pd(PPh_3)_4$	$PhSiH_3$	Dimédone	Temps	Température	Résultat
1	10 mol%	30 éq.	-	2 h.	t. a.	Décarboxylation
2	10 mol%	30 éq.	-	2 h.	50 °C	Décarboxylation
3	1,00 éq.	30 éq.	-	2 h.	t. a.	Décarboxylation
4	10 mol%	10 éq.	-	2 h.	t. a.	Décarboxylation
5	10 mol%	-	10 éq.	2 h.	t. a.	Décarboxylation
6	10 mol%	30 éq.	-	1 h.	t. a.	Décarboxylation

Tableau 10 : Décarboxylation de l'ester allylique

Dans le but de déterminer si cette réaction de décarboxylation est liée à une éventuelle proximité très spécifique de l'ester allylique au linker pipécolique, nous avons envisagé « d'éloigner » l'ester allylique du linker pipécolique (Schéma 136). Pour cela, la lysine est ancrée via la chaîne latérale sur le support. Dans ce cas, aucune réaction de décarboxylation n'est observée et seule la lysine Fmoc-Lys-OH est obtenue (Schéma 136).

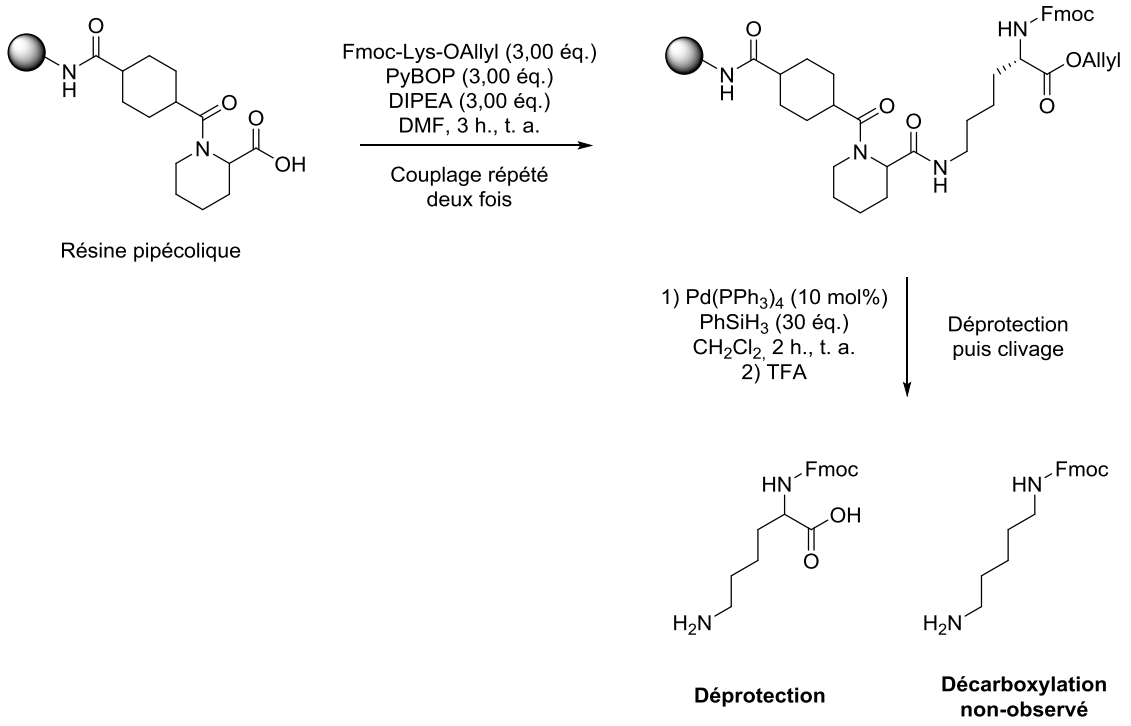


Schéma 136 : Déprotection *vs*. décarboxylation

Ces résultats semblent indiquer que le linker pipécolique joue un rôle primordial dans la réaction de décarboxylation. Il est cependant très difficile, à ce stade, d'émettre une hypothèse mécanistique permettant de justifier ce résultat.

Cette réaction, non désirée dans ce contexte, reste cependant très intéressante en synthèse organique. Nous avons donc entrepris, parallèlement à ces travaux, l'étude de cette réaction de décarboxylation en phase homogène.

II.1.10.5.4 Réaction de décarboxylation allylique en phase homogène

Si l'on se penche sur la littérature concernant ce domaine, nous pouvons constater que la décarboxylation allylique directe d'acides α-aminés n'est, à notre connaissance, pas décrite. En revanche, de nombreuses études ont été réalisées sur les dérivés acides α-iminés (Schéma 137).[115]

[115] (a) E. C. Burger, J. A. Tunge, *J. Am. Chem. Soc*. **2006**, 128, 10002-10003. (b) A. A. Yeagley, Jason J. Chruma, *Org. Lett.* **2007**, 9, 2879-2882. (c) W. H. Fields, A. K. Khan, M. Sabat, J. J. Chruma, *Org. Lett.* 2008, 10, 5131-5134. (d) A. A. Yeagley, M. A. Lowder, J. J. Chruma, *Org. Lett.* **2009**, 11, 4022-4025.

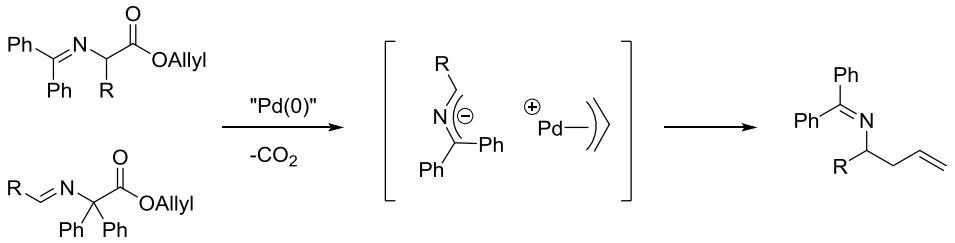


Schéma 137 : Travaux décrits dans la littérature

La réaction de décarboxylation alors observée en synthèse supportée pourrait être une alternative à l'utilisation d'acides α-iminés.

Pour commencer l'étude de cette réaction en phase homogène, la synthèse d'un composé se rapprochant de la structure du linker pipécolique (**108**) a été réalisée en couplant dans un premier temps le sel de H-Lys(Fmoc)-OAllyl au Boc-Pip-OH (**185**) permettant l'obtention du composé correspondant (**186**) avec un rendement de 82%. Une étape de déprotection du Boc est alors effectuée suivie d'une nouvelle réaction de couplage avec l'acide cyclohexanoique permettant l'obtention du dérivé souhaité (**188**) avec un rendement de 76% (Schéma 138).

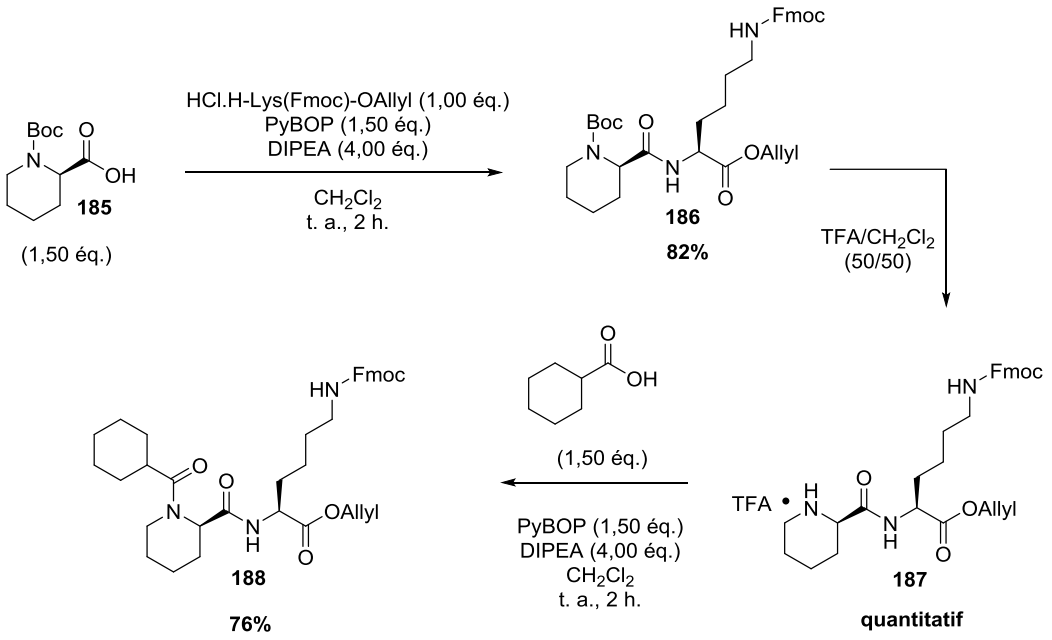


Schéma 138 : Préparation du substrat

Après avoir obtenu ce composé, ce dernier a été mis en présence de $Pd(PPh_3)_4$ (10 mol%) et d'un excès de phénylsilane (2,00 éq.) (Schéma 139). Alors que nous nous attendions à obtenir le produit décarboxylé, nous avons été surpris de n'observer que le produit de déprotection (acide carboxylique).

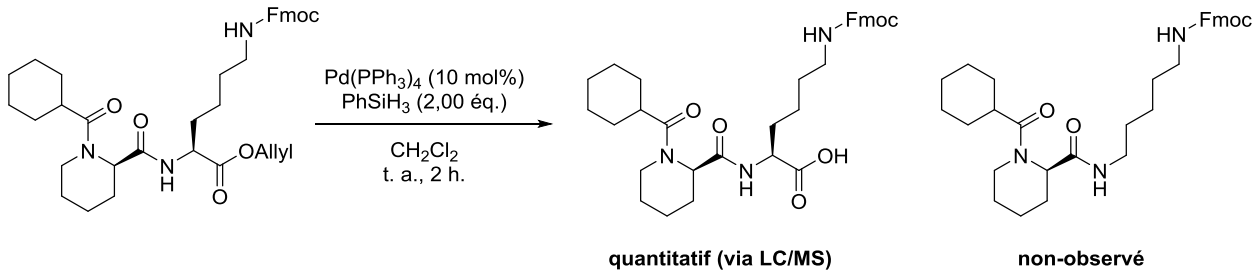


Schéma 139 : Essai préliminaire de décarboxylation

N'ayant que très peu d'idées, à ce stade, du rôle des réactifs dans la réaction, cette même réaction a été menée en l'absence de phénylsilane (Schéma 140). Dans ces conditions encore, le produit de décarboxylation n'est pas observé, seul le substrat est présent en fin de réaction.

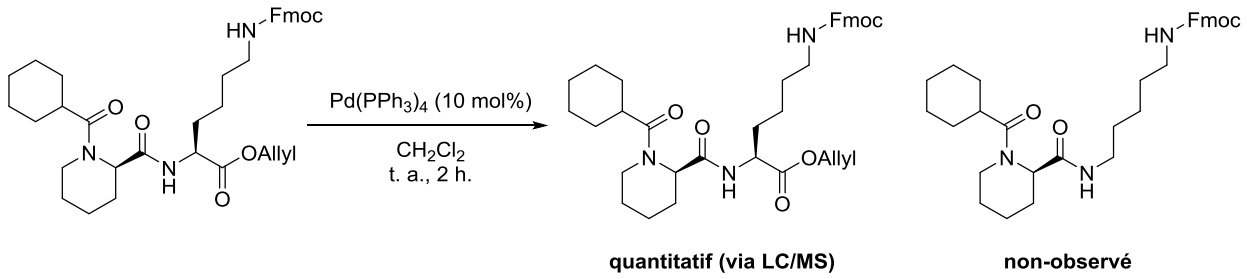


Schéma 140 : Essai sans phénylsilane

Si cette réaction de décarboxylation observée sur support solide semble liée au « linker » pipécolique, il est à ce jour très difficile d'en expliquer les causes d'autant plus qu'elle ne semble pas reproductible en phase homogène. Cependant, en phase homogène, la réaction a été menée sous atmosphère inerte et avec du solvant distillé. Ces précautions n'ayant pas été prises en support solide, il est possible d'envisager que de l'oxygène et/ou de l'eau soit nécessaires pour la réaction. Des études sont actuellement en cours au laboratoire afin d'étudier cette réactivité.

II.1.10.6 Stratégie O-Allyle, résine 2-Chlorotrityle

Suite à ces résultats infructueux avec la résine pipécolique, l'utilisation de la résine 2-chlorotrityle a été envisagée. Dans un premier temps, après avoir ancré le premier acide α-aminé, nous avons vérifié si la réaction de décarboxylation avait lieu avec cette résine. Sans surprise, seule la déprotection de l'ester allylique a été observée en présence de $Pd(PPh_3)_4$ (10 mol%) et de phénylsilane (20 éq.). Nous avons alors pu effectuer des premiers essais de couplages ; l'Imi-Val-OAllyl (3,00 éq.) est alors ajouté en présence d'une quantité catalytique d'HOBt (10 mol%) et de $CuBr_2$ (10 mol%) pendant 20 heures dans le dichlorométhane (Schéma 141). Un micro-clivage suivi d'une analyse LC/MS ont permis de mettre en évidence l'échec de la réaction. En effet, seules de traces du dipeptide souhaité ont été obtenues. Afin de s'assurer que les additifs utilisés pour cette réaction en phase homogène n'aient pas d'effets néfastes sur la réaction supportée, ce même couplage a été réalisé en l'absence de ces derniers. Malheureusement, dans ce cas encore, seules des traces du dipeptide ont été observées.

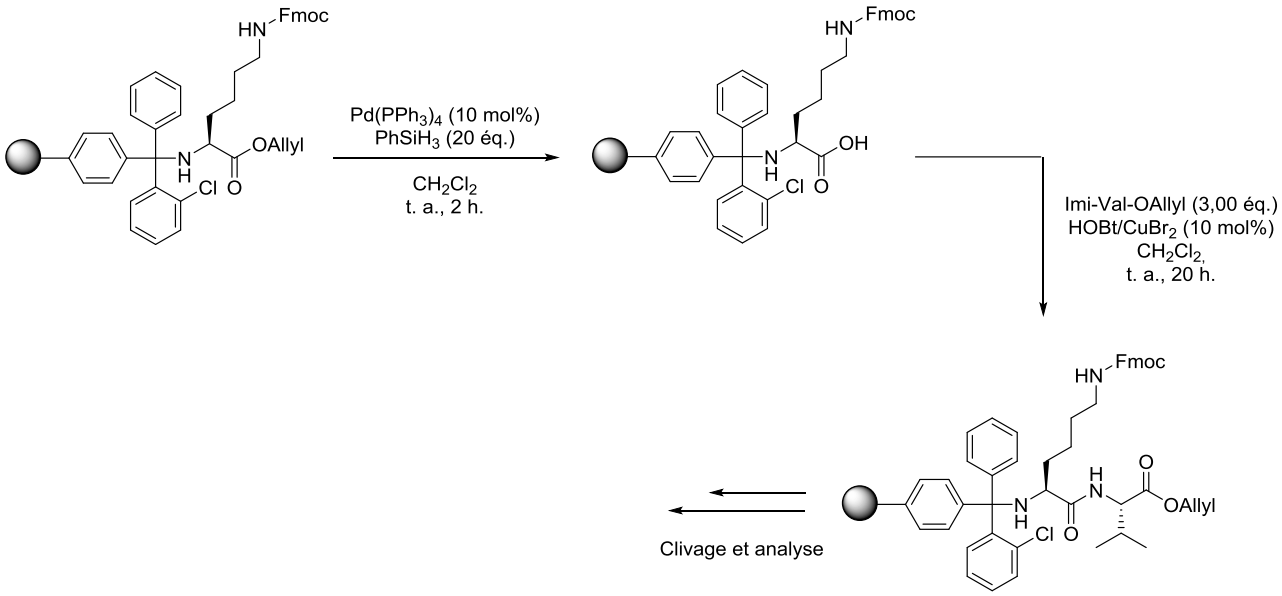


Schéma 141 : Essais avec la résine 2-chlorotrityle

- <u>Conclusion</u> :

L'application de la méthodologie sur support solide semble plus complexe que prévu. Une réaction de décarboxylation inhabituelle a été observée avec la résine pipécolique empêchant son utilisation dans le cadre de ce travail. Cette réaction demeure cependant très intéressante en synthèse organique et des travaux sont en cours au laboratoire pour sa transposition en phase homogène. Enfin, cette réaction a pu être évitée lorsque la résine 2-chlorotrityle est utilisée, mais les premiers essais de

couplage se sont soldés par un échec. Il semble très difficile d'avancer une hypothèse solide permettant d'expliquer ces résultats. Nous pouvons cependant supposer que des interactions de type « π-stacking » entre l'imidazole de l'amine activée et le polystyrène de la résine puissent être la cause de l'échec. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en utilisant des résines de type polyamides ou polyéthylène glycol.

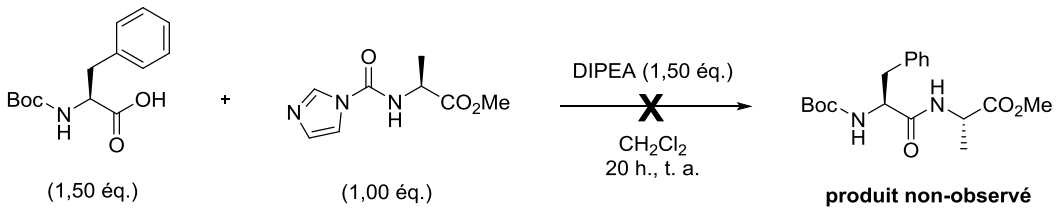
II.1.11 Aspect mécanistique de la réaction

Parallèlement à ce travail, nous nous sommes penchés sur l'aspect mécanistique de la réaction. À ce jour, ces travaux sont préliminaires et nécessiteraient d'être approfondis. Cependant, ils nous ont tout de même permis d'obtenir de premières informations sur le chemin réactionnel de la réaction de couplage.

Tout d'abord, l'ensemble des observations des résultats expérimentaux obtenus, avec et sans iodométhane, nous a permis d'avancer quelques hypothèses sur le déroulement de la réaction.

II.1.11.1 Interprétation des résultats expérimentaux

- <u>Réaction en présence de base :</u>



Lorsque la réaction est menée en présence d'une quantité stœchiométrique de base par rapport à l'acide carboxylique, aucun produit de couplage n'est observé. De la même manière, une légère chute de rendement est observée lorsque la réaction est menée en présence d'une quantité catalytique d'imidazole (53% *vs*. 63% sans base). Il est donc envisageable que le proton de l'acide carboxylique joue un rôle essentiel dans la réaction et que le carboxylate n'est pas assez nucléophile pour s'additionner sur l'Imi-Ala-OMe puis éliminer l'imidazole. La protonation réversible de l'imidazole semble donc jouer un rôle majeur. En effet, cet équilibre permet de générer deux espèces réactives ; un carboxylate et un imidazolium, ces deux formes étant nécessaires au bon déroulement de la réaction (Schéma 142, équation a). En présence d'une base (Et_3N), aucun imidazolium n'est formé dans le milieu, par conséquent, aucun produit n'est obtenu (Schéma 142, équation b).

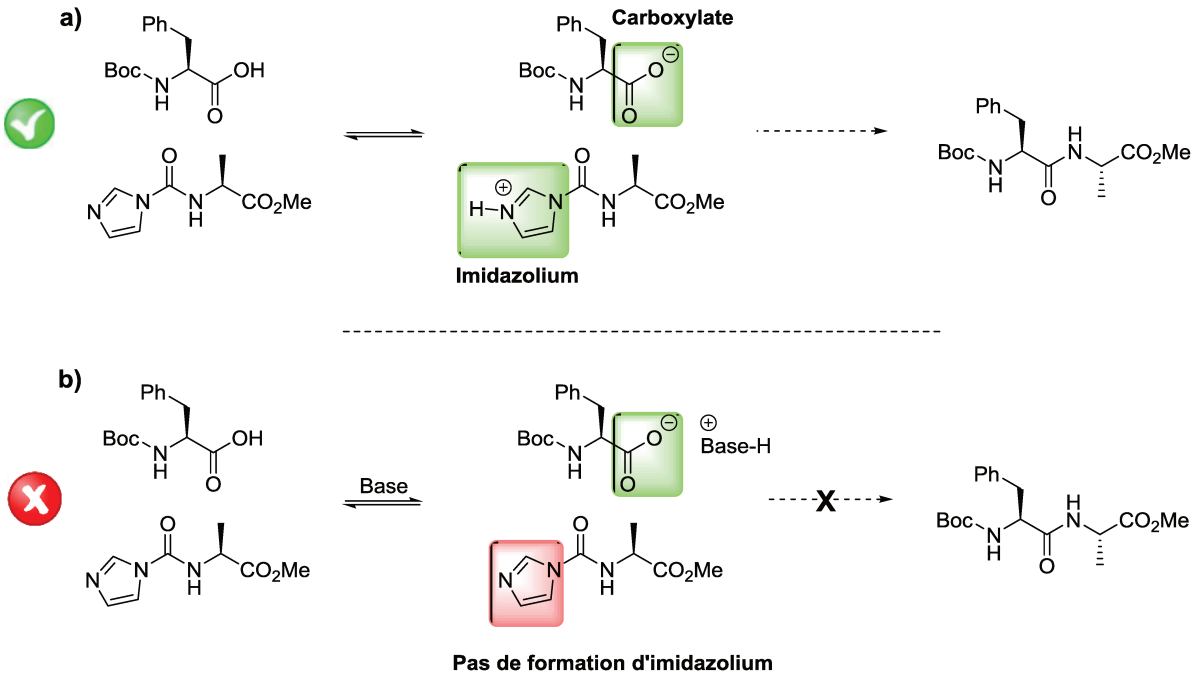


Schéma 142 : Interprétation des résultats

- <u>Réaction en présence d'acide :</u>

En présence de quantités croissantes d'APTS, le rendement de couplage décroit (Schéma 143). Il est raisonnable de penser que l'imidazole est bien protonné, mais l'équilibre pour générer le carboxylate, plus nucléophile, est alors défavorisé.

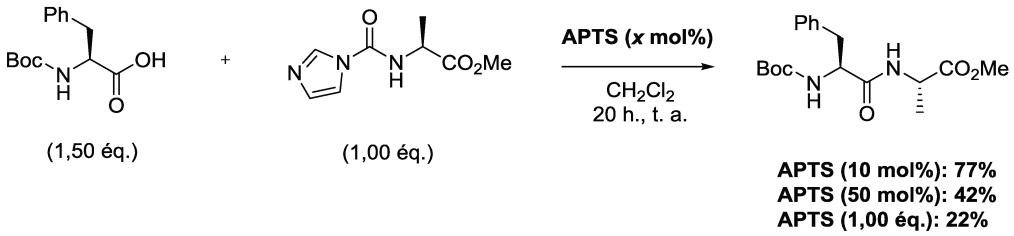


Schéma 143 : Réaction en présence d'APTS

- <u>Réaction en présence d'iodométhane et de base</u> :

En présence d'iodométhane et de base, un rendement de 40% est observé. Il semble que ce faible rendement provienne de la méthylation incomplète de l'imidazole, et que donc la réaction ne fonctionne qu'à hauteur de la quantité d'imidazole méthylé formée. La partie du substrat Imi-Ala-OMe

non-méthylée ne réagit pas avec l'acide carboxylique en présence de base, et rend donc compte du rendement modéré de 40% obtenu (Schéma 144).

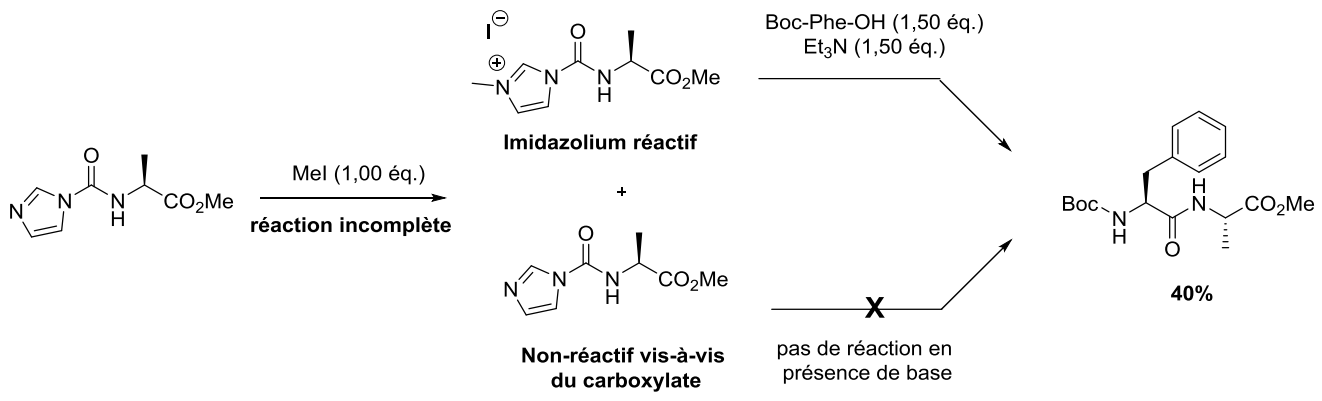


Schéma 144 : Réactivité en présence de base

- <u>Réaction en présence d'iodométhane sans base :</u>

Lorsque la réaction est effectuée en l'absence de base, le produit est isolé avec un rendement de 90%. Dans ce cas, l'Imi-Ala-OMe non-méthylé pourrait réagir avec la Boc-Phe-OH, via l'imidazolium-H^+ et conduire au produit de couplage (Schéma 145, voie a). De l'autre côté, la faible quantité d'intermédiaire imidazolium-Me^+ pourrait lui aussi réagir. En effet, la formation de l'amide (via la voie a) génère de l'imidazole qui va pouvoir à son tour déprotoner la Boc-Phe-OH. Le carboxylate ainsi formé peut réagir avec l'imidazolium-Me^+ pour conduire au dipeptide (Schéma 145, voie b). Ainsi, les deux formes Imi-Ala-OMe et Imi-Ala-OMe méthylé sont réactives et peuvent expliquer l'excellent rendement de 90% obtenu.

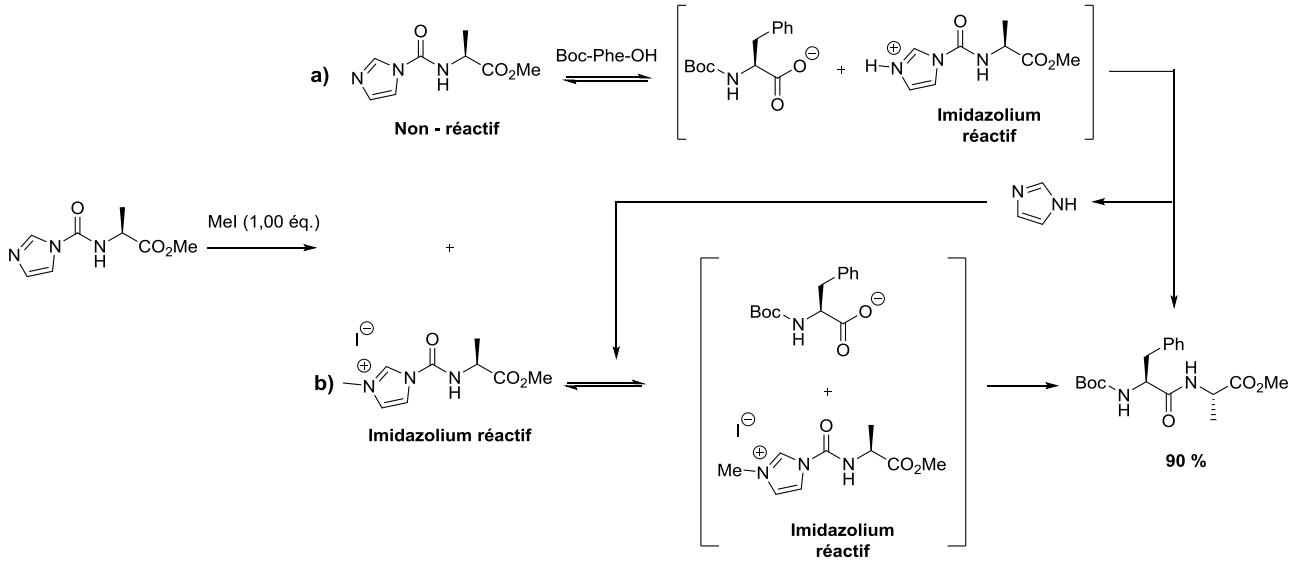


Schéma 145 : Réactivité en absence de base

- <u>Conclusion</u> :

Ces premières observations semblent indiquer que la formation de la liaison peptidique puisse passer dans un premier temps par la formation d'un sel d'imidazolium (plus électrophile et nucléofuge que son analogue imidazole) et d'un carboxylate (plus nucléophile que son analogue acide carboxylique) (Schéma 146). La réaction de ces deux composés conduit ensuite au peptide. Cependant, nous n'avons aucune information sur le chemin réactionnel de la réaction et des éventuels intermédiaires formés au cours du processus réactionnel.

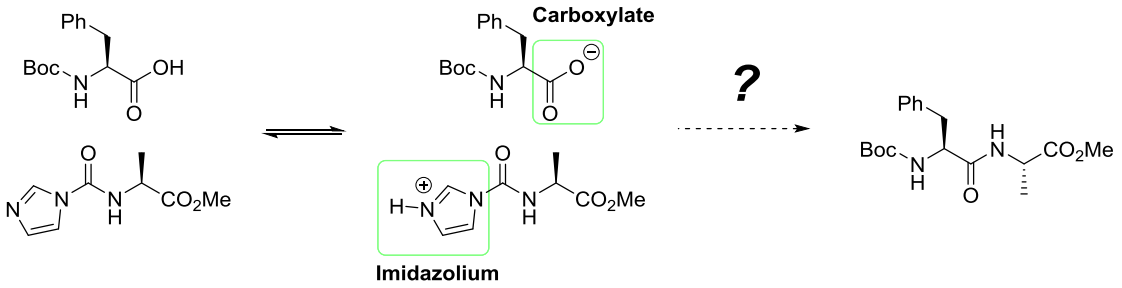


Schéma 146 : Intermédiaires clés

Pour tenter d'obtenir de plus amples informations, une étude RMN a été envisagée en utilisant pour substrat modèle le dipeptide Boc-Met-Ala-OMe issu de la condensation entre la Boc-Met-OH et l'alanine activée.

II.1.11.2 Hypothèses mécanistiques

Il est possible d'envisager plusieurs voies réactionnelles permettant d'expliquer la formation du dipeptide final Boc-Met-Ala-OMe. Toutes mettent en jeu le passage par un intermédiaire clé ; l'anhydride carbamique (**190**) (Schéma 147). Deux voies réactionnelles sont envisageables pour la formation de cet intermédiaire :

- Voie bleue : Addition directe du carboxylate sur l'imidazolium et expulsion de l'imidazole
- Voie rouge : L'imidazolium pourrait être en équilibre avec la forme isocyanate (**189**). À ce stade, le carboxylate (Boc-Me-O^-) peut alors s'additionner pour conduire à la formation de l'anhydride carbamique (**190**).

  L'évolution de cet intermédiaire vers la liaison amide pourrait également se faire via plusieurs chemins réactionnels :
- Voie a : Une réaction intramoléculaire de transfert 1→4 d'acyle, avec dégagement de CO_2, peut permettre la formation directe de la liaison peptidique.
- Voie b : L'anhydride carbamique (**190**) peut réagir avec l'imidazole libéré et conduire à la formation d'un intermédiaire acyl-imidazole (**191**) avec dégagement de CO_2 et d'alanine (H_2N-Ala-OMe). Cette dernière peut à son tour réagir avec l'acyl-imidazole et conduire à la formation de la liaison peptidique.
- Voie c : L'intermédiaire anhydride carbamique (**190**) peut également évoluer, via une réaction intramoléculaire, vers une oxazolone (**192**). Cette dernière peut conduire au dipeptide par réaction avec l'alanine libérée.

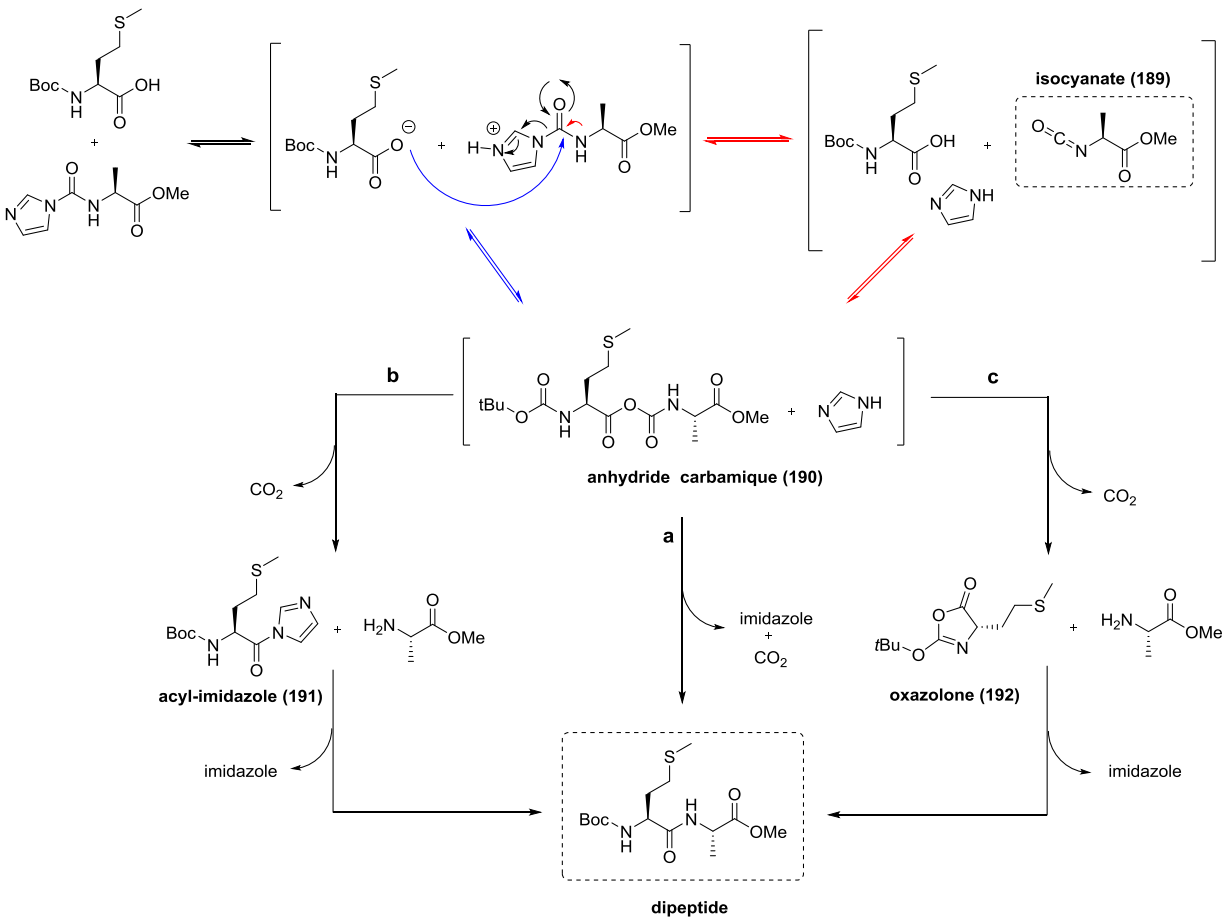


Schéma 147 : Hypothèses mécanistiques et intermédiaires envisageables

Il est également possible d'envisager la formation réversible de l'oxazolone (**192**) via l'intermédiaire acyl-imidazole (**191**) (Schéma 148). Par souci de clarté sur le Schéma 147, ces vois réactionnelles ne sont pas représentées.

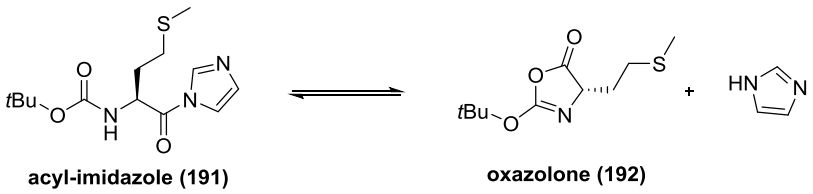


Schéma 148 : Formation réversible de l'oxazolone via l'acyl-imidazole

Dans le but d'observer les éventuels intermédiaires formés au cours du processus réactionnel, nous avons entrepris une étude par RMN ^{13}C.

II.1.11.3 Expériences ^{13}C RMN

Dans un premier temps, et afin d'obtenir des références, les différents substrats et intermédiaires réactionnels ont été synthétisés et analysés par RMN ^{13}C.

- Synthèse de l'isocyanate :[116] l'isocyanate de l'alanine est synthétisé à partir de son analogue chlorhydrate, en présence de diphosgène et d'un équivalent de DIPEA (Schéma 149). Le produit final (**189**) est isolé, après distillation, avec un rendement de 69%. Il présente en RMN ^{13}C un pic caractéristique à 126,4 ppm pour le carbone central de l'isocyanate.

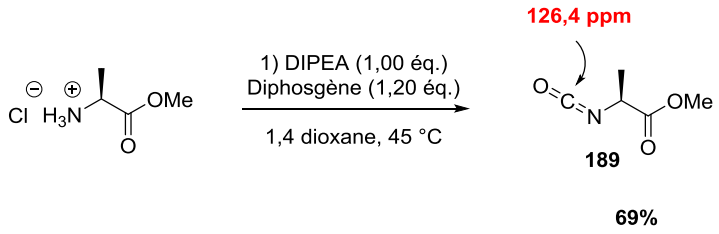


Schéma 149 : Synthèse de l'isocyanate de l'alanine

[116] K. T. Hansen, P. Faarup, H. Bundgaard, *J. Pharm. Sci*. **1991**, 80, 793–798.

- Synthèse de l'acyl-imidazole :

L'acyl-imidazole du dérivé méthionine est obtenu par simple addition d'un équivalent de CDI. Dans ce cas, l'intermédiaire n'a pas été purifié et le mélange obtenu a été directement analysé par RMN ^{13}C (Schéma 150). Un pic à 169,5 ppm a été attribué au carboxyle comportant l'imidazole.

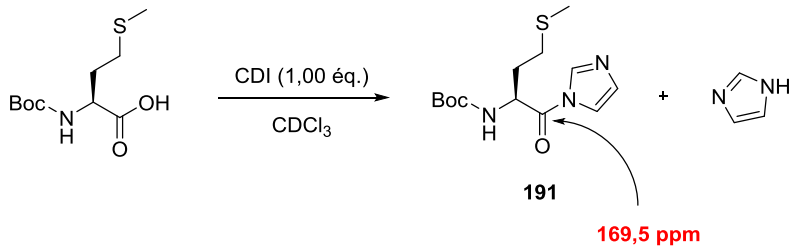


Schéma 150 : Synthèse de l'acyl-imidazole

Après avoir obtenu ces deux références, et dans le but d'observer l'intermédiaire anhydride carbamique (**190**), un premier suivi réactionnel de la réaction entre la Boc-Met-OH et l'isocyanate de l'alanine (**189**), en l'absence de base, a été réalisé. Pour ce faire, la réaction est menée directement dans le chloroforme deutéré et les réactifs sont utilisés en quantité équimolaire. Une analyse par RMN ^{13}C est alors effectuée toutes les 30 minutes et les résultats sur l'évolution de la réaction sont détaillés ci-dessous (Schéma 151). Nous avons pu constater la formation, dans la première demi-heure, de deux « nouveaux » pics à 148,3 et 168,8 ppm pouvant être attribués à l'intermédiaire anhydride carbamique (**190**). Cependant, cet intermédiaire semble s'accumuler pour arriver à un équilibre. En effet, après 60 minutes de réaction, aucune évolution de cet intermédiaire n'est observée alors que l'isocyanate (**189**) et la Boc-Met-OH continuent d'être détectés. Il est important de noter qu'aucun signal caractéristique du dipeptide Boc-Met-Ala-OMe (171,7 et 172,8 ppm) n'est observé.

Ces résultats semblent indiquer que la réaction de formation de l'intermédiaire anhydride carboxylique carbamique (**190**) est réversible et qu'en conditions neutres, ce dernier est stable et n'évolue pas vers la formation de la liaison peptidique. Ceci est en accord avec les données de la littérature. Il a en effet été montré que pour avoir une réaction de couplage efficace, il est nécessaire, soit de chauffer (110 °C), [93] soit de travailler en présence de base (Et_3N).[94]

Nous avons pu effectivement le confirmer en menant la même réaction en présence d'imidazole (1,00 éq.). Dans ce cas, le suivi réactionnel montre la formation du dipeptide.

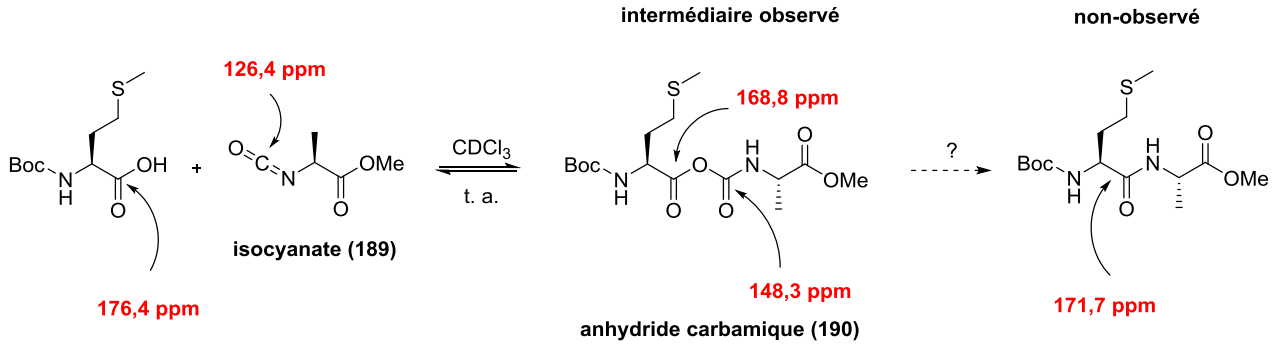


Schéma 151: Réaction de l'isocyanate (**189**) et la Boc-Met-OH

Suite à cette première expérience, et en ayant l'intermédiaire anhydride carbamique en référence, nous avons réalisé, de la même manière, un suivi de la réaction de couplage entre la Boc-Met-OH et l'Imi-Ala-OMe. Dans ce cas encore, la réaction est menée directement dans le chloroforme deutéré et chaque réactif est utilisé en quantité équimolaire. La réaction a été suivie pendant 12 heures et une analyse RMN ^{13}C est effectuée toutes les 30 minutes.

Les résultats sont en partie représentés sur la Figure 15: le spectre en bleu correspond à l'intermédiaire acyl-imidazole (**191**) (Boc-Met-Imi) et le spectre en rouge correspondant à la réaction entre la Boc-Met-OH et l'isocyanate de l'alanine (**189**) après deux heures de réaction. Les trois spectres au-dessus (vert, violet et jaune) représentent le suivi de la réaction entre la Boc-Met-OH et l'Imi-Ala-OMe à des temps respectifs de 2 heures, 4 heures et 10 heures.

- <u>Région de l'isocyanate (**189**) (120-130 ppm)</u> :

Dans un premier temps, si l'on se concentre sur la région entourant le signal de l'isocyanate (**189**) (126,4 ppm), nous pouvons observer que ce dernier n'est pas détecté. En revanche, dans cette même région, un signal croissant avec le temps à 124,4 ppm est observé. Ce dernier peut être attribué au dioxyde de carbone dégagé au cours du processus réactionnel. Le déplacement chimique ce de dernier dans le chloroforme deutéré est décrit (124,9 ppm) et semblerait correspondre au signal observé.[117]

- <u>Région de l'intermédiaire anhydride carbamique (**190**) (166-175 ppm)</u> :

L'analyse de la région autour du signal correspondant à l'anhydride carbamique (**190**) (168,8 ppm) indique que ce dernier n'est pas détecté dans nos conditions réactionnelles. Nous pouvons en effet

[117] G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, *Organometallics*, **2010**, 29, 2176–2179.

remarquer l'absence de signal pouvant correspondre au signal de l'anhydride carbamique (**190**) alors que les signaux correspondant à la formation du dipeptide final croissent (Figure 15).

Il est important de préciser que dans cette même région, le signal correspondant au carbonyle de l'acyl-imidazole (**191**) (169,5 ppm) n'est lui non-plus pas observé.

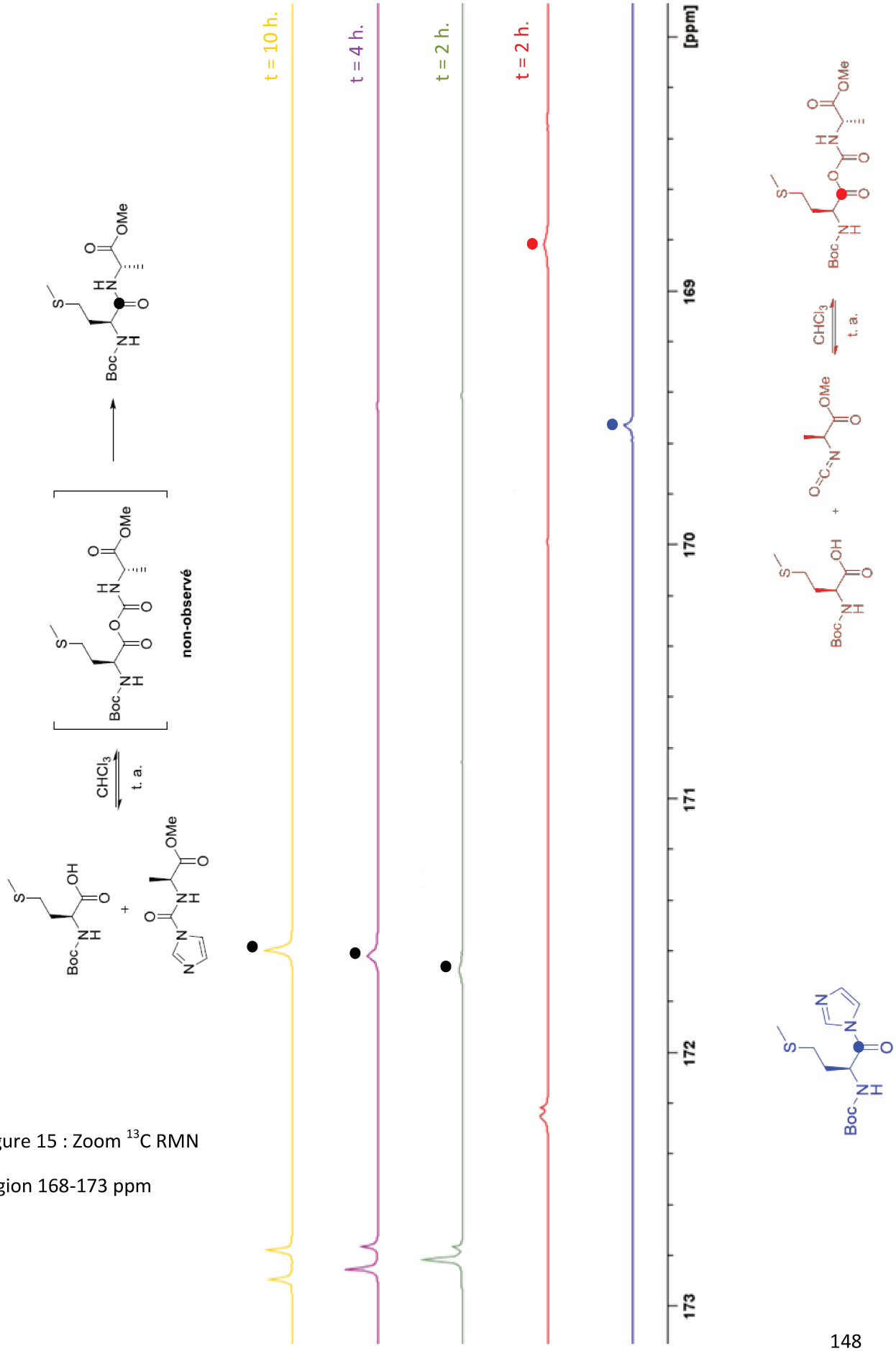


Figure 15 : Zoom ^{13}C RMN

région 168-173 ppm

II.1.11.4 Interprétation des résultats et corrélation avec la littérature

Il est à ce stade prématuré d'avancer une hypothèse solide quant au déroulement exact de la réaction même si ces premieres observations permettent d'émettre quelques hypothèses (Schéma 152).

Dans le suivi de la réaction par RMN ^{13}C, nous n'avons pas été en mesure d'observer les intermédiaires icosyanate (**189**), anhydride carbamique (**190**) et acyl-imidazole (**191**). Ces intermédiaires ne sont donc pas formés ou ne s'accumulent pas dans le milieu car très réactifs. Cependant, il ne semble pas que le mécanisme puisse passer par l'isocyanate (**189**). En effet, si le chemin réactionnel passe par cet intermédiaire, il doit également passer par l'intermédiaire anhydride carbamique (**190**). Dans ce cas, on devrait voir s'accumuler l'un de ces deux intermédiaires (à moins qu'ils aient tous deux des vitesses de réaction comparables et très rapides). D'autre part, une expérience RMN ^{13}C de la réaction entre l'isocyanate (**189**) et de l'imidazole a montré que celle-ci était très rapide et totale pour former l'Imi-Ala-OMe. D'autre part, si la réaction devait passer par l'intermédiaire acyl-imidazole (**191**), nous devrions, suivant le même raisonnement observer l'accumulation soit de l'acyl-imidazole (**191**), soit de l'anhydride carbamique (**190**) dont il est issu. Ce n'est expérimentalement pas le cas, et il semble donc que le dipeptide puisse provenir directement de l'anhydride carbamique (**190**). La formation de cet intermédiaire pourrait donc être l'étape limitante du processus, et une fois formé, le réarrangement intramoléculaire serait rapide pour conduire au dipeptide. Cela permettrait d'expliquer l'absence d'accumulation de l'intermédiaire anhydride carbamique (**190**), ainsi que le fait de ne pas avoir observé les intermédiaires isocyanate (**189**) et acyl-imidazole (**191**) lors du suivi par RMN ^{13}C de la réaction.

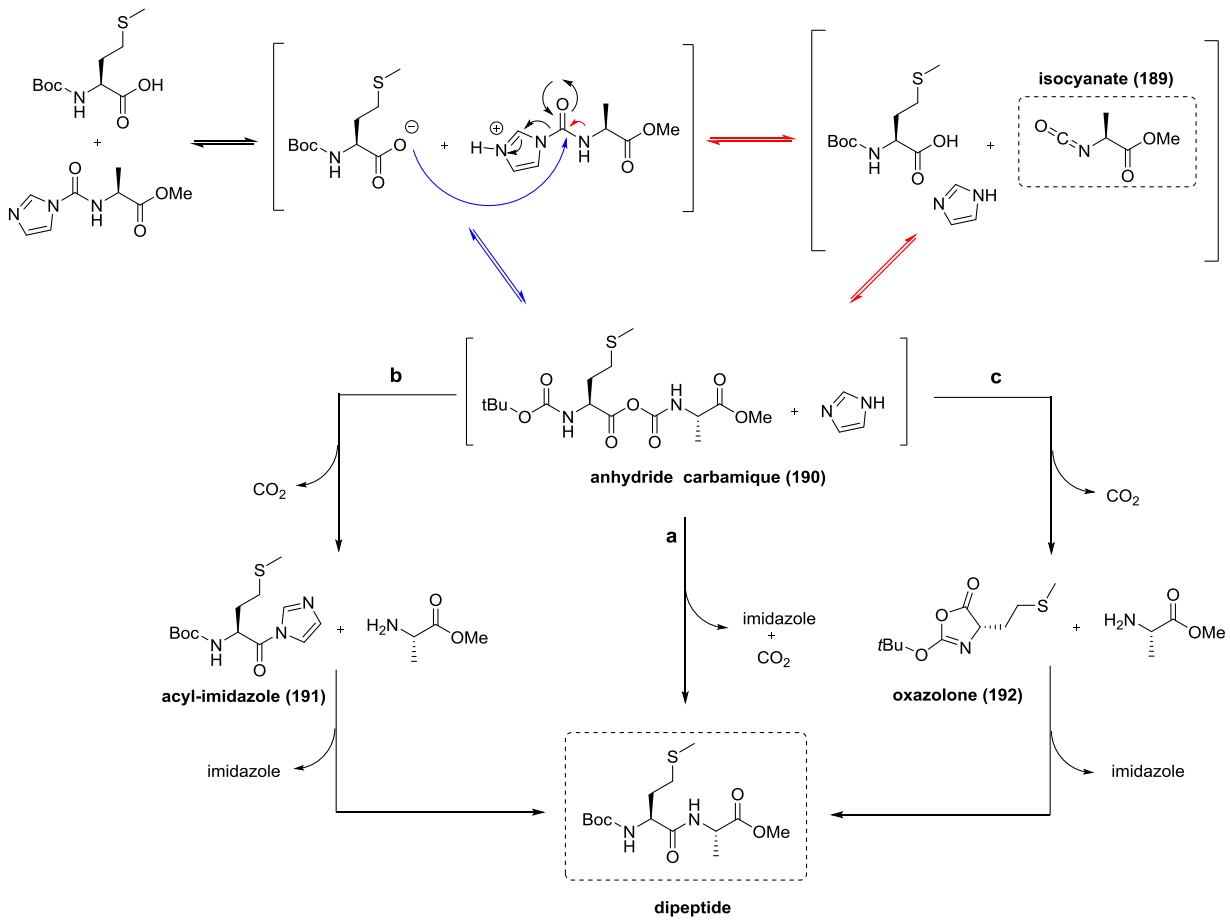


Schéma 152: Hypothèses mécanistiques

De plus, une étude très intéressante parue en 2004 par l'équipe de Vaidyanathan a montré le rôle bénéfique du dioxyde de carbone sur la cinétique de la réaction de couplage entre un acyl-imidazole et une amine.[118] Intrigués par l'effet que pouvait avoir ce dernier, les auteurs ont mené la réaction en présence et en absence de dioxyde de carbone (Figure 16). Lorsque la réaction de couplage entre l'acyl-imidazole (**22**) et la benzylamine est réalisée en l'absence de CO_2, la cinétique de la réaction est lente et une faible conversion est observée. En revanche, en présence de CO_2, la réaction évolue très rapidement vers la formation de l'amide correspondant.

[118] R. Vaidyanathan, V. G. Kalthod, D. P. Ngo, J. M. Manley, S. P. Lapekas, *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 2565-2568.

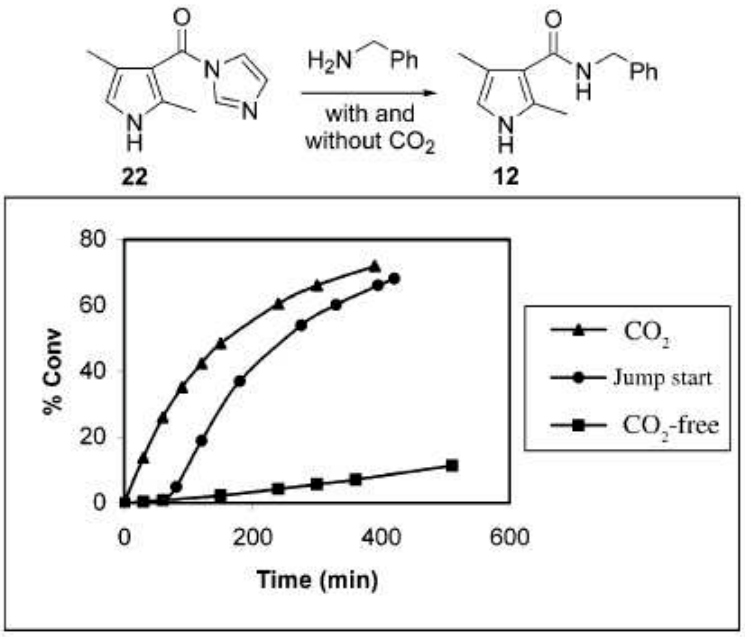


FIGURE 1. Rates of amidation with and without CO_2.

Figure 16 : Cinétique de la réaction (copie de la publication originale)[119]

Pour expliquer ce résultat surprenant, les auteurs proposent le mécanisme présenté sur le Schéma 153. En présence de dioxyde de carbone, l'amine pourrait être carbonatée pour conduire à la formation de carbonate **193**. Ce dernier pourrait réagir ensuite avec un équivalent d'acyl-imidazole et conduire à l'anhydride carbamique correspondant qui évolue rapidement vers l'amide.

Nos conditions réactionnelles sont très proches de celles décrites dans cette étude, et renforcent notre proposition de passage par un anhydride carbamique très réactif.

[119] Adapted with the permission from R. Vaidyanathan, V. G. Kalthod, D. P. Ngo, J. M. Manley, S. P. Lapekas, *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 2565-2568.Copyright 2015 American Chemical Society.

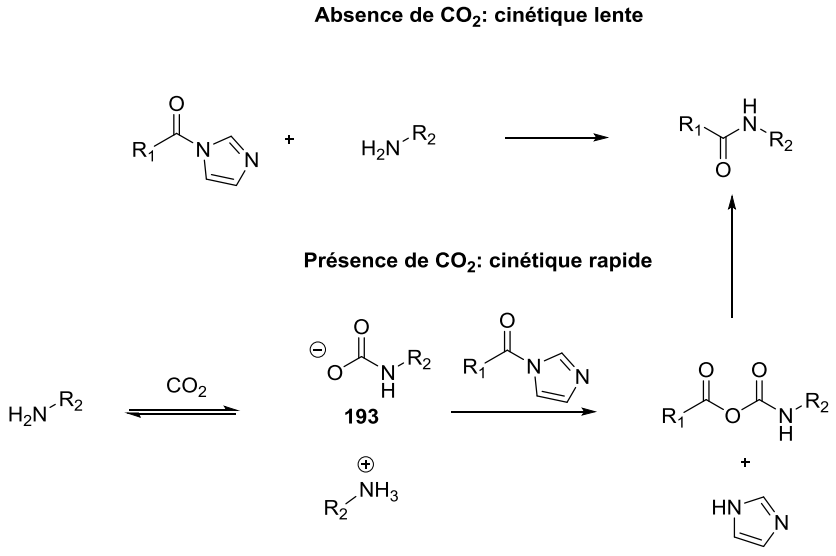


Schéma 153 : Mécanisme proposé par les auteurs

Nous pouvons alors proposer le mécanisme présenté sur le Schéma 154: Après protonation de l'imidazole par l'acide carboxylique, les deux partenaires pourraient réagir, via une étape lente, permettant la formation de l'intermédiaire anhydride carbamique (**102**). Ce dernier, après transfert 1→4 d'acyle intramoléculaire conduirait à la liaison peptidique souhaitée.

Une autre possibilité mécanistique est le passage par une oxazolone. Récemment, une procédure permettant d'isoler et donc de caractériser l'oxazolone de la *tert*-leucine a été décrite.[120] Il serait intéressant de pouvoir caractériser de facon indépendante l'oxazolone de la Boc-Met-OH et voir si elle s'accumule, par analyse RMN ^{13}C, lors de la réaction de couplage entre la Boc-Met-OH et l'Imi-Ala-OMe.

[120] N. Haddad, B. Q., H. Lee, J. Lorenz, R. Varsolona, S. Kapadia, M. Sarvestani, Xu. Feng, C. A. Busacca, D. Hebrault, S. Rea, L. Schellekens, C. H. Senanayake, *Org. Process Res. Dev.*, **2015**, 19 , 132-138.

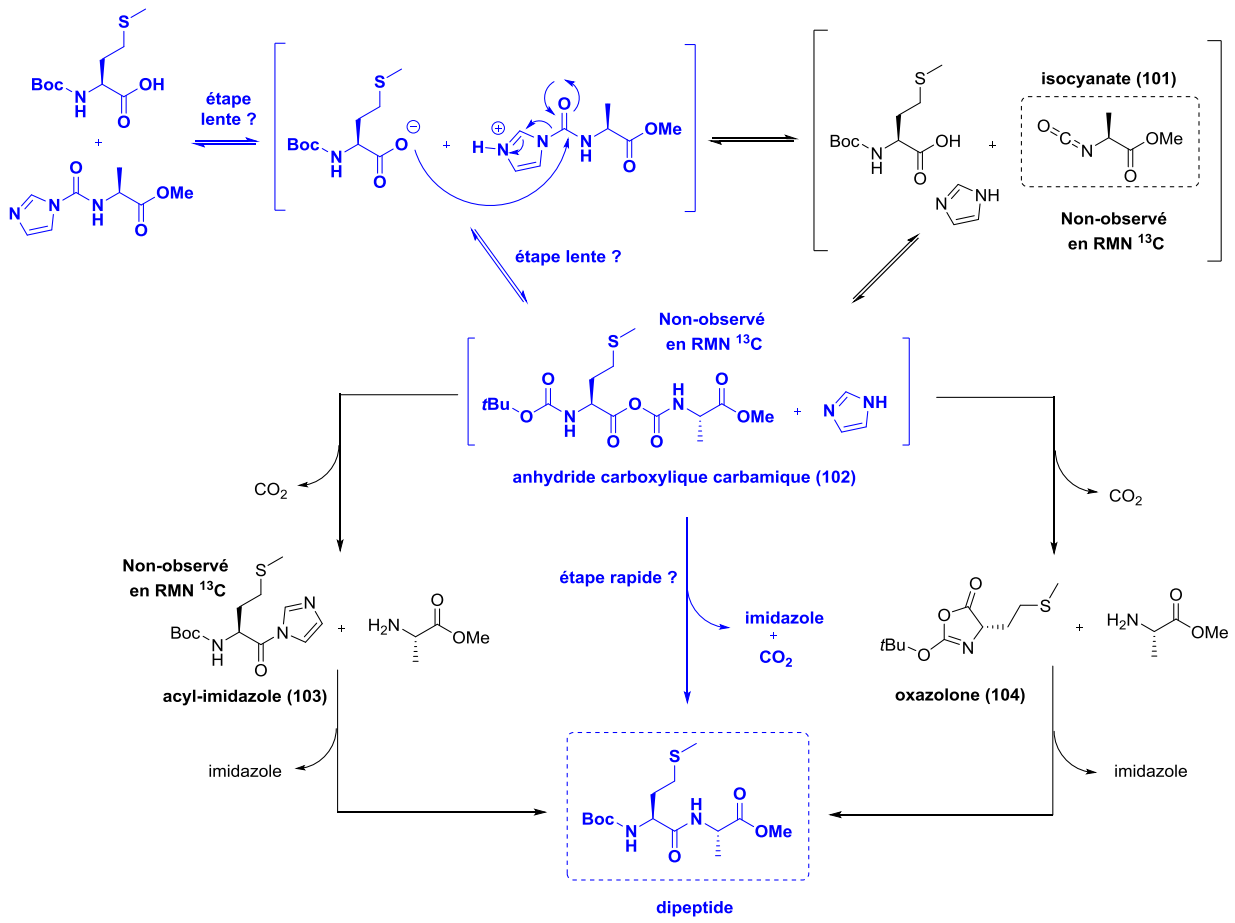


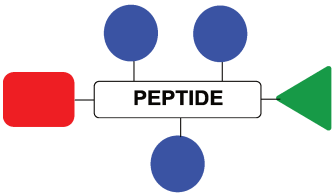
Schéma 154: Proposition de mécanisme

En conclusion, ces expériences RMN, ainsi que les travaux précédemment décrits dans la littérature tendent à suggérer le passage par un anhydride carbamique très réactif. Ces premières études ne sont cependant pas suffisantes pour pouvoir l'affirmer avec certitude. Elles devront être notamment appuyées par des suivis de la réaction par spectroscopie infra-rouge *in-situ* (ReactIR) et des études DFT. De plus, les conditions étudiées ne représentent pas les conditions optimales utilisées au cours de ce travail de thèse (HOBt/$CuBr_2$ (10 mol%)).

Le dernier chapitre de ce manuscrit est dédié au développement de nouveaux groupements protecteurs de l'acide carboxylique ainsi que leur application en synthèse peptidique inverse.

I. Protection de l'acide carboxylique sous forme d'ester silylé

I.1. Introduction



Comme précédemment évoqué, il est nécessaire dans le contexte du développement d'une méthodologie de synthèse peptidique dans le sens (N→C) d'envisager des stratégies de protection / déprotection orthogonales. Ces dernières décennies, le développement de nouveaux groupements protecteurs pour la synthèse peptidique a connu un essor considérable.[121]

Cependant, les stratégies de synthèse peptidique inversée (N→C) n'ayant été que très peu développées, les jeux de groupements protecteurs de l'acide carboxylique orthogonaux sont restreints et sont essentiellement basés sur l'utilisation d'un groupement ester alkyle (*t*Bu, Me, Et, Bn, Fm, allyle…). Les conditions de déprotection nécessitent parfois des conditions dures pouvant nuire à la stéréointégrité du centre en α de l'acide α-aminé (Schéma 155).

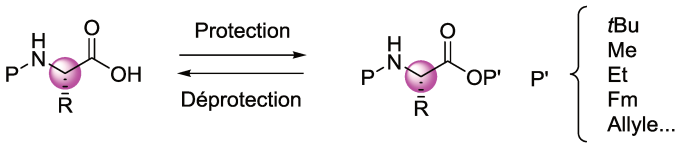


Schéma 155 : Groupements protecteurs de l'acide carboxylique

Afin de diversifier la nature des groupements protecteurs de l'acide carboxylique, nous avons envisagé le développement d'un groupement protecteur silylé pouvant être appliqué en synthèse peptidique. Idéalement, ces derniers doivent être compatibles avec l'utilisation des groupements protecteurs de l'amine (Fmoc, Boc, Cbz) et des chaînes latérales couramment utilisés en synthèse peptidique.

L'utilisation de groupements protecteurs silylés, très utiles en synthèse organique,[122] est moins commune pour la protection de l'acide carboxylique des acides α-aminés.

[121] A. Isodro-Llobet, F. Albericio, *Chem. Rev*. **2009**, 109, 2455-2504.
[122] (a) T. H. Chan, M. Lalonde, *Synthesis* **1985**, 9, 817-845. (b) P. G. M. Wuts, T. W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 4th ed.; John Wiley and Sons: Hoboken, **2007.**

Les groupements protecteurs TMSE ayant déjà fait leur preuve en synthèse peptidique,[123] nous nous sommes particulièrement intéressés aux esters silylés de type O-SEM et O-TIPS afin d'étudier leur éventuelle application en synthèse peptidique (Figure 17).

Figure 17 : Esters silylés O-SEM et O-TIPS

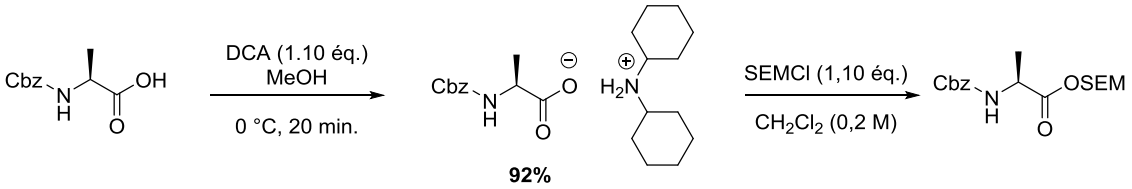
L'utilisation de groupements protecteurs silylés d'acides α-aminés de type O-SEM est décrite dans la littérature, mais les rendements de protection sont modérés.[124] En revanche, l'estérification d'acides α-aminés sous forme O-TIPS conduit à de très mauvais rendements à l'exception de quelques rares cas.[125]

I.2. Essais préliminaires

Afin d'étudier la réaction d'estérification d'acides α-aminés sous forme d'esters silylés O-SEM et O-TIPS, nous avons dans un premier temps, effectué quelques essais en utilisant pour substrat modèle l'alanine protégée sous forme de Cbz (Cbz-Ala-OH).

- De nombreux acides α-aminés étant commerciaux sous la forme de sel de dicyclohexylamine (DCA), nous avons envisagé l'utilisation de cette base. En présence de Cbz-Ala-OH, le sel correspondant a été isolé avec un rendement de 92%. Ce sel étant isolé, nous avons étudié sa réactivité en présence de SEM-Cl dans différentes conditions (Tableau 11).

[123] A. Isidro-Llobet, M. Álvarez, F. Albericio, *Chem. Rev.* **2009**, 109, 2455-2504.
[124] (a) W. – R. Li, W. R. Ewing, B. D. Harris, M. M. Jouillié, *J. Am. Chem. Soc*. **1990**, 112, 7659-7671. (b) G. Jou, I. Gonzàlez, F. Albericio, P. Lloyd – Williams, E. Giralt*, J. Org. Chem*. **1997**, 62, 354-366.
[125] (a) B. Soto – Cairoli, I. Kock, J. J. de Pomar, G. Yang, J. M. Guzmàn, J. R. Gonzàlez, J. A. Soderquist, *Heterocycles* **2010**, 80, 409-426.



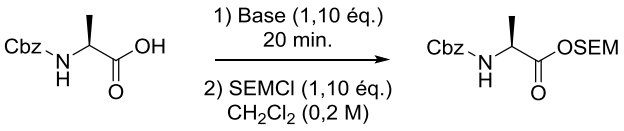
Entrée	Température	Temps	Rendement
1	t. a.	12 h.	65%
2	t. a.	18 h.	62%
3	0 °C	12 h.	60%

Tableau 11 : Essais préliminaires à partir du sel de DCA

Comme nous pouvons le voir dans le tableau ci-dessus, l'ajout de SEM-Cl à température ambiante pendant 12 heures (Entrée 1) et 18 heures (Entrée 2) permet d'isoler l'ester silylé avec des rendements respectifs de 65% et 62%. Un rendement similaire est obtenu lorsque la réaction est effectuée à 0 °C (60%, Entrée 3).

- Après avoir obtenu ces premiers résultats, nous avons envisagé d'effectuer la réaction de manière monotope. Dans ce cas, la base est ajoutée dans un premier temps afin de former le sel, et dans un second temps le SEM-Cl est ajouté. Différentes conditions réactionnelles ont été testées et sont représentées dans le tableau ci-dessous (Tableau 12).

Naturellement, ce travail d'optimisation a commencé par l'utilisation de la DCA comme base. Lorsque celle-ci est utilisée, l'ester silylé est obtenu, après deux heures de réaction, avec un rendement de 92% (Entrée 1). Une légère baisse de rendement est observée lorsque le temps de réaction est de 12 heures (Entrée 2). Cette baisse de rendement peut être attribuée à la décomposition du produit à température ambiante. En effet, cette réaction de dégradation est évitée lorsque la réaction est effectuée à 0 °C. Dans ce cas le rendement est de 98% (Entrée 3). D'autres bases aminées ont également été testées. De manière plus surprenante, aucun produit désiré n'est observé lorsque la réaction est effectuée en présence de triéthylamine (Et_3N) à 0 °C (Entrée 4). L'utilisation de la DIPA et la pipéridine ont permis d'isoler le produit avec 97% (Entrée 6) et 84% (Entrée 7) de rendements.



Entrée	Base	Température	Temps	Rendement
1	DCA	t. a.	2 h.	92%
2	DCA	t. a.	12 h.	88%
3	**DCA**	**0 °C**	**12 h.**	**98%**
4	Et_3N	0 °C	12 h.	-
5	DIPA	0 °C	12 h.	97%
6	pipéridine	0 °C	12 h.	84%

Tableau 12 : Tableau d'optimisation de la réaction monotope

Si ces conditions optimales (Entrée 3) sont appliquées à la synthèse de l'ester silylé Cbz-Ala-OTIPS, ce dernier est isolé avec un rendement de 92% (Schéma 156).

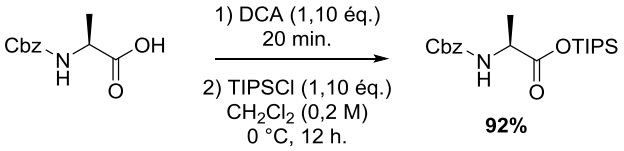


Schéma 156 : Application au composé Cbz-Ala-OTIPS

I.3. Étendue de la réaction

À la suite de ces travaux d'optimisation, le champ d'application de la réaction a été étudié à travers la synthèse de différents acides α-aminés O-silylés. Chaque réaction est réalisée dans les conditions optimales : l'acide α-aminé est mis en présence de diclohexylamine (1,10 éq.) à 0 °C pendant 20 minutes puis l'agent silylant (1,10 éq.) est ajouté.

- **Synthèse d'esters silylés O-SEM :**

Nous nous sommes, dans un premier temps, intéressés à l'application de la méthodologie pour la synthèse d'esters silylés de type O-SEM. L'étendue de la réaction est représentée dans le Schéma 157.

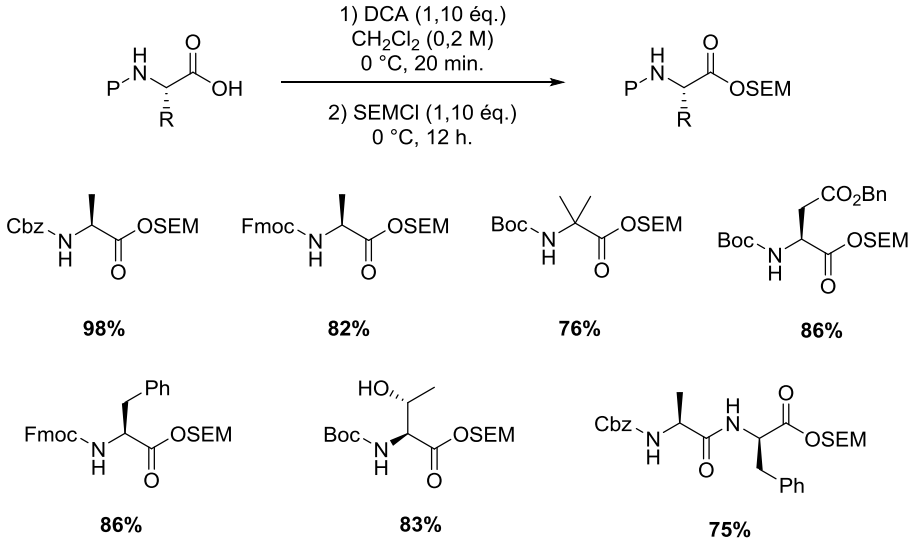


Schéma 157 : Étendue de la réaction : Synthèse d'esters O-SEM

Nous pouvons remarquer que les produits sont obtenus avec de très bons rendements. La réaction est compatible avec les différents groupements protecteurs couramment utilisés en synthèse peptidique (Boc, Cbz, Fmoc). L'utilisation de la dicyclohexylamine (DCA) nécessaire à la réaction ne conduit pas à la déprotection du groupement Fmoc. Il est intéressant de noter que cette réaction est chimiosélective de la fonction acide carboxylique en présence d'un alcool. En effet, lorsque la thréonine non-protégée sur la chaîne latérale est utilisée, aucun produit issu de la réactivité de l'alcool n'est observé. La protection d'un dipeptide est également efficace et fournit le produit avec un rendement de 75%.
Sans surprise, à partir des sels de DCA commerciaux, les dérivés lysine et thréonine ont été obtenus avec des très bons rendements (Schéma 158).

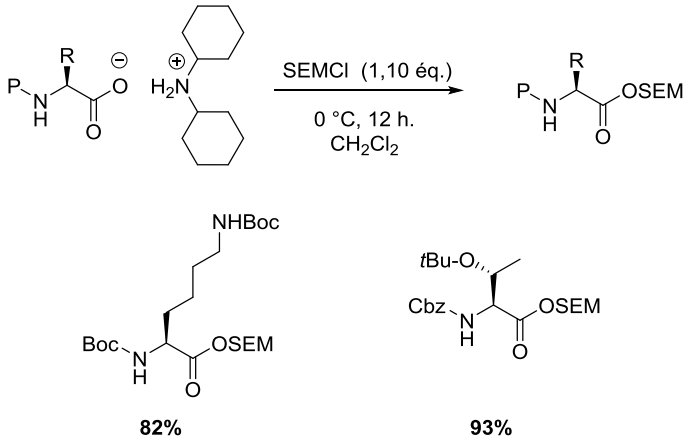


Schéma 158 : Esters silylés O-SEM à partir des sels de DCA

- **Synthèse d'esters silylés O-TIPS :**

Après avoir étudié l'étendue de la réaction pour la synthèse d'esters silylés O-SEM, nous nous sommes intéressés aux esters O-TIPS (Schéma 159).

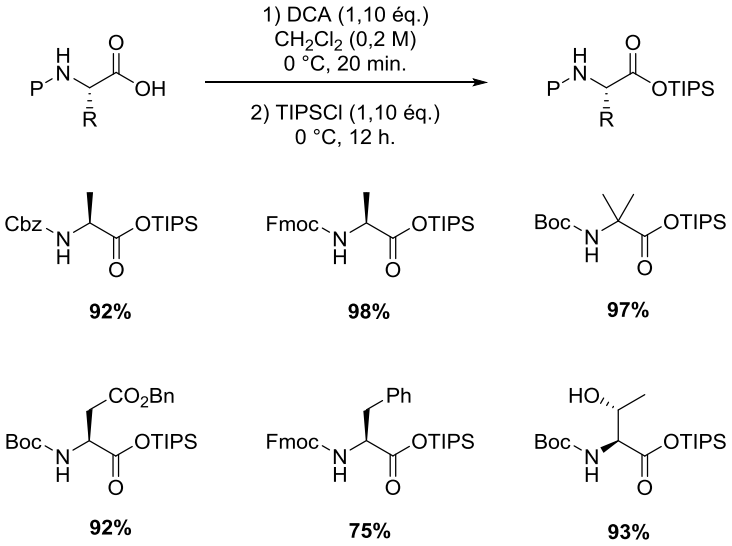


Schéma 159 : Étendue de la réaction : Synthèse d'esters O-TIPS

De façon similaire au cas des esters silylés O-SEM, les produits sont obtenus avec de très bons rendements et les différents groupements protecteurs sont tolérés. La chimiosélectivité observée dans le cas précédent est confirmée pour les esters O-TIPS. Ici encore, lorsque les sels de DCA commerciaux sont utilisés, le simple ajout de TIPSCl dans le milieu permet l'obtention des esters silylés avec de très bons rendements (Schéma 160).

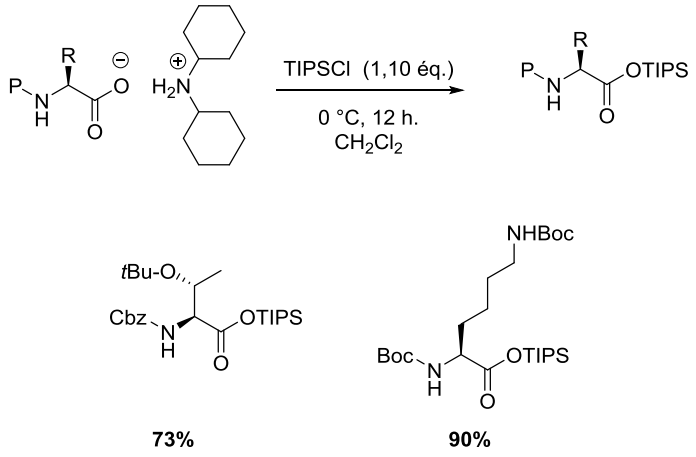


Schéma 160 : Esters silylés O-TIPS à partir des sels de DCA

II. Stabilité des composés O-SEM et O-TIPS dans les conditions de déprotection de la fonction amine en synthèse peptidique

Afin d'envisager d'utiliser cette stratégie de protection, il est important d'évaluer la stabilité des composés silylés dans des conditions classiques utilisées en synthèse peptidique. En effet, pour trouver une application en synthèse peptidique, le groupement protecteur doit être orthogonal aux groupements protecteurs de la fonction amine.

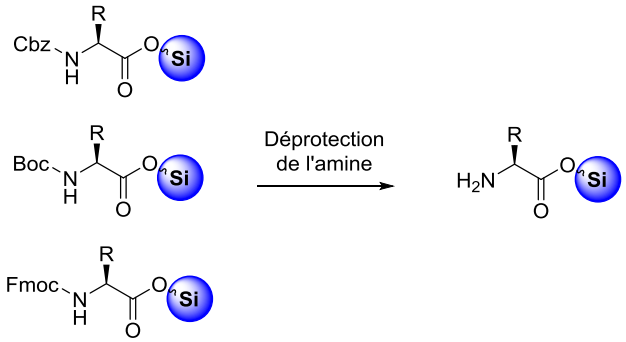
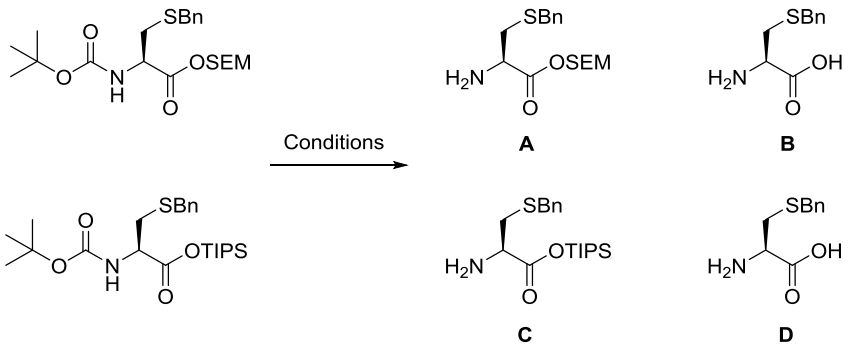


Schéma 161 : Déprotection de l'amine en présence des esters silylés

- **Déprotection de la fonction *tert*-butoxycarbonyle (Boc) :**

Nous avons tout d'abord étudié la stabilité des esters silylés dans des conditions classiques de déprotection du groupement Boc. Malheureusement, aucune des conditions envisagées n'a permis la

déprotection sélective du groupement Boc. Dans chaque cas, l'acide α-aminé nu (totalement déprotégé) est retrouvé en fin de la réaction.



Conditions	TFA / CH_2Cl_2 (50 / 50) 0,1 M, 0 °C	TFA / CH_2Cl_2 (5 / 95) 0,1 M, 0 °C	HCl 4 N / Dioxane 0 °C
OSEM : Ratio (A / B)	0 / 100	0 / 100	0 / 100
OTIPS : Ratio (C / D)	0 / 100	0 / 100	0 / 100

Schéma 162 : Stabilité des esters silylés dans les conditions de déprotection du Boc

- **Déprotection de la fonction carboxybenzyle (Cbz) :**

Les conditions de déprotection du groupement protecteur Cbz ont par la suite été étudiées. Ces dernières sont décrites avec succès dans la littérature[126] et ont permis la déprotection du groupement Cbz en présence de l'ester silylé O-SEM.

Cependant, avec ces conditions décrites, nous ne sommes pas parvenus à reproduire ces résultats.

Les esters silylés ont été mis en présence de palladium sur charbon (10% massique) sous atmosphère de dihydrogène dans le méthanol (ou l'acétate d'éthyle) et ont conduit à l'acide α-aminé nu (observé par LC/MS) (Schéma 163).

[126] A. J. Pfizenmayer, J. M. Ramanjulu, M. D. Vera, X. Ding, D. Xiao, W. C. Chen, M. M. Joullié, *Tetrahedron* **1999**, 55, 313-334.

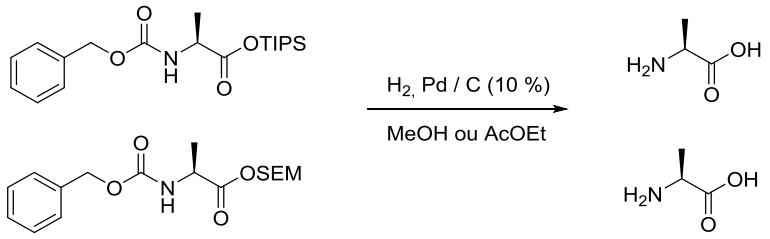
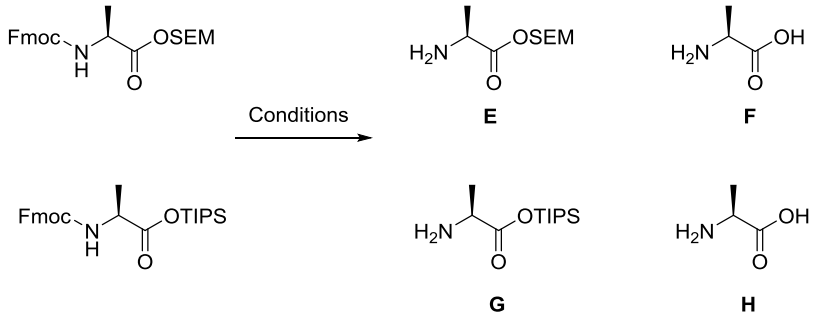


Schéma 163 : Stabilité des esters silylés dans les conditions de déprotection du Cbz

- **Déprotection de la fonction 9-fluorénylméthyle carbonyle (Fmoc) :**

Comme nous avons pu le voir précédemment, les esters silylés O-SEM et O-TIPS semblent être sensibles aux conditions classiquement utilisées en synthèse peptidique. Après avoir obtenu des résultats infructueux dans les cas de déprotection de la fonction Boc et Cbz, nous nous sommes tournés vers la fonction Fmoc.

Différentes conditions de déprotections de Fmoc ont ainsi été étudiées et sont représentées dans le tableau ci-dessous (Schéma 164).



Conditions	DMF / Pipéridine (80 / 20)	DMF / Pipéridine (90 / 10)	DMF / Pipéridine (95/ 5)	MeCN / Et_2NH (90 / 10)
O-SEM Ratio (E / F)	mélange	mélange	mélange	**100 / 0**
O-TIPS Ratio (G / H)	0 / 100	0 / 100	0 / 100	0 / 100

Schéma 164: Stabilité des esters silylés dans les conditions de déprotection du Fmoc

Comme nous pouvons le voir sur le tableau, l'ester silylé O-TIPS est très sensible aux conditions basiques nécessaires à la déprotection du groupement Fmoc. En revanche, l'ester silylé O-SEM semble

être plus robuste. Lorsque le composé Fmoc-Ala-OSEM est solubilisé dans un mélange acétonitrile / diéthylamine (Et_2NH) (90 / 10), seule la déprotection du groupement Fmoc est observée. Il est intéressant de noter que des mélanges de produits **E** et **F** sont obtenus lorsque la réaction est menée en présence d'un mélange DMF / pipéridine.

Après avoir étudié la stabilité des esters silylés O-SEM et O-TIPS dans les conditions classiques de déprotections de l'amine, nous nous sommes intéressés à la déprotection de l'ester silylé.

III. Etude de la déprotection des esters silylés O-SEM et O-TIPS

L'étape suivante de cette étude a été de vérifier si à leur tour, les esters silylés pouvaient être déprotégés en présence d'autres groupements protecteurs présents sur la molécule.

- **Déprotection de l'ester silylé O-SEM :**

La déprotection des esters silylés O-SEM a été décrite dans la littérature par Jouillié.[127] Cette réaction permet, via l'action de $MgBr_2.Et_2O$, d'obtenir le produit déprotégé avec de bons rendements.
Ces conditions appliquées à nos substrats ont en effet permis d'isoler l'acide carboxylique issu de la déprotection du composé Fmoc-Ala-OSEM avec un rendement de 84% (Schéma 165).

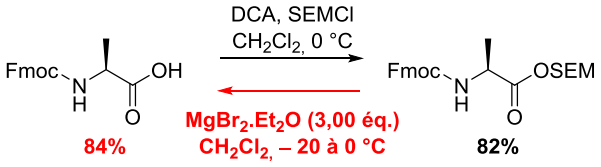


Schéma 165 : Déprotection de l'ester silylé O-SEM

- **Déprotection de l'ester silylé O-TIPS :**

La déprotection de l'ester silylé O-TIPS a également été étudiée et lorsque les esters silylés Fmoc-Ala-OTIPS et Cbz-Thr(*t*Bu)-OTIPS sont mis en présence d'un excès de fluorure de potassium dans un mélange THF / MeOH,[128] les produits déprotégés sont obtenus avec de bons rendements (Schéma 166).

[127] W.- C. Chen, M. D. Vera, M. M. Jouillié, *Tetrahedron Lett*. **1997**, 38, 4025-4028.
[128] I. Paterson, R. Britton, O. Delgado, N. M. Gardner, A. Meyer, G. J. Naylor, K. G. Poullennec, *Tetrahedron* **2010**, 66, 6534-6545.

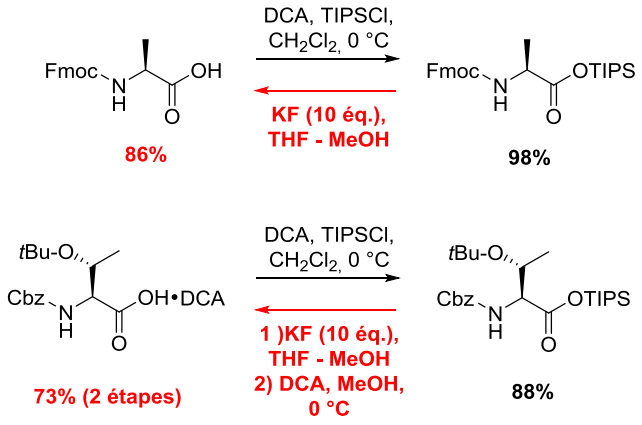


Schéma 166 : Déprotection de l'ester silylé O-TIPS

- **Etude de la racémisation au cours du processus de protection/déprotection :**

Dans le but de vérifier si cette stratégie de protection / déprotection peut être utilisée en synthèse peptidique, il est primordial de vérifier si une éventuelle racémisation de l'acide α-aminé à lieu au cours du processus de protection / déprotection. Nous avons donc choisi d'étudier le cas de la cystéine qui est un acide α-aminé très propice à la racémisation.

Dans un premier temps, la Boc-Cys(Bn)-OH est engagée dans une étape de protection sous forme d'ester silylé. Les conditions de déprotection sont ensuite appliquées et permettent de régénérer l'acide α-aminé Boc-Cys(Bn)-OH de départ. Ce n'est qu'à la suite de ces deux étapes que l'éventuelle racémisation est contrôlée afin de valider la méthodologie développée.

Après avoir trouvé des conditions analytiques par HPLC chirale permettant la séparation des deux énantiomères Boc-L-Cys(Bn)-OH et Boc-D-Cys(Bn)-OH, les esters ont été synthétisés puis déprotégés via les conditions décrites précédemment. Comme nous pouvons le voir ci-dessous, aucune racémisation de la cystéine n'est détectée lors du processus de protection / déprotection (Schéma 167).

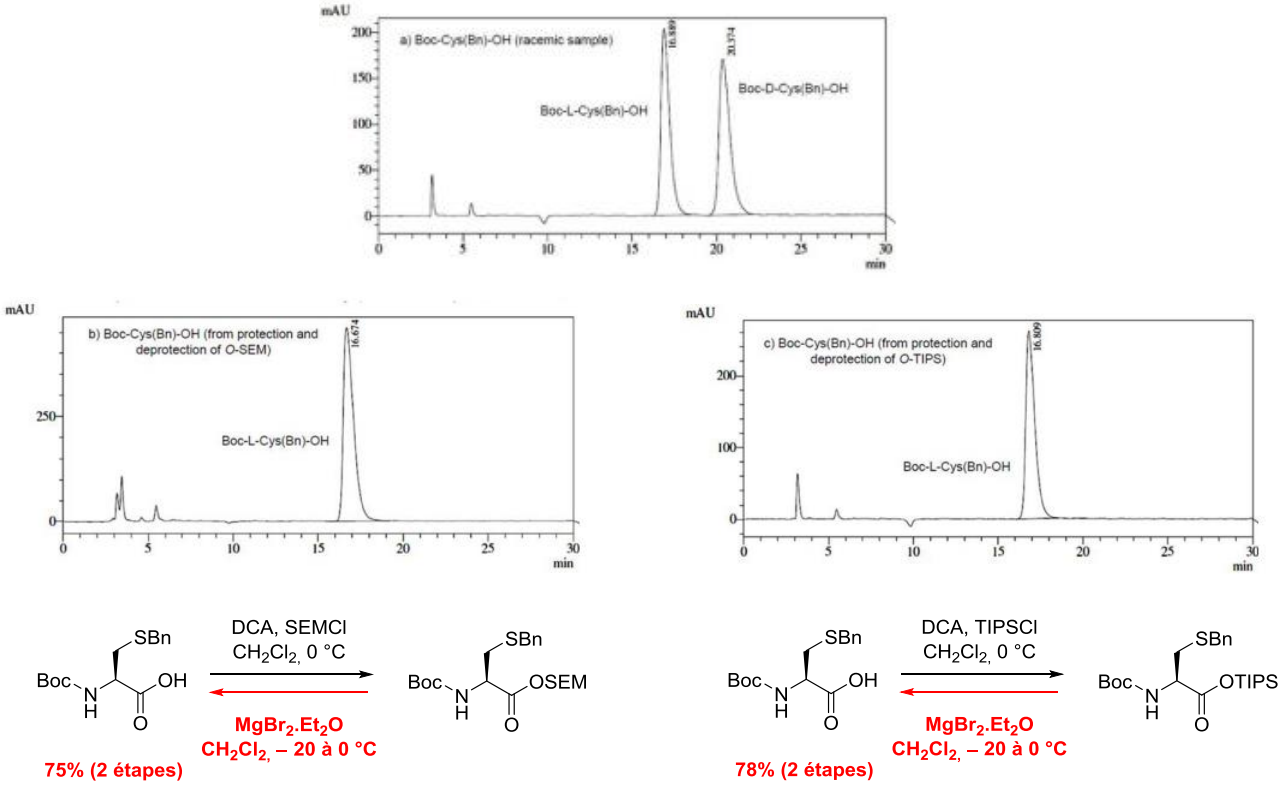


Schéma 167 : Racémisation de la cystéine au cours du processus de protection / déprotection

IV. Application en synthèse peptidique

Afin d'illustrer l'utilité de cette méthodologie, nous nous sommes intéressés à son champ d'application en synthèse peptidique. Comme nous l'avons constaté précédemment, les esters silylés de type O-TIPS n'étant pas stables dans les conditions de déprotection des groupements Boc, Fmoc et Cbz, nous nous sommes tournés vers l'utilisation des esters silylés O-SEM.

Pour cela, le composé Fmoc-Ala-OSEM est placé dans des conditions de déprotection du groupement Fmoc. Le produit brut déprotégé (H_2N-Ala-OSEM) est directement réengagé dans une étape de couplage peptidique dans des conditions classiques. Ces deux étapes permettent d'isoler le dipeptide silylé avec un rendement de 91% sur les deux étapes. L'ajout d'un excès de $MgBr_2.Et_2O$ sur ce dernier conduit à la formation du composé déprotégé (Boc-Phe-Ala-OH) avec un rendement de 90% (Schéma 168).

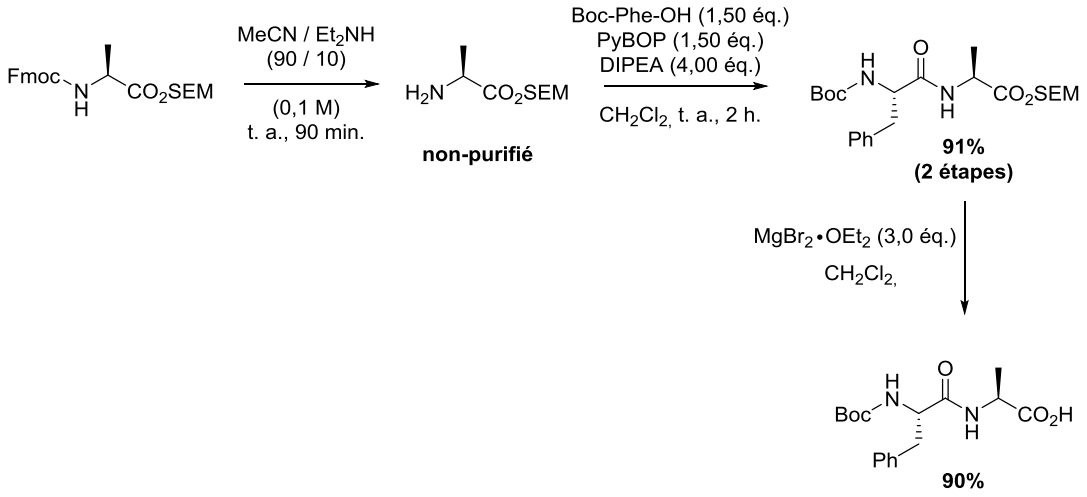


Schéma 168 : Application en synthèse peptidique classique

Nous pouvons constater que l'ester silylé O-SEM est compatible avec des conditions classiques de couplage peptidique et que sa présence n'altère pas les rendements obtenus.

Après s'être intéressés à des conditions classiques de couplage peptidique (via PyBOP), nous avons souhaité vérifier si cette méthode était transposable aux couplages peptidiques impliquant des amines activées développées au cours de cette thèse.

Pour cela, la première étape consiste en la préparation de l'amine activée O-SEM. Le composé Fmoc-Ala-OSEM subit dans un premier temps une étape de déprotection dans les conditions décrites précédemment pour générer l'amine libre pouvant réagir avec du *N*,*N*' carbonyldiimidazole (CDI) et former l'amine activée O-SEM (Imi-Ala-OSEM) avec un rendement de 79% après deux étapes (Schéma 169).

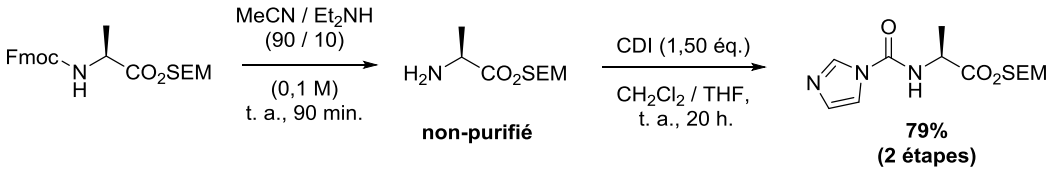


Schéma 169 : Préparation de l'amine activée O-SEM

Après avoir isolé l'alanine activée (Imi-Ala-OSEM), sa réactivité en présence de l'acide α-aminé Cbz-Met-OH a été étudiée (Schéma 170). Dans les conditions optimisées décrites dans le chapitre précédent (10 mol% $CuBr_2$, 10 mol% HOBt), le dipeptide désiré n'est obtenu qu'avec un rendement de

24%. Nous pouvons penser que ce faible rendement est dû à la déprotection partielle du groupement O-SEM en présence de $CuBr_2$. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, ce groupement est déprotégé en présence d'acides de Lewis tels que le $MgBr_2$. Afin de vérifier cette hypothèse, la même réaction a été menée en absence de $CuBr_2$ et a permis d'isoler le dipeptide avec un rendement de 70%.

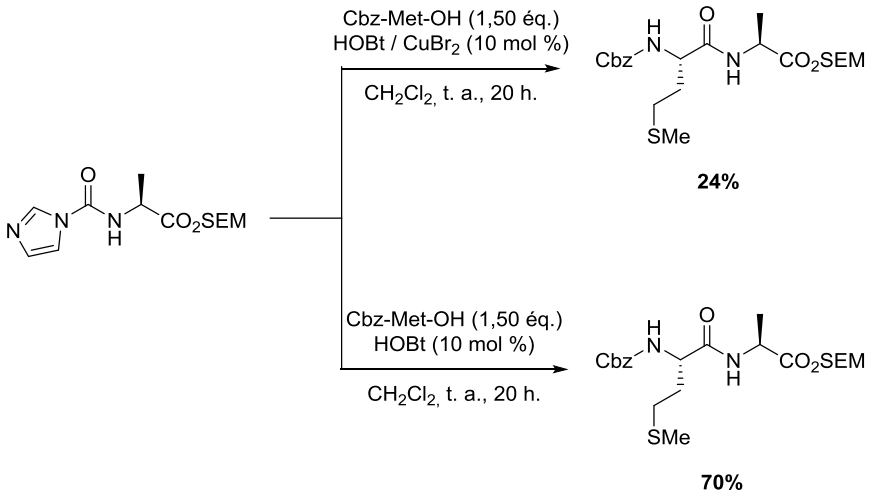


Schéma 170 : Couplage peptidique via une amine activée O-SEM

Nous avons, par la suite, envisagé d'étendre ce protocole à la synthèse d'un tripeptide dans le sens N→C. Après avoir préparé le dipeptide Boc-Phe-Ala-OH via des conditions classiques, ce dernier a été engagé dans une réaction de couplage peptidique avec l'amine activée O-SEM Imi-Ala-OSEM en présence d'une quantité catalytique d'HOBt (10 mol%). Cette réaction a permis d'isoler le tripeptide correspondant Boc-Phe-Ala-Ala-OSEM avec un rendement de 48% (Schéma 171).

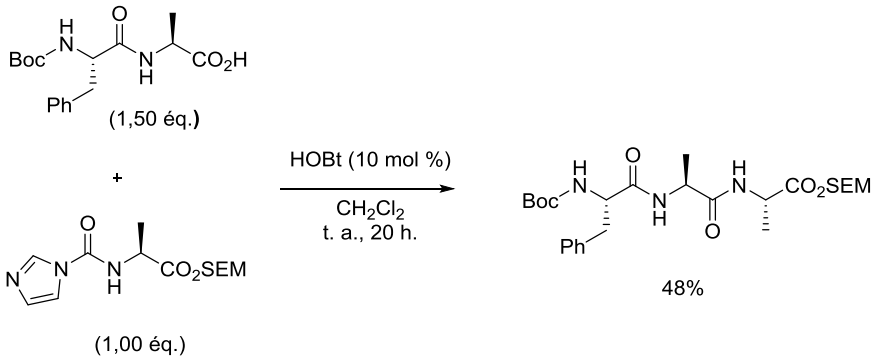
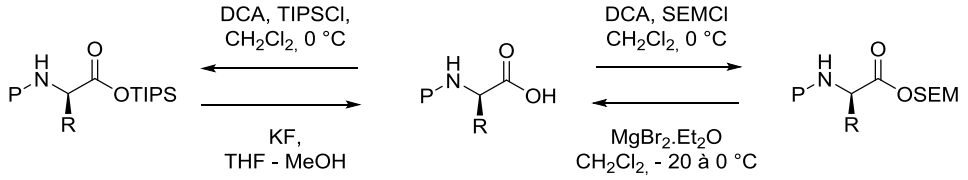


Schéma 171 : Synthèse d'un tripeptide dans le sens N→C via une amine activée O-SEM

V. Conclusion

En conclusion, nous avons développé une méthodologie efficace, facile à mettre en œuvre et dans des conditions douces pour la préparation d'esters silylés O-SEM et O-TIPS. Cette méthodologie permet d'obtenir les produits désirés avec de très bons rendements. De nombreux acides α-aminés sont compatibles avec les conditions réactionnelles. De plus, ces groupements protecteurs sont déprotégés sélectivement et nous ont poussés à envisager leur application en synthèse peptidique. Malheureusement, les esters silylés O-TIPS sont très peu stables dans les diverses conditions utilisées en synthèse peptidique. En revanche, la stabilité du groupement O-SEM dans des conditions basiques nous a permis de l'utiliser dans des couplages peptidiques.

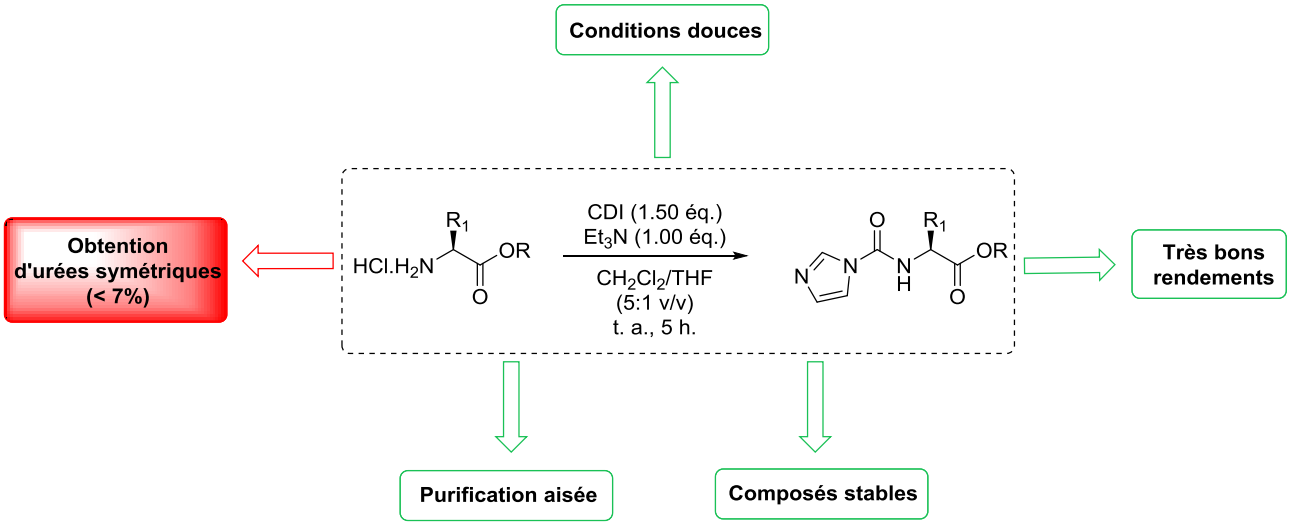


- **Très bons rendements**
- **Processus non racémisant**
- **Instable en conditions de synthèse peptidique**

- **Très bons rendements**
- **Processus non-racémisant**
- **Stable en milieu basique**
- **Application en synthèse peptidique (Fmoc)**
- **Instable en milieu acide et H_2, Pd / C**

Conclusion générale et perspectives

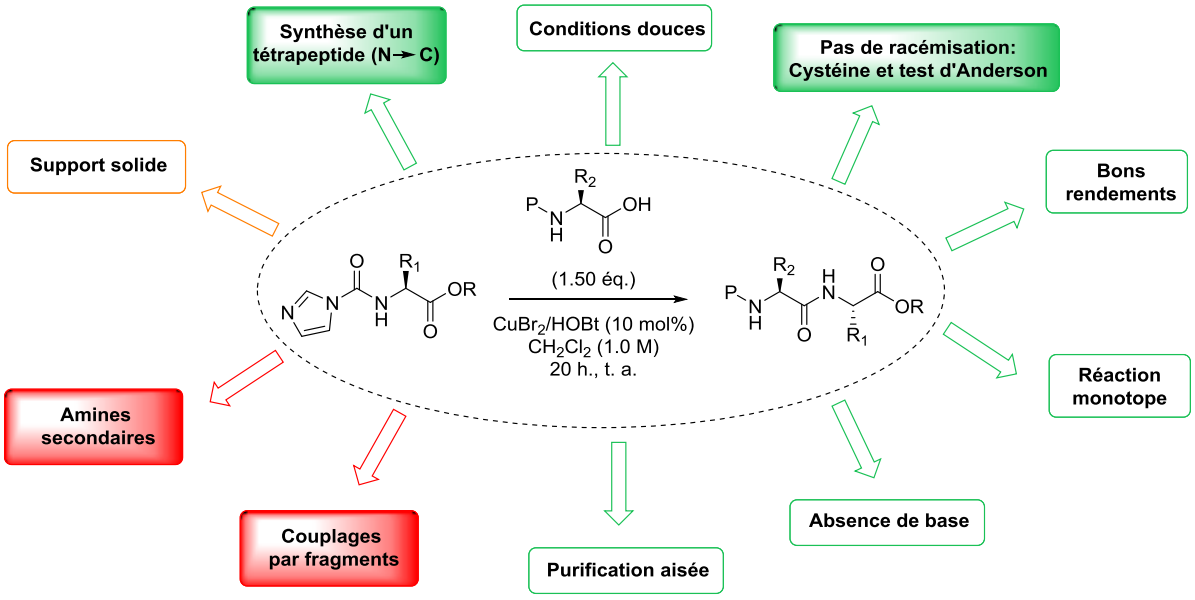
L'enjeu de cette thèse était de développer une stratégie de synthèse peptidique inversée via l'activation de l'amine. Nous avons finalement pu sélectionner un bon « candidat » capable d'activer la fonction amine : le CDI. Ce dernier, très peu onéreux, nous a permis d'obtenir différentes amines activées stables dans des conditions douces, avec des rendements élevés et une purification aisée. Dans quelques cas, notamment lors de synthèse à grande échelle, de petites quantités d'urées symétriques ont été observées mais leur formation a pu tout de même être limitée en ajustant le protocole.



L'étude de la réactivité des Imi-AA-OR en présence d'un acide d'un second acide α-aminé (P-AA-OH) a été menée et des conditions optimales (HOBt/$CuBr_2$ (10 mol%)) ont été développées permettant la synthèse de divers dipeptides après un temps de réaction de 20 heures. Sans surprise, la réaction s'est montrée tolérante envers les différents groupements protecteurs classiquement utilisés en synthèse peptidique (Boc, Fmoc et Cbz pour la protection de l'amine *N*-terminale et OMe, OEt, O*t*Bu, OAllyl pour la protection de l'acide *C*-terminal) ainsi qu'envers les différentes chaînes latérales protégées des acides α-aminés utilisés. Les produits sont très aisément isolés avec des rendements allant de modérés à très bons. Malheureusement, l'utilisation d'amines secondaires activées n'est pas compatible avec les conditions développées ; de très mauvais rendements sont obtenus. Après avoir synthétisé quelques exemples de dipeptides, l'efficacité de la méthodologie quant à la racémisation a été évaluée. Ainsi, aucune racémisation de la cystéine n'a été observée dans nos conditions alors que la stratégie PyBOP (avec préactivation) a conduit à de forts taux de racémisation. Il en est de même dans le cas du test d'Anderson où une racémisation inférieure à 1% a été détectée dans les conditions optimales de la réaction. Suite à ces études, la synthèse d'un tétrapeptide dans le sens N→C a permis

d'illustrer le potentiel de la méthodologie. Ce dernier a été isolé en présentant, a priori, un faible taux de racémisation. Cependant, nous n'avons pas été en mesure de le déterminer avec exactitude, le test de Marfey s'étant soldé par un échec. Cette méthodologie, jusqu'ici développée en deux étapes (1 : activation de l'amine, 2 : réaction de couplage) a pu par la suite être développée de manière monotope et les rendements obtenus sont similaires à la stratégie en deux étapes. La stratégie visant à coupler deux fragments peptidiques via l'activation de l'amine a également été étudiée. Malheureusement, l'amine activée cyclise directement pour fournir l'hydantoïne correspondante.

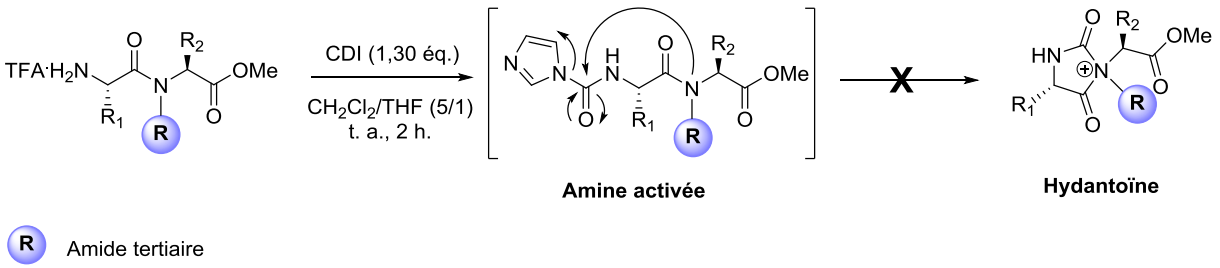
La transposition de cette méthodologie, jusqu'ici développée en phase homogène, en support solide n'est à ce stade pas concluante mais nécessiterait d'être approfondie. Au cours de cette étude, une surprenante réaction de décarboxylation, potentiellement intéressante pour la synthèse organique, a été observée.



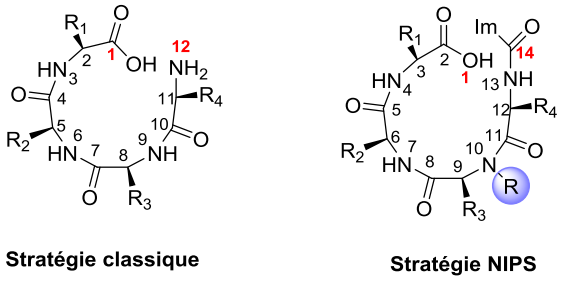
Enfin, parallèlement à ce travail, nous nous sommes penchés sur le développement de groupements protecteurs d'acide carboxyliques. Ces derniers, de type esters silylés, sont très facilement introduits et avec de très bons rendements. Leur déprotection est régiosélective et le processus de protection/déprotection se déroule sans épimérisation. Bien que sensibles, ces esters silylés sont compatibles avec les conditions réactionnelles de couplage développées au cours de ce travail, même si la présence de $CuBr_2$ conduit à une érosion du rendement.

➢ Dans les perspectives à court termes liées à ce travail, les études préliminaires décrites dans ce manuscrit concernant le mécanisme de la réaction vont être approfondies, notamment par des calculs DFT (Collaboration avec l'équipe du Dr.Eric Clot (Institut Charles Gerhardt de Montpellier)) ainsi que des suivis réactionnels par spectroscopie infrarouge en temps réel (*react*-IR).

➢ Concernant les couplages par fragments, il serait intéressant d'étudier cette même réaction en présence d'un amide tertiaire sur l'acide α-aminé situé « à côté » de l'amine activée. Nous pouvons en effet penser que dans ce cas, la réaction de cyclisation serait défavorisée, car elle conduirait à un composé théoriquement instable. Cet amide tertiaire pourrait provenir d'un acide α-aminé secondaire (proline, *N*-Me acide α-aminé) ou d'un auxiliaire (Hmb…) pouvant être éliminé après la réaction.

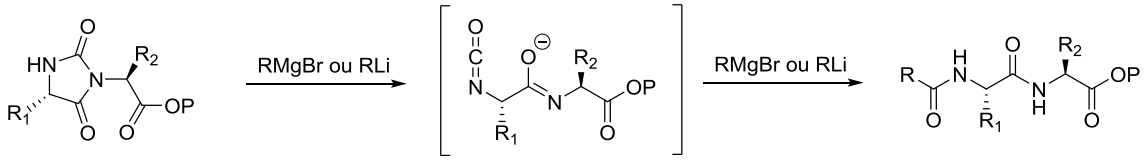


Si cette stratégie s'avère concluante, aù delà des couplages par fragments, il serait intéressant d'étudier son application pour la synthèse de peptides cycliques, et plus particulièrement de tétrapeptides cycliques. En effet, ces derniers sont difficiles à obtenir via la stratégie classique car géométriquement contraints (12 atomes entre les deux « atomes réactifs »). En revanche, via la stratégie NIPS, 14 atomes seraient présents entre les deux « atomes réactifs ». Ce gain de deux carbones pourrait alors faciliter la réaction de cyclisation.



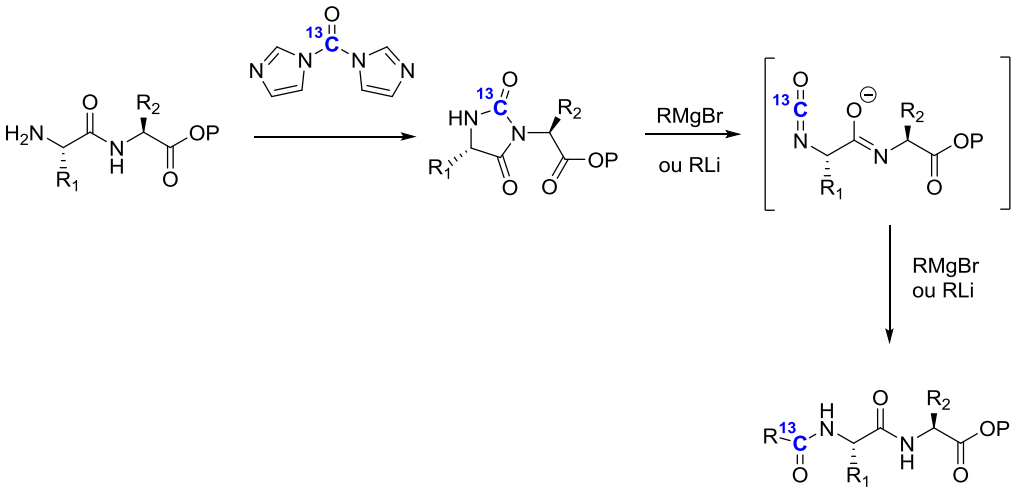
De plus, il serait intéressant d'étudier la réactivité des hydantoïnes en présence de réactif de Grignard ou d'espèces organolithiées. De façon similaire aux travaux de Bode,[97] si un premier équivalent de

réactif organométallique permet de déprotoner le proton NH de l'hydantoïne et générer un intermédiaire isocyanate, un second équivalent pourrait alors s'additionner sur cet isocyanate et permettre la création de liaisons amides présentant des groupements très encombrées.



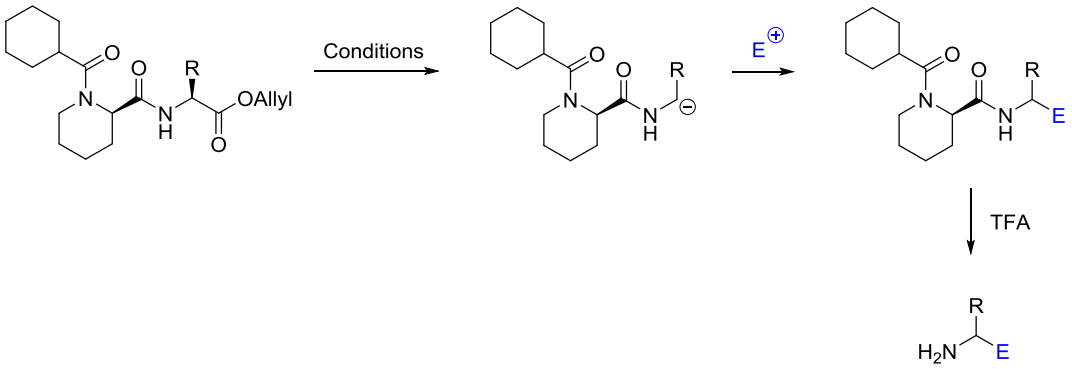
R, R_1: Groupements très encombrés

De plus, si l'hydantoïne est synthétisée à partir de CDI marqué au ^{13}C (commercial), il serait alors envisageable, via cette stratégie, de marquer des peptides au carbone 13.



➢ Il serait intéressant, dans le cadre du développement de la méthodologie en support solide d'étudier de nouvelles résines et de comprendre les raisons de l'échec de la réaction avec la résine 2-chlorotrityle.

La réaction de décarboxylation observée en utilisant la résine pipécolique pourrait être intéressante en synthèse homogène. Il serait intéressant d'en étudier le mécanisme afin d'envisager diverses applications à cette réaction. A titre d'exemple, si l'on considère que le mécanisme est ionique, il serait alors envisageable de fonctionnaliser des amines par des électrophiles sur leur position α en controlant la chiralité. Si l'électrophile utilisé est du dioxyde de carbone marqué, cela permettrait d'obtenir des acides α-aminés marqués au ^{13}C.



Enfin, si l'on imagine que cette réaction de décarboxylation soit liée à une éventuelle chélation du palladium aux deux groupements carbonyle, il serait alors envisageable que ces derniers puissent servir de « pince » pour effectuer des réactions de CH fonctionnalisation.[129]

[129] A. F. M. Noisier, M. A. Brimble, *Chem. Rev.*, **2014**, 114, 8775–8806.

Experimental section

General informations

- ***Solvents and reagents***

Unless otherwise specified, all commercial materials were used without further purification.

CH_2Cl_2 was purified over CaH_2.

- ***Chromatography***

Analytical thin-layer chromatographies (TLC) of all reactions were performed on silica gel 60 F_{254} TLC plates. Visualization of the developed chromatogram was performed by UV absorbance (254 nm) and using ninhydrin stain. Flash chromatography was carried out on silica gel 60 Å (40-63 mm).

- ***Analysis***

Infrared spectra were recorded with a Perkin-Elmer FT-IR Spectrum 1000; absorptions are given in wave numbers (cm^{-1}). The measure was realized neat.

^1H, ^{13}C and spectra were recorded with a Bruker Ultra shield 400 plus (400 MHz).

^1H chemical shifts are reported in delta (δ) units in parts per million (ppm) relative to the singlet at 7.26 ppm for *d*-chloroform (residual $CHCl_3$), to the quintuplet at 2.50 ppm for *d6*-DMSO. ^{13}C chemical shifts are reported in ppm relative to the central line of the triplet at 77.16 ppm for *d*-chloroform, the septuplet at 39.51 for *d6*-DMSO.

The multiplicities are designated as s = singlet; d = doublet; t = triplet; q = quartet; quin = quintuplet; m = multiplet; and br = broad and combinations thereof. All coupling constants (*J* values) are reported in Hertz (Hz).

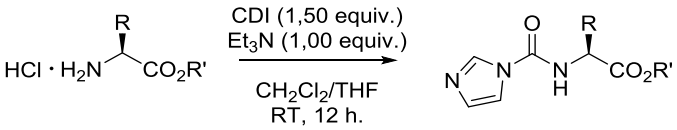
Low resolutions mass spectra were recorded on a Waters QTof-I spectrometer using electrospray ionization, a JEOL AccuTof 4G using chemical ionization and electron ionization and a Waters LCT Premier XE using atmospheric pressure chemical ionization. High resolution mass spectra were obtained using the mass spectrometers operated by the Laboratoire de Mesure Physique of University Montpellier 2.

HPLC analysis were performed on a Shimadzu® LC 20 A with a UV/visible detector PDA.

LC/MS analysis were performed on a Shimadzu® LC/MS 20 A with a Phenomenex Kinetex (3 mm ø x 25 cm x 2,7 µm) with a UV/visible detector PDA.

Optical rotations were measured with an ADP 440 Polarimeter (Bellingham + Stanley)

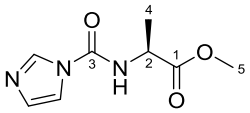
General Procedure A for the Preparation of Imi-AA-OR



To a solution of the corresponding H-AA-OR hydrochloric acid salt (1.00 equiv) in CH_2Cl_2/THF mixture (5:1 v/v respectively, *C* 0.5 M) at room temperature were successively added Et_3N (1.00 equiv.) and *N,N'*-carbonyldiimidazole (1.50 equiv.). The obtained suspension was thus stirred at this temperature for 12 h. After reaction completion, the mixture was washed once with H_2O. The organic phase was separated and the aqueous phase was further extracted with CH_2Cl_2 (2x). The organic layers were combined, dried over $MgSO_4$ and evaporated. Purification was performed by column chromatography on a short silica gel pad to afford the desired compounds.

Note: CH_2Cl_2 (certified ACS 99+%, containing 50 ppm amylene as stabilizer) from Sigma-Aldrich was used as supplied. Caution should be taken with the CH_2Cl_2 quality in order to prevent the formation of undesired side compounds. CH_2Cl_2 stabilized with EtOH might be avoided, otherwise the formation of ethyl 1*H*-imidazole-1- carboxylate could also be detected on the first step.

- **(*S*)-Methyl 2-(1*H*-imidazole-1-carboxamido)propanoate (Imi-Ala-OMe)**



$C_8H_{11}N_3O_3$
197,19

The title compound was purified by short column chromatography (eluent: EtOAc 100%) and isolated as a white solid in 92% yield (2.61 g) from H_2N-Ala-OMe hydrochloric acid salt (2.00 g, 14.4 mmol) following the general procedure A.

$[\alpha]_D^{20}$ = +27.1 (*c* 0.70, $CHCl_3$).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 8.19 (s, 1H, CH_{ar}), 7.42 (s, 1H, H_{ar}), 7.16 (brd, *J* = 7.1 Hz, 1H, NH), 7.08 (s, 1H, CH_{ar}), 4.70-4.63 (m, 1H, H_2), 3.81 (s, 3H, H_5), 1.54 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H, H_4).

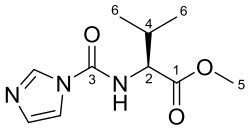
^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.8 (C_1), 148.7 (C_3), 136.1 (CH_{ar}), 129.4 (CH_{ar}), 116.5 (CH_{ar}), 52.5 (C_5), 49.4 (C_2), 17.3 (C_4).

IR (cm^{-1}): 3155.3, 3137.8, 2966.6, 1743.8, 1714.1, 1555.2, 755.7.

MS (ESI+): m/z (%) 198 (100, $[M+H]^+$).

HRMS (ESI+) m/z: Calcd for $C_8H_{12}N_3O_3$ $[M+H]^+$: 198.0879 found 198.0883.

- **(*S*)-Methyl 2-(1*H*-imidazole-1-carboxamido)-3-methylbutanoate (Imi-Val-OMe)**



$C_{10}H_{15}N_3O_3$
225,25

The title compound was purified by short column chromatography (eluent: EtOAc/Pentane 3:7) and isolated as a viscous pale yellow oil in 98% yield (1.32 g) from H_2N-Val-OMe hydrochloric acid salt (1.00 g, 6.00 mmol) following the general procedure A.

$[\alpha]_D^{20}$ = +21.5 (*c* 1.21, $CHCl_3$).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 8.18 (s, 1H, CH_{ar}), 7.41 (s, 1H, CH_{ar}), 7.11 (s, 1H, CH_{ar}), 6.60 (brd, *J* = 8.2 Hz, 1H, NH), 4.60 (dd, *J* = 8.4, 5.1 Hz, 1H, H_2), 3.80 (s, 3H, H_5), 2.24-2.32 (m, 1H, H_4), 1.02 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, H_6), 0.99 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, H_6).

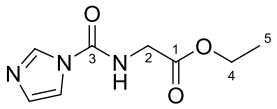
^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.0 (C_1), 148.8 (C_3), 136.1 (CH_{ar}), 130.7 (CH_{ar}), 115.9 (CH_{ar}), 58.8 (C_2), 52.6 (C_5), 31.3 (C_4), 18.9 (C_6), 17.9 (C_6).

IR (cm^{-1}): 3209.8, 3024.3, 2954.6, 1744.5, 1723.1, 1704.4, 1552.0, 743.6.

MS (ESI+): m/z (%) 514 (47), 226 (100, $[M+H]^+$).

HRMS (ESI+) m/z: Calcd for $C_{10}H_{16}N_3O_3$ $[M+H]^+$: 226.1192 found 226.1184.

- **Ethyl 2-(1*H*-imidazole-1-carboxamido)acetate (Imi-Gly-OEt)**



$C_8H_{11}N_3O_3$
197,19

The title compound was purified by short column chromatography (eluent: EtOAc/Pentane 2:8 then EtOAc 100%) and isolated as a white solid in 97% yield (688 mg) from H_2N-Gly-OEt hydrochloric acid salt (500 mg, 3.58 mmol) following the general procedure A.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 8.20 (s, 1H, CH_{ar}), 7.87 (brd, J = 5.2 Hz, 1H, NH), 7.46 (t, J = 1.5 Hz, 1H, CH_{ar}), 7.04 (s, 1H, CH_{ar}), 4.24 (q, J = 7.2 Hz, 2H, H_4), 4.14 (d, J = 5.4 Hz, 2H, H_2), 1.29 (t, J = 7.2 Hz, 3H, H_5).

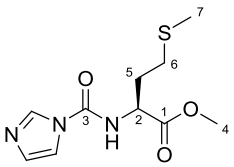
^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 169.4 (C_1), 149.1 (C_3), 136.0 (CH_{ar}), 130.0 (CH_{ar}), 116.4 (CH_{ar}), 61.9 (C_2), 42.3 (C_4), 14.1 (C_5).

IR (cm^{-1}): 3190.4, 3007.2, 2987.6, 1734.2, 1701.9, 1554.9, 737.8.

MS (ESI+): m/z (%) 210 (22), 154 (75), 198 (100, $[M+H]^+$).

HRMS (ESI+) m/z: Calcd for $C_8H_{12}N_3O_3$ $[M+H]^+$: 198.0879 found 198.0885.

- **(*S*)-Methyl 2-(1*H*-imidazole-1-carboxamido)-4-(methylthio)butanoate (Imi-Met-OMe)**



$C_{10}H_{15}N_3O_3S$
257,31

The title compound was purified by column chromatography (eluent: EtOAc/Pentane 8:2 then EtOAc 100%) and isolated as a viscous pale yellow oil in 92% yield (1.19 g) from H_2N-Met-OMe hydrochloric acid salt (1.00 g, 5.00 mmol) following the general procedure A.

$[\alpha]_D^{20}$ = +8.5 (*c* 1.04, $CHCl_3$).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 8.22 (s, 1H, CH_{ar}), 7.43 (s, 1H, CH_{ar}), 7.39 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, NH), 7.09 (s, 1H, CH_{ar}), 4.76-4.81 (m, 1H, H_2), 3.80 (s, 3H, H_4), 2.55-2.67 (m, 2H, H_5), 2.22-2.31 (m, 1H, H_6), 2.13-2.20 (m, 1H, H_6), 2.12 (s, 3H, H_7).

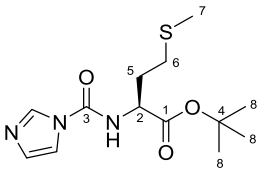
^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 171.9 (C_1), 148.6 (C_3), 136.1 (CH_{ar}), 130.4 (CH_{ar}), 116.1 (CH_{ar}), 53.2 (C_4), 52.9 (C_2), 30.4 (C_5 or C_6), 30.1 (C_5 or C_6), 15.5 (C_7).

IR (cm^{-1}): 3206.3, 2953.6, 2918.1, 1715.9, 1545.3, 738.7.

MS (ESI+): m/z (%) 610 (40), 258 (100, $[M+H]^+$).

HRMS (ESI+) m/z: Calcd for $C_{10}H_{16}N_3O_3S$ $[M+H]^+$: 258.0912 found 258.0912.

- **(*S*)-*tert*-butyl 2-(1*H*-imidazole-1-carboxamido)-4-(methylthio)butanoate (Imi-Met-O*t*Bu)**



$C_{13}H_{21}N_3O_3S$
299,39

The title compound was purified by column chromatography (eluent: EtOAc/Pentane 6:4 then EtOAc 100%) and isolated as a viscous pale yellow oil in 81% yield (1.99 g) from H2N-Met-O*t*Bu hydrochloric acid salt (2.00 g, 8.28 mmol) following the general procedure A.

$[\alpha]_D^{20}$ = +10.4 (*c* 1.15, $CHCl_3$).

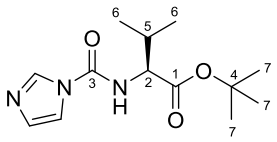
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 8.18 (s, 1H, CH_{ar}), 7.63 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, NH), 7.42 (s, 1H, CH_{ar}), 7.02 (s, 1H, CH_{ar}), 4.59-4.64 (m, 1H, H_2), 2.56 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, H_6), 1.99-2.24 (m, 5H, H_5 and H_7), 1.45 (s, 9H, H_8).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 170.5 (C1), 148.6 (C3), 136.0 (CH_{ar}), 130.2 (CH_{ar}), 116.0 (CH_{ar}), 83.1 (C_4), 53.7 (C_2), 30.9 (C_5 or C_6), 30.0 (C_5 or C_6), 27.9 (3 C_8), 15.4 (C_7).
IR (cm^{-1}): 3209.8, 3129.3, 2977.0, 2918.3, 1720.7, 1544.6, 1150.6, 747.0.

MS (ESI+): m/z (%) 300 (30, $[M+H]^+$), 325 (100).

HRMS (ESI+) m/z: Calcd for $C_{13}H_{22}N_3O_3S$ $[M+H]^+$: 300.1382 found 300.1383.

- **(S)-tert-butyl 2-(1H-imidazole-1-carboxamido)-3-methylbutanoate (Imi-Val-O*t*Bu)**



$C_{13}H_{21}N_3O_3$
267,33

The title compound was purified by column chromatography (eluent: EtOAc/Pentane 6:4 then EtOAc 100%) and isolated as a viscous pale yellow oil in 79% yield (2.01 g) from H_2N-Val-OtBu hydrochloric acid salt (2.00 g, 9.54 mmol) following the general procedure A.

$[\alpha]_D^{20}$ = +31.0 (*c* 1.19, $CHCl_3$).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 8.16 (s, 1H, CH_{ar}), 7.38 (s, 1H, CH_{ar}), 7.10 (s, 1H, CH_{ar}), 6.48 (brd, *J* = 8.0 Hz, 1H, NH), 4.48 (dd, *J* = 8.1, 4.5 Hz, 1H, H_2), 2.25-2.29 (m, 1H, H_5), 1.49 (s, 9H, H_7), 1.00 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, H_6), 0.97 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, H_6).

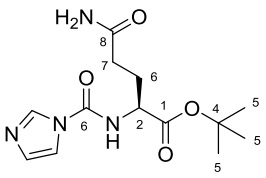
^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 170.8 (C_1), 148.8 (C_3), 136.1 (CH_{ar}), 130.2 (CH_{ar}), 115.9 (CH_{ar}), 82.8 (C_4), 59.2 (C_2), 31.2 (C_5), 27.9 (3 C_7), 18.8 (C_6), 17.9 (C_6).

IR (cm^{-1}): 3213.7, 2970.7, 2935.2, 1718.2, 1540.0, 748.2.

MS (ESI+): m/z (%) 268 (30, $[M+H]^+$), 373 (80), 640 (100).

HRMS (ESI+) m/z: Calcd for $C_{13}H_{22}N_3O_3$ $[M+H]^+$: 268.1661 found 268.1664.

- **tert-butyl (1H-imidazole-1-carbonyl)-L-glutaminate (Imi-Gln-O*t*Bu)**



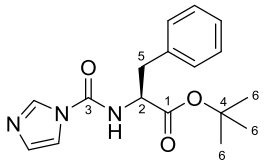
$C_{13}H_{20}N_4O_4$
296,15

The title compound was purified by column chromatography (eluent: EtOAc 100%) and isolated as a viscous pale yellow oil in 87% yield (2.01 g) from H_2N-Gln-O*t*Bu hydrochloric acid salt (2.00 g, 9.54 mmol) following the general procedure A.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm): 8.86 (brd, *J* = 6.0 Hz, 1H, CH_{ar}), 8.19 (s, 1H, CH_{ar}), 7.49 (s, 1H, CH_{ar}), 6.98 (s, 1H, NH), 6.74 (brs, 1H, NH), 6.37 (br. s, 1H, NH), 4.31-4.36 (m, 1H, H_2), 2.41-2.45 (m, 2H, H_7), 2.09-2.18 (m, 2H, H_6), 1.43 (s, 9H, H_5).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm): 176.0 (C_8), 170.3 (C_1), 149.0 (C_6), 136.0 (CH_{ar}), 129.7 (CH_{ar}), 166.4 (CH_{ar}), 82.5 (C_4), 54.4 (C_2), 31.4 (C_7), 27.9 (3 C_5), 25.9 (C_6).

- **(S)-tert-butyl 2-(1H-imidazole-1-carboxamido)-3-phenylpropanoate (Imi-Phe-O*t*Bu)**



$C_{17}H_{21}N_3O_3$
315,37

The title compound was purified by column chromatography (eluent: EtOAc/Pentane 6:4 then EtOAc 100%) and isolated as a viscous pale yellow oil in 75% yield (1.83 g) from H_2N-Phe-OtBu hydrochloric acid salt (2.00 g, 7.76 mmol) following the general procedure A.

$[\alpha]_D^{20}$ = +39.1 (*c* 0.64, $CHCl_3$).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 8.08 (s, 1H, CH_{ar}), 7.27-7.32 (m, 4H, CH_{ar}), 7.17-7.19 (m, 2H, CH_{ar}), 7.06 (s, 1H, CH_{ar}), 6.68 (d, J = 7.3 Hz, 1H, NH), 4.77-4.82 (m, 1H, H_2), 3.24 (dd, J = 13.8, 6.0 Hz, 1H, H_5), 3.21 (dd, J = 13.8, 5.9 Hz, 1H, H_5), 1.46 (s, 9H, H_6).

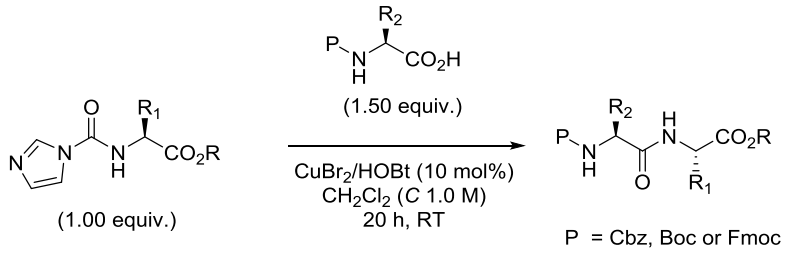
^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 170.2 (C_1), 148.2 (C_3), 136.0 (CH_{ar}), 135.5 (C_{ar}), 130.3 (CH_{ar}), 129.3 (2 CH_{ar}), 128.5 (2 CH_{ar}), 127.2 (CH_{ar}), 115.9 (CH_{ar}), 83.2 (C_4), 55.0 (C_2), 37.6 (C_5), 27.9 (3 C_6).

IR (cm^{-1}): 3293.9, 2978.2, 2934.6, 1716.2, 1544.1, 738.4.

MS (ESI+): m/z (%) 316 (70, $[M+H]^+$), 279 (100).

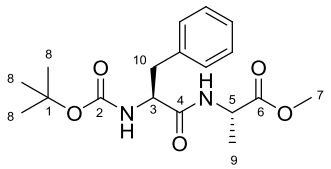
HRMS (ESI+) m/z: Calcd for $C_{17}H_{22}N_3O_3$ $[M+H]^+$: 316.1661 found 316.1661.

General Procedure B for dipeptides synthesis



To a solution of the Imi-AA_1-OR derivative (1.00 equiv.) in CH_2Cl_2 (*C* 1.0 M) at RT (22 °C) were successively added copper bromide (10 mol%) and 1-hydroxybenzotriazole hydrate (10 mol%) followed by P-AA_2-OH (1.50 equiv.). The obtained blue suspension was thus stirred at this temperature for 20 h. After reaction completion (TLC monitoring), the mixture was washed once with aqueous HCl 0.5 N. Then, the aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 (2x). The organic layers were combined, washed with saturated aqueous $NaHCO_3$ and brine. The organic phase was thus dried over $MgSO_4$ and evaporated. Purification was performed by column chromatography on silica gel to afford the dipeptide products.

- **(*S*)-Methyl 2-((*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-phenylpropanamido)propanoate (Boc-Phe-Ala-OMe)**



$C_{18}H_{26}N_2O_5$
350,42

The title compound was purified by short column chromatography (eluent: Pentane/EtOAc 7:3) and isolated as a white solid in 90% yield (160 mg) from Imi-Ala-OMe (100 mg, 0.51 mmol) and Boc-Phe-OH (202 mg, 0.76 mmol) following the general procedure B.

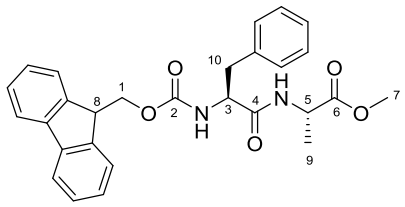
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.20-7.32 (m, 5H, CH_{ar}), 6.37 (d, J = 7.0 Hz, 1H, NH), 4.98 (brs, 1H, NH), 4.52 (quin, J = 7.2 Hz, 1H, H_5), 4.35 (brd, J = 6.3 Hz, 1H, H_3), 3.71 (s, 3H, H_7), 3.02-3.13 (m, 2H, H_{10}), 1.41 (s, 9H, H_8), 1.35 (d, J = 7.2 Hz, 3H, H_9).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.8 (C_6), 171.0 (C_4), 155.3 (C_2), 136.6 (C_{ar}), 129.2 (2 CH_{ar}), 128.3 (2 CH_{ar}), 126.6 (CH_{ar}), 79.8 (C_1), 55.4 (C_3), 52.2 (C_5), 47.9 (C_{10}), 38.3 (C_7), 28.1 (3 C_8), 18.0 (C_9).

Data are in accordance with previously reported analysis.[130]

[130] D. K. Mohapatra, A. Datta, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 6879-6880.

- **(*S*)-Methyl2-((*S*)-2-((((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-3-phenylpropanamido) propanoate (Fmoc-Phe-Ala-OMe)**



$C_{28}H_{28}N_2O_5$
472,54

The title compound was purified by short column chromatography (eluent: Pentane/EtOAc 1:1) and isolated as a white solid in 65% yield (156 mg) from Imi-Ala-OMe (100 mg, 0.51 mmol) and Fmoc-Phe-OH (295 mg, 0.76 mmol) following the general procedure B.

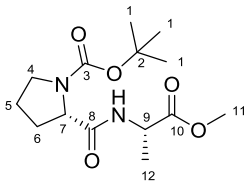
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.76 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH_{ar}), 7.54 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH_{ar}), 7.40 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH_{ar}), 7.19-7.32 (m, 7H, CH_{ar}), 6.44 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H, NH), 5.46 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, NH), 4.40-4.53 (m, 3H, H_1 + H_8), 4.28-4.33 (m, 1H, H_3), 4.18 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, H_5), 3.70 (s, 3H, H_7), 3.12 (dd, *J* = 13.8, 6.0 Hz, 1H, H_{10}), 3.06 (dd, *J* = 13.9, 6.1 Hz, 1H, H_{10}), 1.34 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, H_9).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.7 (C_6), 170.3 (C_4), 155.8 (C_2), 143.7 (C_{ar}), 143.6 (C_{ar}), 141.2 (2 C_{ar}), 136.1 (C_{ar}), 129.3 (2 CH_{ar}), 128.6 (2 CH_{ar}), 127.7 (2 CH_{ar}), 127.0 (2 CH_{ar}), 125.1 (2 CH_{ar}), 125.0 (2 CH_{ar}) ,119.9 (CH_{ar}), 67.1 (C_1), 55.9 (C_3), 52.4 (C_5), 48.1 (C_8), 47.0 (C_7), 38.6 (C_{10}), 18.3 (C_9).

Data are in accordance with previously reported analysis.[131]

[131] B. Kolesinska, Zbigniew J. Kaminski, *Org. Lett*. **2009,** 11, 765-768.

- **(*S*) *tert*-Butyl 2-(((*S*)-1-methoxy-1-oxopropan-2-yl)carbamoyl)pyrrolidine-1-carboxylate (Boc-Pro-Ala-OMe)**



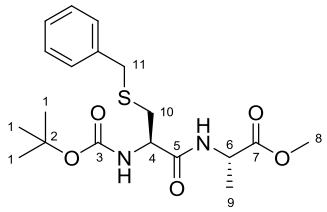
$C_{14}H_{24}N_2O_5$
300,36

The title compound was purified by short column chromatography (eluent: Pentane/EtOAc 7:3) and isolated as a white solid in 61% yield (93 mg) from Imi-Ala-OMe (100 mg, 0.51 mmol) and Boc-Pro-OH (164 mg, 0.76 mmol) following the general procedure B.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 4.51 (brs, 1H, H_7), 4.19-4.31 (m, 1H, H_9), 3.70 (s, 3H, H_{11}), 3.31-3.43 (m, 2H, H_4), 1.84-2.26 (m, 4H, H_5 + H_6), 1.43 (s, 9H, H_1), 1.35 (d, J = 7.1 Hz, 3H, H_{12}).

Data are in accordance with previously reported analysis.[132]

- **(*S*)-Methyl 2-((*R*)-3-(benzylthio)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propanamido) propanoate (Boc-Met-Ala-OMe)**



$C_{19}H_{28}N_2O_5S$
396,50

The title compound was purified by short column chromatography (eluent: Pentane/EtOAc 1:1) and isolated as a white solid in 67% yield (89 mg) from Imi-Ala-OMe (100 mg, 0.51 mmol) and Boc-Cys(Bzl)-OH (105 mg, 0.34 mmol) following the general procedure B.

[132] A. Boruah, A. S. Devi, J. Iqbal, I. Rao, Y. Nageshwara; S. K. Kumar, R. K. Kunwar, *J. Org. Chem.* **2004** , 69, 2181-2184

$[\alpha]_D^{20}$ = +15 (*c* 0.80, $CHCl_3$).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.23-7.35 (m, 5H, CH_{ar}), 6.87 (brd, *J* = 5.4 Hz, 1H, NH), 5.29 (brs, 1H, NH), 4.55 (quin, *J* = 7.2 Hz, 1H, H_4), 4.24-4.25 (m, 1H, H_6), 3.75 (s, 3H, H_8), 3.74 (s, 2H, H_{11}), 2.88 (dd, *J* = 14.0, 5.7 Hz, 1H, H_{10}), 2.74 (dd, *J* = 14.0, 6.6 Hz, 1H, H_{10}), 1.46 (s, 9H, H_1), 1.41 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H, H_9).

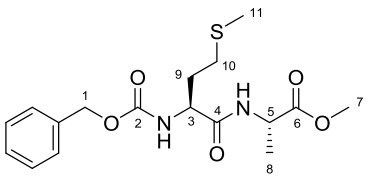
^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.8 (C_7), 170.2 (C_5), 155.2 (C_3), 137.8 (C_{ar}), 128.9 (2 CH_{ar}), 128.5 (2 CH_{ar}), 127.1 (CH_{ar}), 80.2 (C_2), 53.5 (C_4), 52.4 (C_6), 48.1 (C_8), 36.3 (C_{11}), 33.6 (C_{10}), 28.2 (3 C_1), 18.1 (C_9).

IR (cm^{-1}): 3303.9, 3251.8, 2979.3, 1731.5, 1678.4, 1648.5, 1523.3, 704.2.

MS (ESI+): m/z (%) 137 (60), 397 (70, $[M+H]^+$), 419 (100, $[M+Na]^+$).

HRMS (ESI+) m/z: Calcd for $C_{19}H_{29}N_2O_5S$ $[M+H]^+$: 397.1797 found 397.1794.

- **(*S*)-Methyl 2-((2)-2(((benzyloxy)carbonyl)amino)-4-(methylthio)butanamido)propanoate (Cbz-Met-Ala-OMe)**



$C_{17}H_{24}N_2O_5S$
368,45

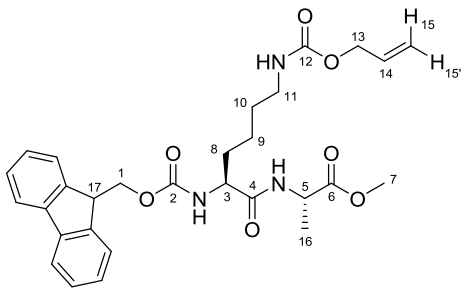
The title compound was purified by short column chromatography (eluent: Pentane/EtOAc 7:3) and isolated as a white solid in 84% yield (158 mg) from Imi-Ala-OMe (100 mg, 0.51 mmol) and Cbz-Met-OH (216 mg, 0.76 mmol) following the general procedure B.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.29-7.38 (m, 5H, CH_{ar}), 6.67 (brd, *J* = 6.2 Hz, 1H, NH), 5.55 (brd, *J* = 7.7 Hz, 1H, NH), 5.11 (s, 2H, H_1), 4.56 (quin, *J* = 7.3 Hz, 1H, H_3), 4.37-4.43 (m, 1H, H_5), 3.74 (s, 3H, H_7), 2.60 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, H_{10}), 1.95-2.11 (m, 5H, H_{11} + H_9), 1.40 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, H_8).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.9 (C_6), 170.8 (C_4), 156.0 (C_2), 136.1 (C_{ar}), 128.4 (2 CH_{ar}), 128.1 (2 CH_{ar}), 127.9 (CH_{ar}), 66.9 (C_1), 53.4 (C_3), 52.4 (C_5), 48.0 (C_7), 31.8 (C_{10}), 29.7 (C_9), 17.9 (C_8), 15.0 (C_{11}).

Data are in accordance with previously reported analysis.[133]

- **(*S*)-Methyl 2-((*S*)-2-((((9*H*-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-6-(((allyloxy)carbonyl)amino)hexanamido)propanoate (Fmoc-Lys(Alloc)-Ala-OMe)**



$C_{29}H_{35}N_3O_7$
537,61

The title compound was purified by short column chromatography (eluent: Pentane/EtOAc 7:3) and isolated as a white solid in 54% yield (147 mg) from Imi-Ala-OMe (100 mg, 0.51 mmol) and Fmoc-Lys(Alloc)-OH (344 mg, 0.76 mmol) following the general procedure B.

$[\alpha]_D^{20}$ = – 12 (c 1.17, $CHCl_3$).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.76 (d, J = 7.5 Hz, 2H, CH_{ar}), 7.59 (d, J = 7.3 Hz, 2H, CH_{ar}), 7.40 (t, J = 7.5 Hz, 2H, CH_{ar}), 7.31 (t, J = 7.5 Hz, 2H, CH_{ar}), 6.52 (d, J = 5.6 Hz, 1H, NH), 5.85-5.93 (m, 1H, H_{14}), 5.53 (d, J = 6.6 Hz, 1H, NH), 5.27 (d, J = 17.0 Hz, 1H, H_{15}), 5.18 (d, J = 10.3 Hz, 1H, $H_{15'}$), 4.95 (brs, 1H, H_{23}), 4.54- 4.61 (m, 2H, H_{13}), 4.39 (d, J = 6.9 Hz, 2H, H_1), 4.17-4.23 (m, 2H, H_3 + H_5), 3.74 (s, 3H, H_7), 3.19-3.20 (m, 2H, H_{11}), 1.85- 1.89 (m, 1H, H_8), 1.68-1.70 (m, 1H, H_8), 1.52-1.57 (m, 2H, H_{10}), 1.41 (d, J = 7.1 Hz, 3H, H_{16}), 1.36-1.42 (m, 2H, H_9).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 173.1 (C_6), 171.5 (C_4), 156.4 (C_{12} or C_2), 156.2 (C_{12} or C_2), 143.7 (C_{ar}), 143.6 (C_{ar}), 141.1 (2 C_{ar}), 132.9 (C_{14}), 127.6 (2 CH_{ar}), 126.9 (2 CH_{ar}), 125.0 (2 CH_{ar}), 119.8 (2 CH_{ar}), 117.4

[133] R. Caputo, E. Cassano, L. Longobardo, D. Mastroianni, G. Palumbo, *Synthesis*, **1995,** 2, 141-143.

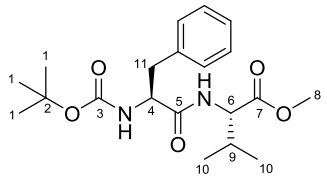
(C_{15}), 67.0 (C_1), 65.3 (C_{13}), 54.3 (C_3), 52.4 (C_5), 47.9 (C_7), 46.9 (C_{23}), 40.2 (C_{11}), 32.2 (C_{10}), 29.1 (C_8), 22.0 (C_9), 17.7 (C_{16}).

IR (cm^{-1}): 3295.8, 3067.8, 2943.4, 2863.0, 1740.7, 1686.8, 1615.2, 1531.6.

MS (ESI+): m/z (%) 538 (100, $[M+H]^+$).

MS (ESI+): m/z (%): Calcd for $C_{29}H_{36}N_3O_7$ $[M+H]^+$: 538.2543 found 538.2548.

- **(*S*)-Methyl 2-(*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino-3-phenylpropanamido)-3- methylbutanoate (Boc-Phe-Val-OMe)**



$C_{20}H_{30}N_2O_5$
378,47

The title compound was purified by short column chromatography (eluent: Pentane/EtOAc 7:3) and isolated as a white solid in 62% yield (104 mg) from Imi-Val-OMe (100 mg, 0.44 mmol) and Boc-Phe-OH (177 mg, 0.67 mmol) following the general procedure B.

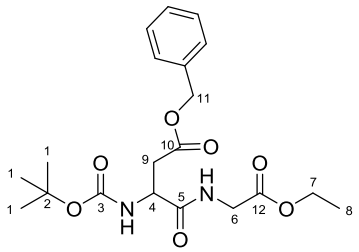
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.21-7.32 (m, 5H, CH_{ar}), 6.34 (d, J = 8.4 Hz, 1H, NH), 5.00 (brs, 1H, NH), 4.46 (dd, J = 8.6, 5.1 Hz, 1H, H_6), 4.32-4.37 (m, 1H, H_4), 3.69 (s, 3H, H_8), 3.07 (d, J = 6.9 Hz, 2H, H_{11}), 2.08-2.12 (m, 1H, H_9), 1.42 (s, 9H, H_1), 0.87 (d, J = 6.9 Hz, 3H, H_{10}), 0.84 (d, J = 6.9 Hz, 3H, H_{10}).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 171.7 (C_5 or C_7), 171.1 (C_5 or C_7), 155.4 (C_3), 136.6 (C_{ar}), 129.3 (2 CH_{ar}), 128.6 (2 CH_{ar}), 126.9 (CH_{ar}), 80.2 (C_2), 57.2 (C_4 or C_6), 55.8 (C_4 or C_6), 52.0 (C_8), 38.0 (C_9), 31.2 (C_{11}), 28.2 (3 C_1), 18.8 (C_{10}), 17.7 (C_{10}).

Data are in accordance with previously reported analysis.[134]

[134] B. Delpech, F. Fecourt, O. Melnyk, D. Crich, *Org. Lett*. **2013**, 15, 3758-3761.

- **(*S*)-Benzyl 3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-4-((2-ethoxy-2-oxoethyl)amino)-4- oxobutanoate (Boc-Asp(OBn)-Gly-OEt)**



$C_{20}H_{28}N_2O_7$
408,45

The title compound was purified by short column chromatography (eluent: Pentane/EtOAc 7:3) and isolated as a pale oil in 74% yield (153 mg) from Imi-Gly-OEt (100 mg, 0.51 mmol) and Boc-Asp(OBzl)-OH (246 mg, 0.76 mmol) following the general procedure B.

$[\alpha]_D^{20}$ = +5.7 (*c* 1.05, $CHCl_3$).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.32-7.38 (m, 5H, CH_{ar}), 6.99 (brs, 1H, NH), 5.69 (brd, *J* = 8.4 Hz, 1H, NH), 5.15 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, H_{11}), 5.11 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, H_{11}), 4.58 (brs, 1H, H_4), 4.20 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, H_7), 3.99 (brd, *J* = 4.5 Hz, 2H, H_6), 3.07 (dd, *J* = 17.2 , 4.1 Hz, 1H, H_9), 2.73 (dd, *J* = 17.2, 6.0 Hz, 1H, H_9), 1.45 (s, 9H, H_1), 1.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, H_8).

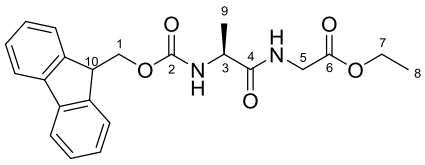
^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 171.6 (C_5), 170.9 (C_{10} or C_{12}), 169.3 (C_{10} or C_{12}), 155.4 (C_3), 135.3 (C_{ar}), 128.5 (2 CH_{ar}), 128.3 (CH_{ar}), 128.2 (2 CH_{ar}), 80.5 (C_2), 66.8 (C_{11}), 61.4 (C_7), 50.4 (C_4), 41.4 (C_6), 36.0 (C_9), 28.2 (3 C_1), 14.1 (C_8).

IR (cm^{-1}): 3295.8, 3067.8, 2943.4, 2863.0, 1740.7, 1686.8, 1615.2, 1531.6.

MS (ESI+): m/z (%) 353 (80), 409 (100, $[M+H]^+$), 431 (40, $[M+Na]^+$).

MS (ESI+): m/z (%): Calcd for $C_{20}H_{29}N_2O_7$ $[M+H]^+$: 409.1975 found 409.1974.

- **(S)-Ethyl 2-(2-((((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)propanamido)acetate (Fmoc-Ala-Gly-OEt)**



$C_{22}H_{24}N_2O_5$
396,44

The title compound was purified by short column chromatography (eluent: Pentane/EtOAc 7:3) and isolated as a white solid in 66% yield (133 mg) from Imi-Gly-OEt (100 mg, 0.51 mmol) and Fmoc-Ala-OH (237 mg, 0.76 mmol) following the general procedure B.

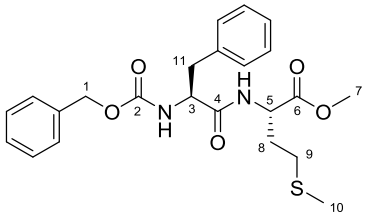
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.76 (d, J = 7.5 Hz, 2H, CH_{ar}), 7.58 (brd, J = 7.3 Hz, 2H, CH_{ar}), 7.40 (t, J = 7.4 Hz, 2H, CH_{ar}), 7.31 (dt, J = 1.0, 7.4 Hz, 2H, CH_{ar}), 6.56 (brs, 1H, NH), 5.39 (brd, J = 5.2 Hz, 1H, NH), 4.41-4.42 (m, 2H, H_1), 4.31 (brt, J = 6.9 Hz, 1H, H_{10}), 4.20 (brq, J = 7.4 Hz, 3H, H_7 + H_3), 4.02-4.03 (m, 2H, H_5), 1.42 (brd, J = 6.7 Hz, 3H, H_9), 1.27 (t, J = 7.1 Hz, 3H, H_8).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.5 (C_4), 169.6 (C_6), 155.9 (C_2), 143.7 (2 C_{ar}), 141.2 (2 C_{ar}), 127.7 (2 CH_{ar}), 127.0 (2 CH_{ar}), 125.0 (2 CH_{ar}), 119.9 (2 CH_{ar}), 67.0 (C_1), 61.6 (C_7), 50.4 (C_3), 47.1 (C_{10}), 41.3 (C_5), 18.6 (C_9), 14.1 (C_8).

Data are in accordance with previously reported analysis.[135]

[135] J. K. Zbigniew, B. Kolesinska, J. Kolesinska, G. Sabatino, M. Chelli, P. Rovero, M. Blaszczyk, Marek L. Glowka, A. - M. Papini, *J. Am. Chem. Soc*. **2005**, *127*, 16912-16920.

- **(*S*)-Methyl 2-((*S*)-2-(benzyloxy)carbonyl)amino)-3-phenylpropanamido)-4-(methylthio)butanoate (Cbz-Phe-Met-OMe)**



$C_{23}H_{28}N_2O_5S$
444,54

The title compound was purified by short column chromatography (eluent: Pentane/EtOAc 7:3) and isolated as a white solid in 68% yield (117 mg) from Imi-Met-OMe (100 mg, 0,39 mmol) and Cbz-Phe-OH (174 mg, 0.58 mmol) following the general procedure B.

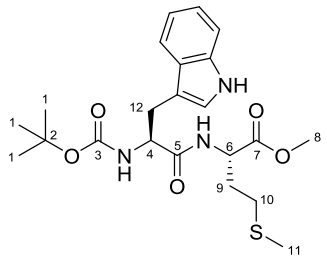
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.18-7.36 (m, 10H, CH_{ar}), 6.42 (d, J = 7.6 Hz, 1H, NH), 5.26 (brd, J = 6.4 Hz, 1H, NH), 5.10 (s, 2H, H_1), 4.60-4.65 (m, 1H, H_3 or H_5), 4.41-4.46 (m, 1H, H_3 or H_5), 3.71 (s, 3H, H_7), 3.14 (dd, J = 13.7, 6.3 Hz, 1H, H_{11}), 3.04 (dd, J = 13.8, 6.9 Hz, 1H, H_{11}), 2.37-2.40 (m, 2H, H_9), 1.87-2.14 (m, 5H, H_8 + H_{10}).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 171.7 (C_4 or C_6), 170.7 (C_4 or C_6), 155.8 (C_2), 136.1 (C_{ar}), 136.0 (C_{ar}), 129.2 (2 CH_{ar}), 128.6 (2 CH_{ar}), 128.4 (2 CH_{ar}), 128.1 (2 CH_{ar}), 127.9 (CH_{ar}), 126.9 (CH_{ar}), 67.0 (C_1), 56.0 (C_3 or C_5), 52.4 (C_3 or C_5), 51.5 (C_7), 38.2 (C_{11}), 31.3 (C_8), 29.6 (C_9), 15.3 (C_{10}).

Data are in accordance with previously reported analysis.[136]

[136] R. Dembinski, Markowicz, Marcin W. Markowicz, *Synthesis* **2004,** 1, 80-86

- **(*S*)-Methyl 2-((*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-(1*H*-indol-3-yl)propanamindo)-4-(methylthio)butanoate (Boc-Trp-Met-OMe)**



$C_{22}H_{31}N_3O_5S$
449,56

The title compound was purified by short column chromatography (eluent: Pentane/EtOAc 7:3) and isolated as a white solid in 70% yield (122 mg) from Imi-Met-OMe (100 mg, 0,39 mmol) and Boc-Trp-OH (177 mg, 0.58 mmol) following the general procedure B.

$[\alpha]_D^{20}$ = +2.1 (*c* 0.97, $CHCl_3$).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 8.19 (brs, 1H, NH), 7.64 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, CH_{ar}), 7.36 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, CH_{ar}), 7.17-7.21 (m, 1H, CH_{ar}), 7.11-7.15 (m, 1H, CH_{ar}), 7.09 (brs, 1H, CH_{ar}), 6.45 (brd, *J* = 5.9 Hz, 1H, NH), 5.16 (brs, 1H, NH), 4.55-4.60 (m, 1H, H_4 or H_6), 4.46-4.46 (m, 1H, H_4 or H_6), 3.65 (s, 3H, H_8), 3.35 (dd, *J* = 14.5, 5.4 Hz, 1H, H_{12}), 3.16 (dd, *J* = 14.5, 7.1 Hz, 1H, H_{12}), 2.26 (m, 2H, H_{10}), 1.99-2.04 (m, 4H, H_{10} + H_9), 1.82-1.89 (m, 1H, H_9), 1.44 (s, 9H, H_1).

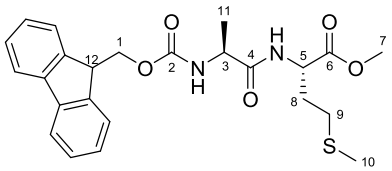
^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 171.7 (C_5 or C_7), 171.5 (C_5 or C_7), 155.4 (C_3), 136.2 (C_{ar}), 127.4 (C_{ar}), 123.3 (CH_{ar}), 122.2 (CH_{ar}), 119.7 (CH_{ar}), 118.7 (CH_{ar}), 111.2 (CH_{ar}), 110.3 (C_{ar}), 80.1 (C_2), 55.3 (C_4 or C_6 or C_8), 52.4 (C_4 or C_6 or C_8), 51.5 (C_4 or C_6 or C_8), 31.4 (C_9), 29.5 (C_{10}), 28.2 (3 C_1), 28.0 (C_{12}), 15.2 (C_{11}).

IR (cm^{-1}): 3316.1, 2977.2, 2920.6, 1660.3, 1501.3, 741.1.

MS (ESI+): m/z (%) 450 (100, $[M+H]^+$), 475 (10, $[M+Na]^+$).

MS (ESI+): m/z (%): Calcd for $C_{22}H_{32}N_3O_5S$ $[M+H]^+$: 450.2063 found 450.2054.

- **(*S*)-methyl 2-((*S*)-2-((((9*H*-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)propanamido)-4-(methylthio)butanoate (Fmoc-Ala-Met-OMe)**



$C_{24}H_{28}N_2O_5S$
456,55

The title compound was purified by short column chromatography (eluent: Pentane/EtOAc 7:3) and isolated as a white solid in 52% yield (177 mg) from Imi-Met-OMe (100 mg, 0.39 mmol) and Fmoc-Ala-OH (181 mg, 0.58 mmol) following the general procedure B.

$[\alpha]_D^{20}$ = +6.9 (*c* 0.72, $CHCl_3$).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.76 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH_{ar}), 7.59 (brd, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH_{ar}), 7.39 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH_{ar} 7.30 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH_{ar}), 6.83 (brd, *J* = 7.1 Hz, 1H, NH), 5.51 (brd, *J* = 7.1 Hz, 1H, NH), 4.68-4.73 (m, 1H, H_3 or H_5), 4.30-4.40 (m, 3H, H_1 + H_3 or H_5), 4.21 (brt, *J* = 7.0 Hz, 1H, H_{12}), 3.74 (s, 3H, H_7), 2.49 (m, 2H, H_9), 1.94-2.20 (m, 5H, H_8 + H_{10}), 1.41 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H, H_{11}).

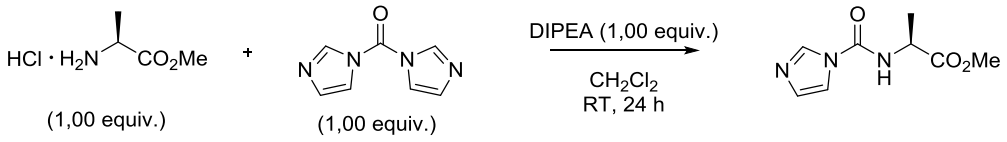
^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.1 (C_4 or C_6), 172.1 (C_4 or C_6), 156.0 (C_2), 143.7 (2 C_{ar}), 141.2 (C_{ar}), 141.2 (C_{ar}), 127.7 (2 CH_{ar}), 127.0 (2 CH_{ar}), 125.0 (2 CH_{ar}), 119.9 (2 CH_{ar}), 67.1 (C_1), 52.5 (C_3 or C_5 or C_7), 51.5 (C_3 or C_5 or C_7), 50.4 (C_3 or C_5 or C_7), 47.0 (C_{12}), 31.4 (C_8), 29.8 (C_9), 18.6 (C_{11}), 15.4 (C_{10}).

IR (cm^{-1}): 3297.0, 3063.9, 1737.7, 1688.3, 1650.6, 1532.2, 730.3.

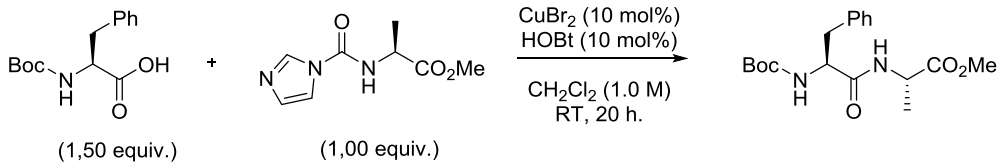
MS (ESI+): m/z (%) 457 (100, $[M+H]^+$).

MS (ESI+): m/z (%): Calcd for $C_{24}H_{29}N_2O_5S$ $[M+H]^+$: 457.1797 found 457.1799.

Procedure for the multigram scale synthesis of Boc-Phe-Ala-OMe[110]



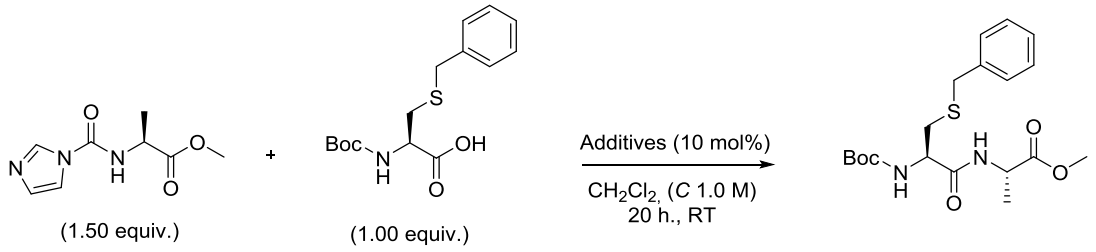
A 500-mL round-bottomed, single-neck flask is charged with *N,N*'-carbonyldiimidazole (CDI) (11.6 g, 71.6 mmol) which was weighed into the flask under air, followed by dichloromethane (CH_2Cl_2) (40 mL, *c* 2.7 M). The slight turbid suspension is placed at 0 °C and stirred. A second 250-mL round-bottomed, is then charged with L-alanine methyl ester hydrochloride (HCl·H_2N-Ala-OMe) (10.0 g, 71.6 mmol) followed by CH_2Cl_2 (80 mL, *c* 0.6 M). A white suspension is observed. Then, diisopropylethylamine (DIPEA) (9.25 g, 12.5 mL, 71.6 mmol) is added. At this stage, the suspension turns to a clear solution. The so obtained solution is then transferred to a 250-mL dropping funnel (20 x 5 cm). The dropping funnel is thus placed over the 500-mL round-bottomed flask containing the CDI suspension which was previously placed at 0 °C. At this point, the solution of the amino acid with DIPEA that was stored in the dropping funnel is added dropwise over 40 minutes to the flask containing the CDI-suspension at 0 °C. As the reaction progresses, the suspension solubilization increases, and the solution thus obtained becomes clear and colorless in appearance. After the complete addition of the L-alanine methyl ester solution, the final mixture is then stirred at room temperature (23 °C) for 24 h. Upon completion of the reaction, the mixture is concentrated using a rotary evaporator (30 °C water bath, 40 mmHg). Then, EtOAc (200 mL) is added and the solution is transferred to a 1.0 L separatory funnel. The mixture is washed once with deionized water (150 mL). The aqueous layer is separated and further extracted with EtOAc (2 x 60 mL). The combined organic layers are dried over magnesium sulfate ($MgSO_4$) (50 g), filtered through a glass filter funnel fulfilled with cotton, and concentrated using a rotary evaporator (30 °C water bath, 10 mmHg) to obtain a viscous oil. The crude product is purified by flash chromatography on silica gel to afford Imi-Ala-OMe (10.8 g, 77%) as a white solid.



A 100-mL round-bottomed, single-neck flask is charged with methyl (1*H*-imidazole-1- carbonyl)-L-alaninate (8.0 g, 40.6 mmol), followed by CH_2Cl_2 (41 mL, *c* 1.0 M). The clear colorless solution obtained was placed at 25 °C. Then, to this solution were successively added Boc-L-Phenylalanine (Boc-Phe-OH) (16.16 g, 60.9 mmol), 1-hydroxybenzotriazole hydrate (HOBt hydrate) (549 mg, 10 mol%, 4.06 mmol) and copper(II) bromide ($CuBr_2$) (907 mg, 10 mol%, 4.06 mmol). The flask is closed with a rubber septum equipped with a needle. As the reaction progresses, $CuBr_2$ becomes more and more soluble and the solution evolves from slight pale blue into deep turquoise/blue slurry. The reaction is stirred at 25 °C for 20 h. Upon completion of the reaction (TLC monitoring), the mixture is transferred into 1.0 L Erlenmeyer flask, diluted with CH_2Cl_2 (250 mL) and quenched with an aqueous solution of 0.5 N HCl (100 mL). Afterwards, the mixture is transferred to a 1.0 L separatory funnel. The aqueous layer is separated and further extracted with CH_2Cl_2 (1 x 50 mL). Thus, the combined organic layers are washed with a saturated solution of sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) (100 mL), and the aqueous layer is further extracted with CH_2Cl_2 (1 x 50 mL). The combined organic layers are then washed with brine (100 mL), dried over $MgSO_4$ (50 g) (Note 16), filtered through a glass filter funnel fulfilled with cotton, and concentrated using a rotary evaporator (30 °C water bath, 10 mmHg) to obtain a white solid. The crude product is purified by flash chromatography on silica gel to afford Boc-Phe-Ala-OMe (12.4g, 87%) as a white foam.

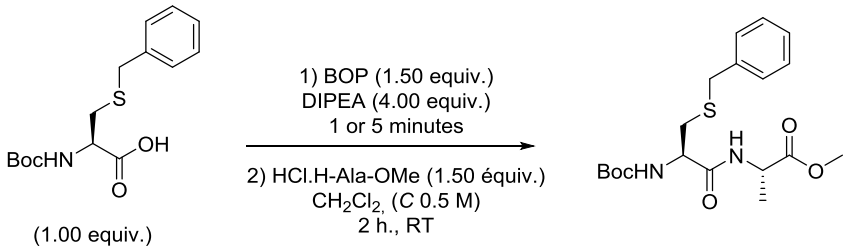
Racemization studies on Boc-Cys(Bzl)-Ala-OMe dipeptide

CDI-mediated α-amino ester activation:



To a solution of Imi-Ala-OMe (1.50 equiv) in CH_2Cl_2 (*C* 1.0 M) at RT were successively added copper bromide (10 mol%) and 1-hydroxybenzotriazole hydrate (10 mol%) followed by Boc- L-Cys(Bzl)-OH or Boc-D-Cys(Bzl)-OH (1.00 equiv). The reaction was stirred at RT for 20 h. After reaction completion, the mixture was washed once with aqueous HCl 0.5 N. Then, the aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 (2x). The organic layers were combined, washed with saturated aqueous $NaHCO_3$ and brine. The organic phase was then dried over $MgSO_4$ and evaporated. The resulting crude product was analyzed by chiral HPLC and proton NMR. The yield was determined after column chromatography on silica gel (eluent: Pentane/EtOAc 7:3 then Pentane/EtOAc 1:1).

BOP carboxyl-function activation reaction:



To a solution of Boc-L-Cys(Bzl)-OH (1.00 equiv.) in CH_2Cl_2 (*C* 0.5 M) at RT were successively added (Benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP) (1.50 equiv.) and *N,N'*-Diisopropylethylamine (DIPEA) (4.00 equiv.). After 1 minute (or 5 minutes) of pre-activation, H-

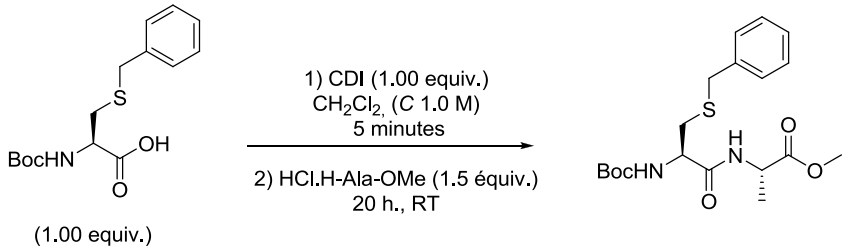
Ala-OMe hydrochloric acid salt (1.50 equiv.) was added. The reaction was stirred at RT for 2 h. After reaction completion, the mixture was washed once with aqueous HCl 0.5 N. The resulting aqueous phase was further extracted with CH_2Cl_2 (2x). The organic phases were combined and washed with saturated aqueous $NaHCO_3$ and brine. The organic phase was dried over $MgSO_4$ and evaporated. The resulting crude product was analyzed by chiral HPLC and proton NMR. The yield was determined after column chromatography on silica gel (eluent: Pentane/EtOAc 7:3 then Pentane/EtOAc 1:1): 87% (5 minutes pre-activation) and 80% (1 minute pre-activation).

Note:

i) The same reaction was carried out as described above using: Boc-L-Cys(Bzl)-OH (1.00 equiv.), BOP (1.50 equiv.), DIPEA (2.00 equiv.) in CH_2Cl_2 (*C* 0.5 M) at RT. After 5 minutes of pre-activation, H-Ala-OMe hydrochloric acid salt (1.50 equiv.) was added. After work-up as described above, the crude product was analyzed by chiral HPLC. The crude compound showed a less clean HPLC chromatogram compared with the crude samples of the previous reactions (CDI-amine activation and 4.00 equiv. of BOP). Thus, estimated epimerization level was given due to this complex crude chromatogram. The yield was determined after column chromatography on silica gel (eluent: Pentane/EtOAc 7:3 then Pentane/EtOAc 1:1) (41%).

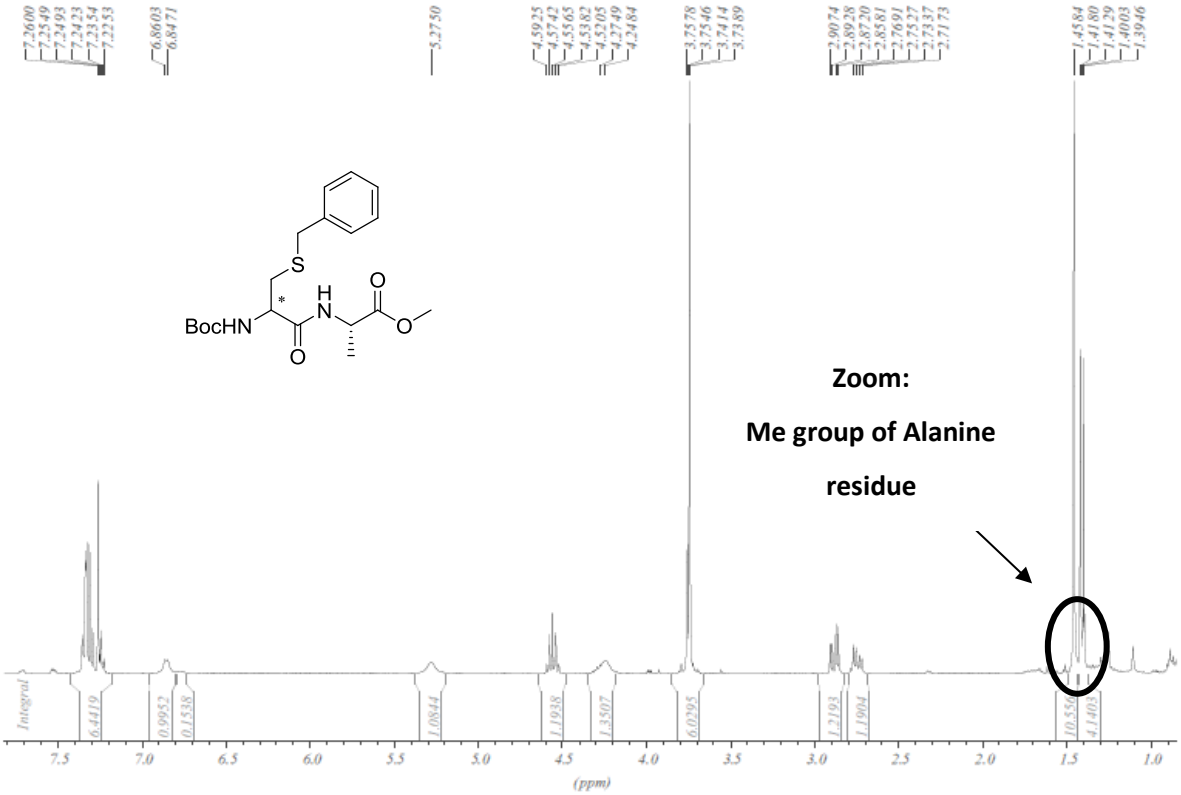
ii) In the second experiment, commercially available H-Ala-OMe hydrochloric acid salt (1.50 equiv) was solubilized in CH_2Cl_2 and extracted with saturated aqueous $NaHCO_3$ (2x) and brine (1x). The organic phase was then dried over $MgSO_4$ and the solvent evaporated under reduced pressure. In another flask, Boc-Cys(Bzl)-OH (1.00 equiv) was pre-activated over 5 minutes with BOP (1.50 equiv) and DIPEA (1.00 equiv) in CH_2Cl_2 (*C* 0.5 M). Then, this solution was added to the free H_2N-Ala-OMe and the mixture was agitated at RT for 2 h. As previously observed, after the work-up, the crude product was analyzed by chiral HPLC and a less clean HPLC chromatogram was obtained. Consequently, the epimerization level is estimated due to the complex crude HPLC chromatogram. The yield was determined after column chromatography on silica gel (eluent: Pentane/EtOAc 7:3 then Pentane/EtOAc 1:1) (27%).

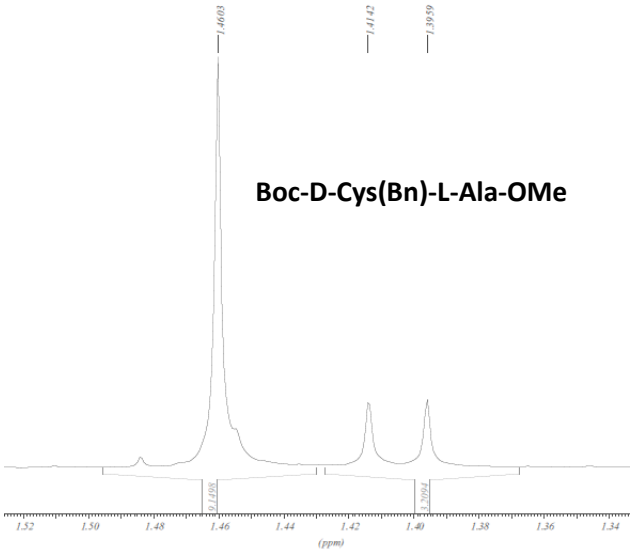
CDI-mediated carboxylic acid activation reaction:

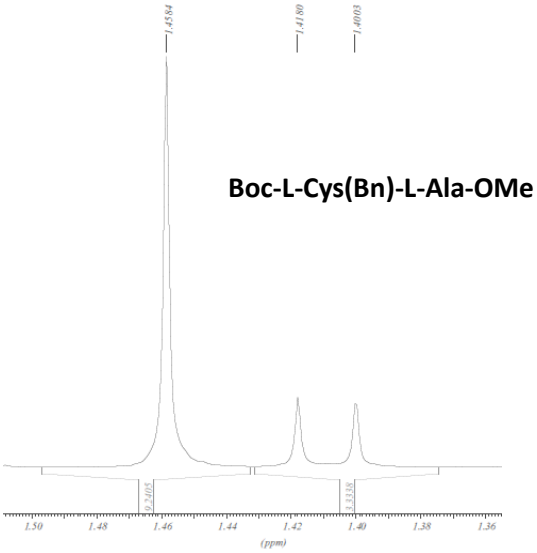


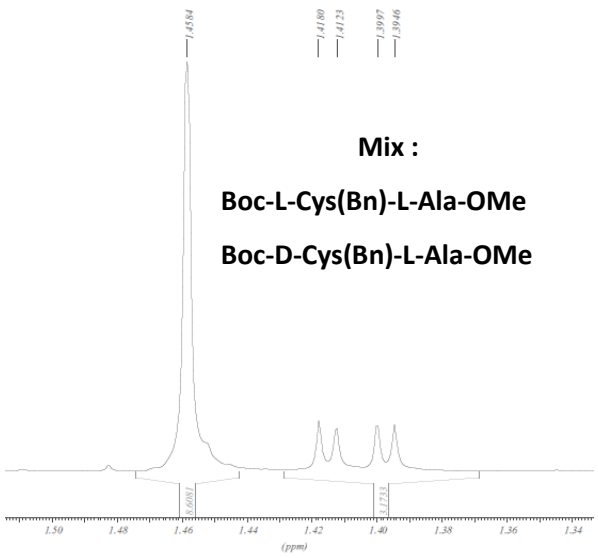
To a solution of Boc-L-Cys(Bzl)-OH (1.00 equiv.) in CH_2Cl_2 (*C* 1.0 M) at RT °C was added CDI (1.00 equiv.). After 5 minutes of activation, H-Ala-OMe hydrochloric acid salt (1.50 equiv.) was added. After 20 h of reaction, the mixture was washed once with aqueous HCl 0.5 N. Then, the aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 (2x). The organic layers were combined, washed with saturated aqueous $NaHCO_3$ and brine. The organic phase was then dried over $MgSO_4$ and evaporated. The resulting crude product was analyzed by chiral HPLC and proton NMR (please see below). The yield (80%) was determined after a column chromatography on silica gel (eluent: Pentane/EtOAc 7:3 then Pentane/EtOAc 1:1).

1H NMR studies



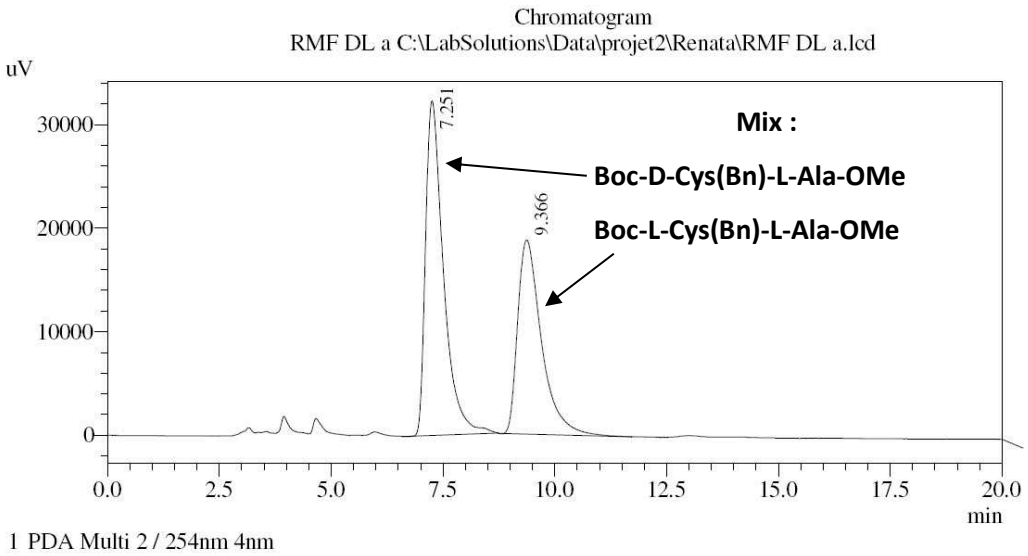






Chiral HPLC studies

Analytical Conditions: Chiral HPLC analytical column CHIRALCEL® OD-H (250 x 4.6 mm ID); *n*hexane/*i*PrOH 90:10; flow rate: 1.0 mL/min, 25 °C. Detection: 214 nm.



PeakTable

PDA Ch2 254nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	7.251	902158	32303	56.499	63.271
2	9.366	694623	18752	43.501	36.729
Total		1596781	51055	100.000	100.000

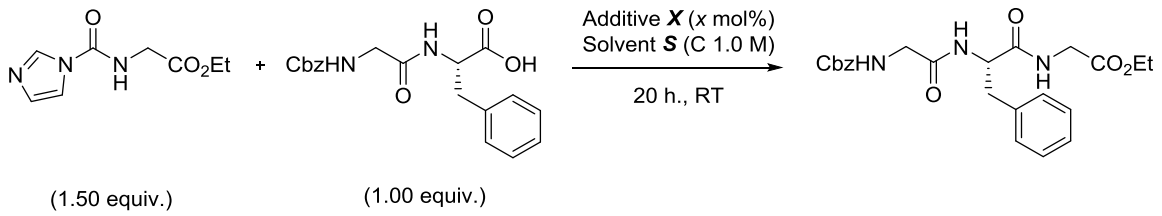
- **Summary table for Boc-Cys(Bn)-Ala-OMe studies:**

Conditions / Additives	Yield (after column chromatography)	Racemization
CDI α-amino ester method: No additives	60%	-
CDI α-amino ester method: Imidazole (10 mol%)	55%	-
CDI α-amino ester method: $CuBr_2$ (10 mol%)	64%	-
CDI α-amino ester method: PTSA (10 mol%)	65%	-
CDI α-amino ester method: HOBt (10 mol%)	61%	-
CDI α-amino ester method: $CuBr_2$/HOBt (10 mol%)	67%	-
CDI α-amino ester method: No additives Micro-waves in CH_2Cl_2 (60 °C, 45 min.)	49%	8.9%
CDI α-amino ester method: No additives Micro-waves in DMF (60 °C, 45 min.)	10%	0.6%
CDI α-amino ester method: No additives Micro-waves in CH_2Cl_2 (45 °C, 75 min.)	55%	2.4%
CDI-mediated carboxylic acid activation (5minutes activation)	80%	8%
BOP (1.5 equiv) and DIPEA (4 equiv) HCl·H_2NAlaOMe, (1 minute pre-activation)	80%	12%
BOP (1.5 equiv) and DIPEA (4 equiv) HCl·H_2NAlaOMe, (5 minutes pre-activation)	87%	35%
BOP (1.5 equiv) and DIPEA (2 equiv) HCl·H_2NAlaOMe, (5 minutes pre-activation)	41%	7%

BOP (1.5 equiv) and DIPEA (1 equiv) **H_2NAlaOMe, (5 minutes pre-activation)**	27%	1.5%

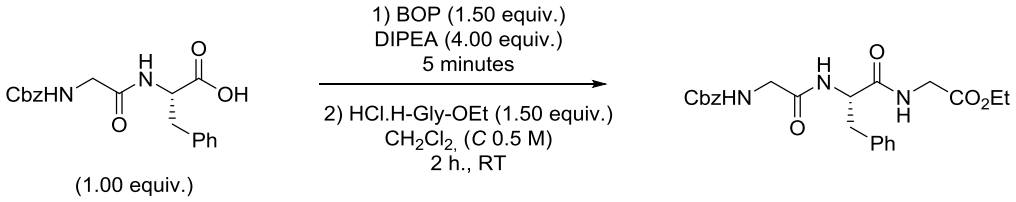
Racemization studies on Cbz-Gly-(L)-Phe-Gly-OEt tripeptide (Anderson's test)

CDI-mediated α-amino ester activation:



To a solution of the corresponding Imi-Gly-OEt (1.50 equiv, 200 mg, 1.01 mmol) in solvent ***S*** (*C* 1.0 M) at RT were successively added Cbz-Gly-(L)-Phe-OH (1.00 equiv, 240 mg, 0.67 mmol) and additives ***X*** (*x* mol%). The reaction was stirred at this temperature for 20h. After reaction completion (TLC monitoring), the mixture was washed once with aqueous HCl 0.5 N. The resulting aqueous phase was further extracted with CH_2Cl_2 (2 x). The organic phases were combined and washed with saturated aqueous $NaHCO_3$ and brine. The organic phase was dried over $MgSO_4$ and evaporated. The resulting crude product was analyzed by chiral HPLC. The yield was determined after column chromatography on silica gel (eluent: Pentane/EtOAc 5:5).

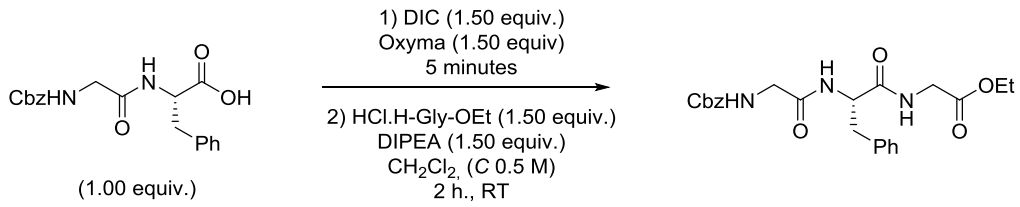
BOP carboxyl-function activation reaction:



To a solution of Cbz-Gly-(L)-Phe-OH (1.00 equiv.) in CH_2Cl_2 (*C* 0.5 M) at RT were successively added (Benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP) (1.50 equiv.) and *N,N'*-Diisopropylethylamine (DIPEA) (4.00 equiv.). After 5 minutes of pre-activation, H-Gly-OEt

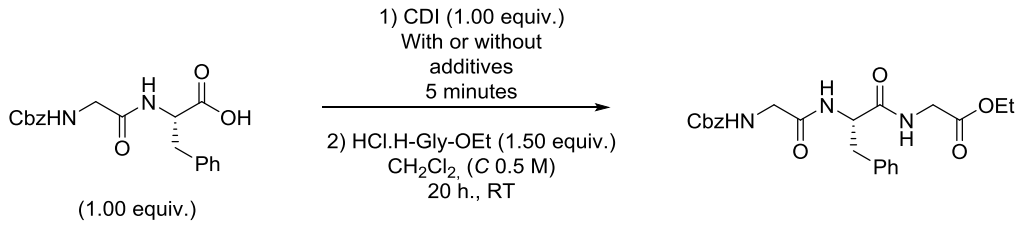
hydrochloric acid salt (1.50 equiv.) was added. The reaction was stirred at RT for 2 h. After reaction completion, the mixture was washed once with aqueous HCl 0.5 N. The resulting aqueous phase was further extracted with CH_2Cl_2 (2x). The organic phases were combined and washed with saturated aqueous $NaHCO_3$ and brine. The organic phase was dried over $MgSO_4$ and evaporated. The resulting crude product was analyzed by chiral HPLC. The yield was determined after column chromatography on silica gel (eluent: Pentane/EtOAc 5:5).

DIC/OXYMA carboxyl-function activation reaction:[107]



To a solution of Cbz-Gly-(L)-Phe-OH (1.00 equiv.) in CH_2Cl_2 (*C* 0.5 M) at RT were successively added N,N'-Diisopropylcarbodiimide (DIC) (1.50 equiv.) and Oxyma (1.50 equiv.). After 5 minutes of pre-activation, H-Gly-OEt hydrochloric acid salt (1.50 equiv.) and *N,N'*-Diisopropylethylamine (DIPEA) (1.50 equiv.) were added. The reaction was stirred at RT for 2 h. After reaction completion, the mixture was washed once with aqueous HCl 0.5 N. The resulting aqueous phase was further extracted with CH_2Cl_2 (2x). The organic phases were combined and washed with saturated aqueous $NaHCO_3$ and brine. The organic phase was dried over $MgSO_4$ and evaporated. The resulting crude product was analyzed by chiral HPLC. The yield was determined after column chromatography on silica gel (eluent: Pentane/EtOAc 5:5).

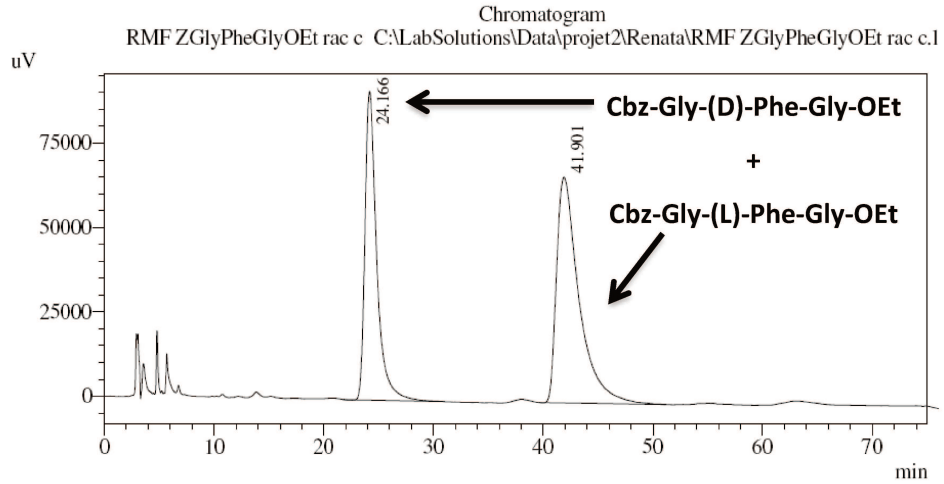
CDI-mediated carboxylic acid activation reaction:



To a solution of Cbz-Gly-(L)-Phe-OH (1.00 equiv.) in CH_2Cl_2 (*C* 1.0 M) at RT was added CDI (1.00 equiv.) and additives (HOBt/$CuBr_2$ (10 mol%). After 5 minutes of activation, H-Gly-OEt hydrochloric acid salt (1.50 equiv.) was added. After 20 h of reaction, the mixture was washed once with aqueous HCl 0.5 N. Then, the aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 (2x). The organic layers were combined, washed with saturated aqueous $NaHCO_3$ and brine. The organic phase was then dried over $MgSO_4$ and evaporated. The resulting crude product was analyzed by chiral HPLC. The yield was determined after column chromatography on silica gel (eluent: Pentane/EtOAc 5:5).

Chiral HPLC studies

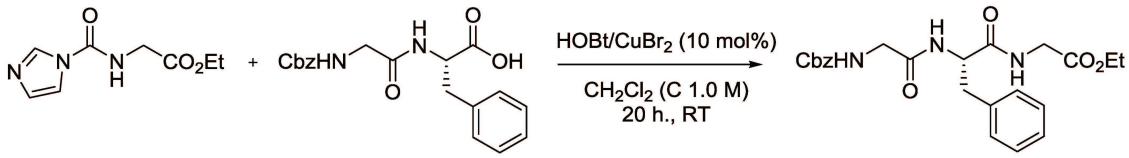
Analytical Conditions: Chiral HPLC analytical column CHIRALCEL® AD (250 x 4.6 mm ID); *n*hexane/*i*PrOH 80:20; flow rate: 1.0 mL/min, 25 °C.



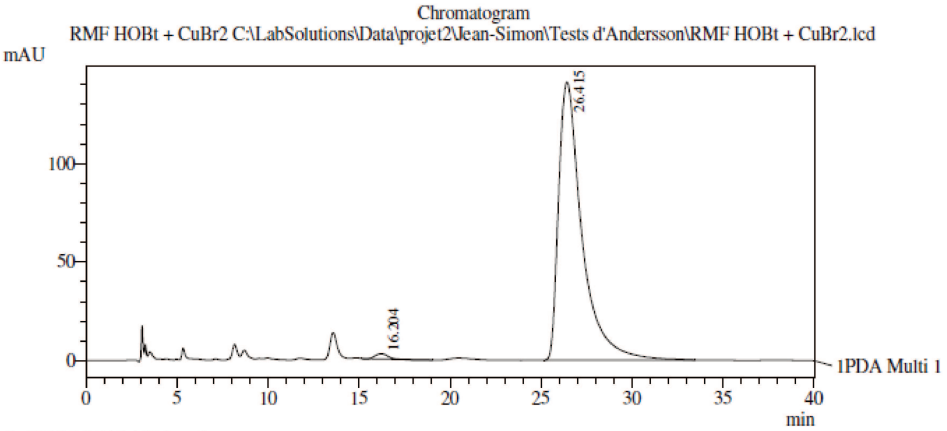
PeakTable

PDA Ch3 210nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	24.166	6806625	91474	41.672	57.752
2	41.901	9527302	66917	58.328	42.248
Total		16333927	158391	100.000	100.000



(1.50 equiv.) (1.00 equiv.)



PeakTable

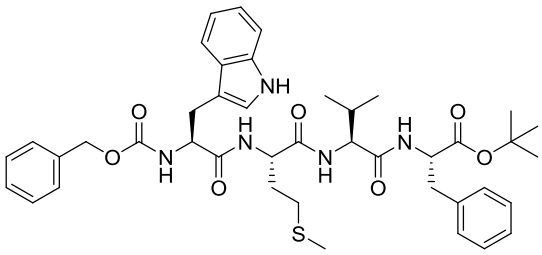
PDA Ch1 214nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	16.204	115919	2658	0.909	1.848
2	26.415	12632301	141135	99.091	98.152
Total		12748219	143793	100.000	100.000

- **Summary table for Anderson test studies:**

Conditions / Additives	Yield (after column chromatography)	Racemization
CDI α-amino ester method: No additives	55%	5.5%
CDI α-amino ester method: No additives in CH_3NO_2	63%	5.9%
CDI α-amino ester method: Imidazole (10 mol%)	47%	7.9%
CDI α-amino ester method: PTSA (10 mol%)	57%	5.7%
CDI α-amino ester method: HOBt (10 mol%)	60%	3.3%
CDI α-amino ester method: $CuBr_2$ (10 mol%)	62%	1.2%
CDI α-amino ester method: $CuBr_2$ (5 mol%)	50%	2.7%
CDI α-amino ester method: $Cu(OTf)_2$ (5 mol%)	50%	1.5%
CDI α-amino ester method: HOBt/$CuBr_2$ (10 mol%)	55%	<1%
CDI-mediated carboxylic acid activation (5minutes activation)	54%	8.6%
CDI-mediated carboxylic acid activation (5minutes activation) HOBt/CuBr2 (10 mol%)	61%	5.8%
BOP (1.5 equiv) and DIPEA (4 equiv) HCl·H_2NGlyOEt, (5 minutes pre-activation)	57%	39.9%
DIC (1.5 equiv.) and oxyma (1.5 equiv.) (5 minutes) Then HCl·H_2NGlyOEt and DIPEA (1.5 equiv.)	55%	< 1.0%

N →C tetrapeptide synthesis

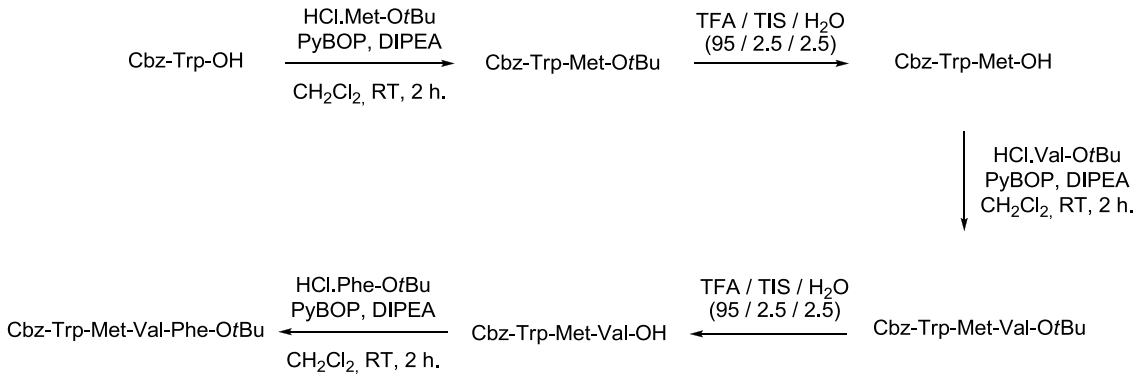


$C_{42}H_{53}N_5O_7S$
771,96

N → C Direction

NB : The activated amines were prepared following the general procedure A by using 2.00 g of H-AA-OR hydrochloric acid salt.

PyBOP carboxylic acid activation strategy:

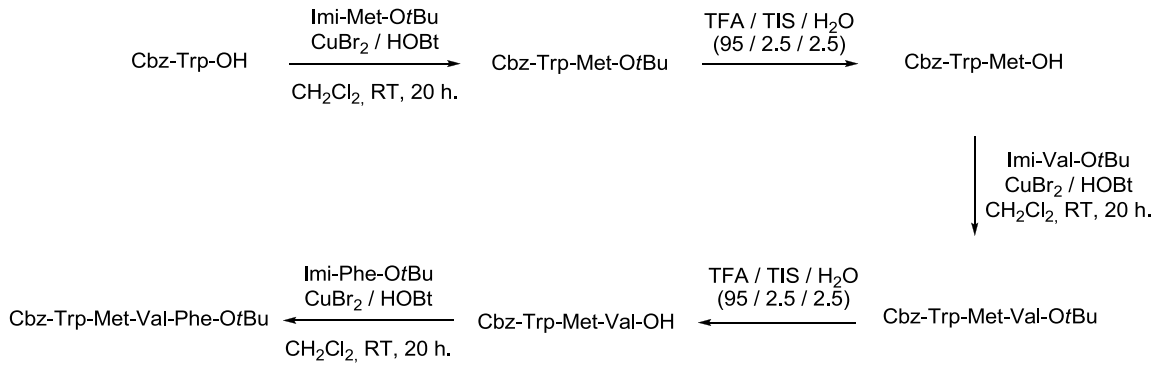


General procedure for the PyBOP coupling

To a solution of P-$(AA)_n$-OH (1.00 equiv.) in CH_2Cl_2 (*C* 0.5M) at RT (22 °C) were successively added benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (PyBOP) (1.50 equiv.), *N*,*N*-Diisopropylethylamine (4.00 equiv.) and H-AA-OR hydrochloric acid salt (1.50 equiv.). The reaction was stirred at this temperature for two hours. After reaction completion, the mixture was washed once with HCl 0.5N. The resulting aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 (3x). The organic layers were

combined, washed with saturated aqueous $NaHCO_3$ and brine. The organic phase was then dried over $MgSO_4$ and evaporated. The desired compound was isolated by short column chromatography in order to eliminate the excess of reagents and byproducts. The purified product was engaged in the next step. *t*Bu deprotection was carried out following general procedure described below.

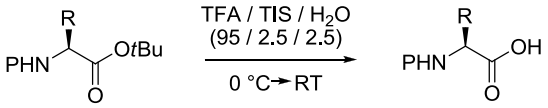
CDI-mediated α-amino esters activation strategy:



General procedure for the CDI coupling

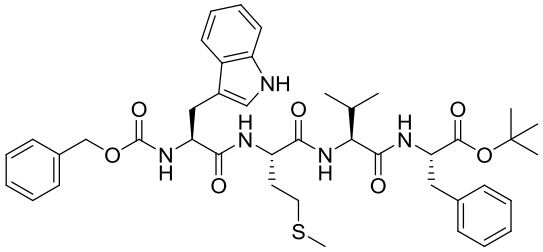
To a solution of the Imi-AA-O*t*Bu derivative (1.50 equiv) in CH_2Cl_2 (*C* 1.0 M) at RT (22 °C) were successively added copper bromide ($CuBr_2$) (10 mol%), 1-hydroxybenzotriazole hydrate (HOBt) (10 mol%) and P-(AA)n-OH (1.00 equiv). The obtained blue suspension was thus stirred at this temperature for 20 h. After reaction completion, the mixture was washed once with aqueous HCl 0.5 N. Then, the aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 (2x). The organic layers were combined, washed with saturated aqueous solution of $NaHCO_3$ and brine. The organic phase was thus dried over $MgSO_4$ and evaporated. The crude product was thus filtered over a short plug of silica gel in order to eliminate the excess of reagents and by-products. *t*Bu deprotection was carried out following general procedure described below.

General procedure for the *t*Bu deprotection



To a mixture of TFA/TIS/H2O (95/2.5/2.5, v/v/v) at 0 °C was added the α-amino ester. The reaction was then stirred at this temperature for five minutes and at RT (22 °C) for two hours. After reaction completion (TLC monitoring), the solvents were removed in vacuum. The correspondent unprotected peptide was precipitated in diethyl ether.

NMR of the tetrapeptide (Cbz-Trp-Met-Val-Phe-O*t*Bu)



$C_{42}H_{53}N_5O_7S$
771,96

$[\alpha]_D^{20}$ = +14.74 (*c* 0.95, $CHCl_3$)*

^{1}H NMR (600 MHz, $(CD_3)_2SO$) *δ* (ppm): 10.71 (brs, 1H), 8.33 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.19 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.69 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.63 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.19-7.33 (m, 11H), 7.15 (brd, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.06 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.96 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.96 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H), 4.92 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H), 4.41-4.44 (m, 1H), 4.37 (q, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.30-4.33 (m, 1H), 4.24 (dd, *J* = 8.9, 6.4 Hz, 1H), 3.09 (dd, *J* = 15.0, 4.0 Hz, 1H), 2.90-2.97 (m, 3H), 2.35-2.45 (m, 2H), 2.01 (s, 3H), 1.78-1.82 (m, 1H), 1.29 (s, 9H), 0.84 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.82 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H).

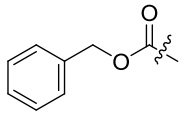
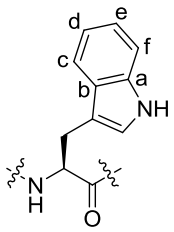
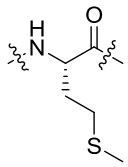
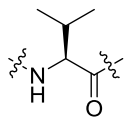
^{13}C NMR (150 MHz, $(CD_3)_2SO$) *δ* (ppm): 171.9, 171.3, 170.6, 170.3, 155.8, 137.0, 136.9, 136.0, 129.2, 129.0, 128.2, 128.1, 127.6, 127.4, 126.4, 123.8, 120.8, 118.5, 118.1, 111.2, 110.1, 80.4, 65.2, 57.0, 55.4, 54.0, 51.9, 36.8, 31.8, 30.9, 29.5, 27.5, 27.4, 19.1, 17.8, 14.6.

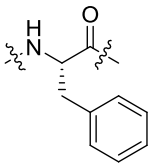
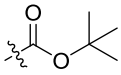
IR (cm^{-1}): 3286.6, 2975.8, 1715.3, 1639.9, 1537.6, 738.15.

MS (ESI+): m/z (%) 772 (100, $[M+H]^+$).

MS (ESI+): m/z (%): Calcd for $C_{42}H_{54}N_5O_7S$ $[M+H]^+$: 772.3744 found 772.3752.

*α_D was calculated with the Cbz-Trp-Met-Val-Phe-OtBu synthesized via CDI amine activation.

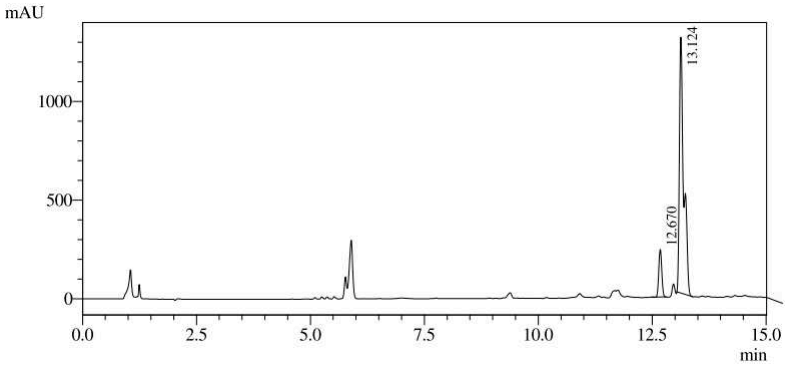
Moiety	^{13}C (ppm)	Type	^{1}H (ppm)	*J* (Hz)
 **Cbz-**	155.8	C=O	-	-
	65.2	CH_2	4.96 4.92	d, *J* = 12.8 Hz d, *J* = 12.8 Hz
	136.9	$C_{quat.}$	-	-
	126.4-129.0	$CH_{ar.}$	7.30-7.32	m
 **-Trp-**	-	NH	7.41	d, *J* = 8.3 Hz
	171.9-170.3	C=O	-	-
	55.4	CH	4.32	ddd, *J* = 9.1, 8.3, 4.0 Hz
	27.6	CH_2	3.09 2.92	dd, *J* = 14.5, 4.0 Hz dd, *J* = 14.5, 9.1 Hz
	110.1	$C_{quat.}$	-	-
	123.8	$CH_{ar.}$	7.15	brs
	-	NH	10.78	brs
	136.0	$C_{quat.}$ (a)	-	-
	126.4	$C_{quat.}$ (b)	-	-
	118.5	CH_{ar} (c)	7.64	d
	118.1	CH_{ar} (d)	6.96	t
	120.8	CH_{ar} (e)	7.06	t
	111.2	CH_{ar} (f)	7.32	d
 **-Met-**	-	NH	8.20	d, *J* = 8.0 Hz
	171.9-170.3	C=O	-	-
	51.9	CH	4.42	ddd, *J* = 8.8, 8.0, 5.0 Hz
	31.8	CH_2	1.79-1.90	m
	29.5	CH_2	2.39-2.43	m
	14.7	CH_3	2.00	s
 **-Val-**	-	NH	7.69	d, *J* = 9.0 Hz
	171.9-170.3	C=O	-	-
	57.0	CH	4.24	dd, *J* = 9.0, 6.4 Hz
	30.9	CH	1.96	m
	19.1 17.8	CH_3	0.85 0.82	d, *J* = 6.8 Hz d, *J* = 6.8 Hz

 **-Phe-**	-	NH	8.33	d, *J* = 7.5 Hz
	171.9-170.3	C=O	-	-
	54.0	CH	4.38	q, *J* = 7.5 Hz
	36.8	CH_2	2.94	m
	137.1	$C_{quat.}$	-	-
	126.4-129	CH_{ar}	7.30-7.32	m
-OtBu 	80.5	$C_{quat.}$	-	-
	27.6	CH_3	1.29	s

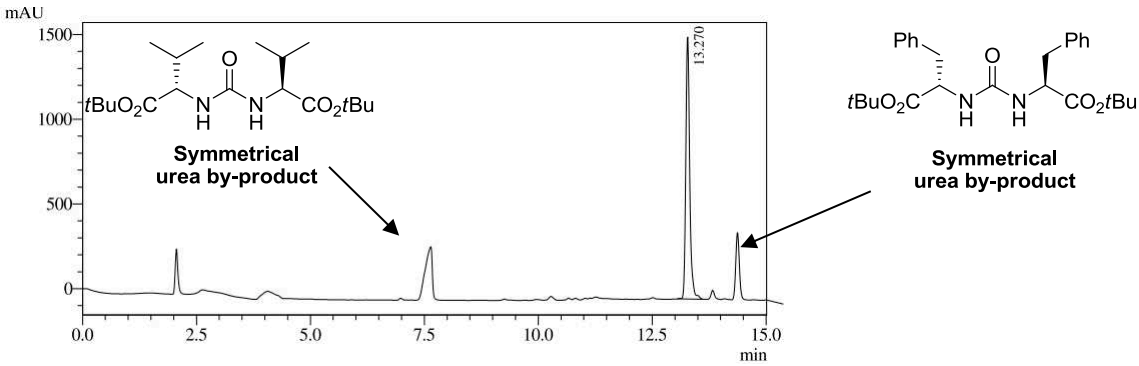
HPLC spectra of tetrapeptide (crude products; after extraction and filtration only)

Analytical conditions: Column Waters SunFire™ C18 (5µm) (4.6x250 nm); Eluent CH_3CN/H_2O (0.1% TFA, gradient flow). Flow rate: 1.0 mL/min. Detection: 214 nm.

PyBOP method (crude compound):



CDI method (crude compound):



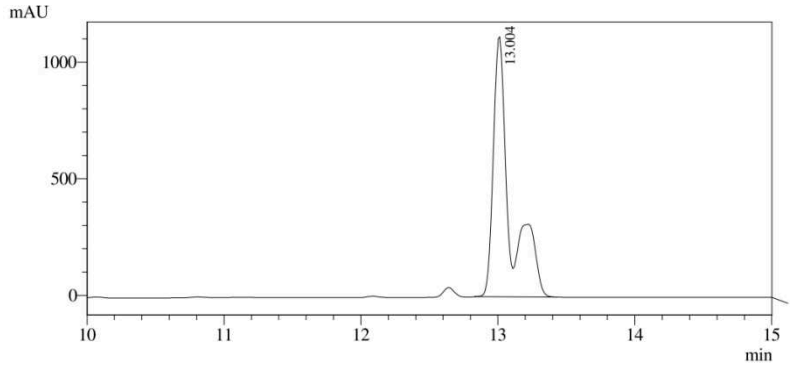
NOTE: *The urea side-compounds were identified by LC/MS.*

Preparative HPLC purification conditions: Waters, Delta prep 300 mL, Column: Sunfire C18 (5µm) (250x20 mm); Eluent: CH_3CN/H_2O (0.1% TFA). Flox rate: 17 mL/min. Detection: 214 nm.

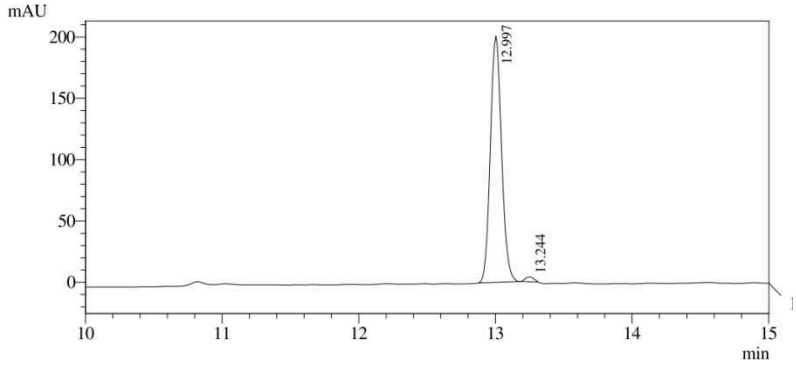
HPLC spectra of tetrapeptide (after purification by preparative HPLC)

Analytical Conditions: Column Waters SunFire™ C18 (5µm) (4.6x250 nm); Eluent CH_3CN/H_2O (0.1% TFA, gradient flow). Flow rate: 1.0 mL/min. Detection: 214 nm.

PyBOP method (purified compound):



CDI method (purified compound):



Procedure: Marfey's test:

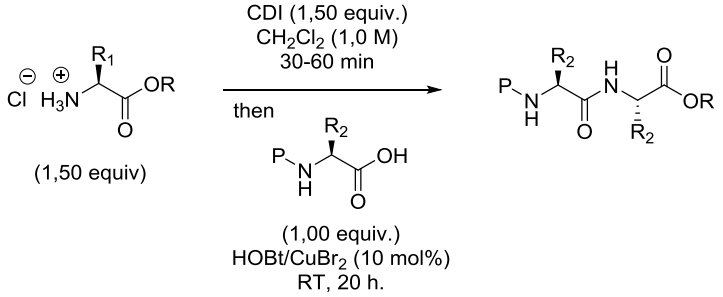
Preparation of each diastereomers:

Aqueous solutions (50 mM) of amino acids (D and L isomers) are used as starting materials for synthesis. Solution of each of the amino acid (50 µl, 2.5 µmoles) is placed in separate 2 ml plastic tubes. To each is added 100 µL of 1% acetone solution of Marfey's reagent (1 mg, 3.6 µmoles), the molar ratio of Marfey's reagent to amino acid 1.4:1, followed by $NaHCO_3$ (1 M, 20 µL, 20 µmoles). The contents are mixed and heated over a hot plate at 40 °C for 1 hour with frequent mixing. After cooling to room temperature, HCl (2 M, 10 µl, 20 µmoles) is added to each reaction mixture. The mixture was evaporated under reduce pressure. Then, each mixture of diastereomers is injected in LC/MC.

Cleavage of the tetrapeptide Cbz-Trp-Met-Val-Phe-O*t*Bu:

The tetrapeptide was solubilized in a solution of HCl (6 M) and heat at 110 °C during two hours. Then, the mixture was evaporated under reduce pressure and the procedure of derivatization previously described was apllicated.

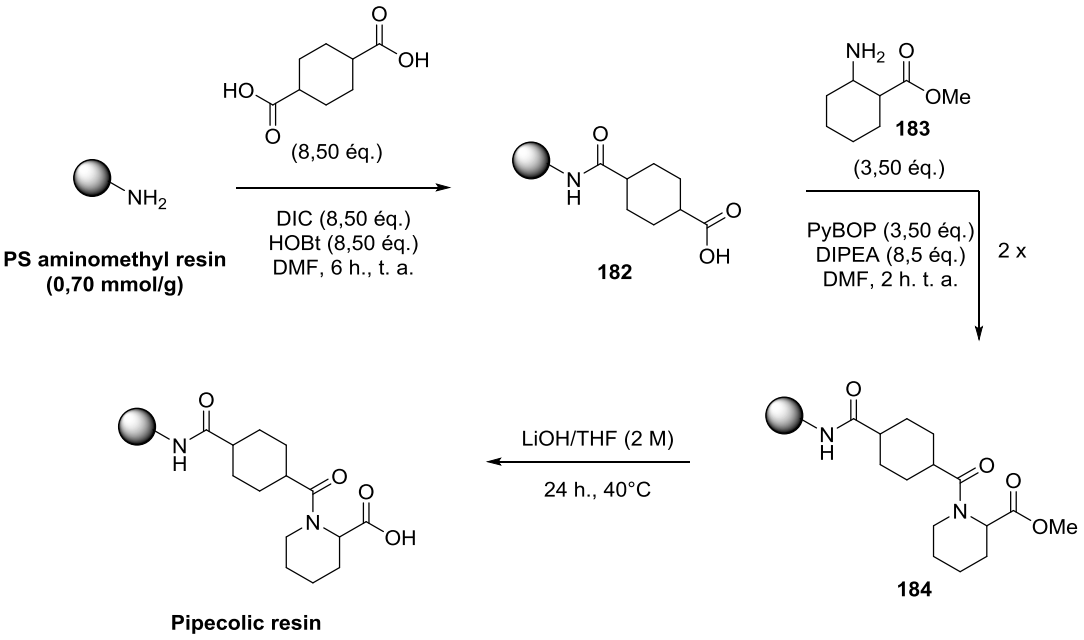
General procedure for one-pot reactions



To a solution of the corresponding H-AA-OR hydrochloric acid salt (1.00 equiv) in CH_2Cl_2 at room temperature was added *N,N'*-carbonyldiimidazole (1.00 equiv.). After full conversion of *N,N'*-carbonyldiimidazole, copper bromide (10 mol%) and 1-hydroxybenzotriazole hydrate (10 mol%) were added followed by P-AA_2-OH (1.50 equiv.). The obtained blue suspension was thus stirred at this temperature for 20 h. The mixture was washed once with aqueous HCl 0.5 N. Then, the aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 (2x). The organic layers were combined, washed with saturated aqueous $NaHCO_3$ and brine. The organic phase was thus dried over $MgSO_4$ and evaporated. Purification was performed by column chromatography on silica gel to afford the dipeptide products.

SPPS reactions

Preparation of the Pipecolic linker functionalized PS resin



Attachment of cyclohexane-1,4-dicarboxylic acid (182):

cis/trans-Cyclohexane-1,4-dicarboxylic acid (8.45 equiv) and HOBt (8.45 equiv) were dissolved in DMF then DIC (8.45 equiv) was added and the mixture was gently stirred for 10 min. It was then added to aminomethyl PS resin (0.70 mmol/g) preswollen in CH_2Cl_2, and the reaction mixture was gently shaken for 6 h. After filtration, the resin was washed with DMF (2x), MeOH, and CH_2Cl_2 (2x), and finally dried at room temperature, under vacuum, to yield resin (**182**).

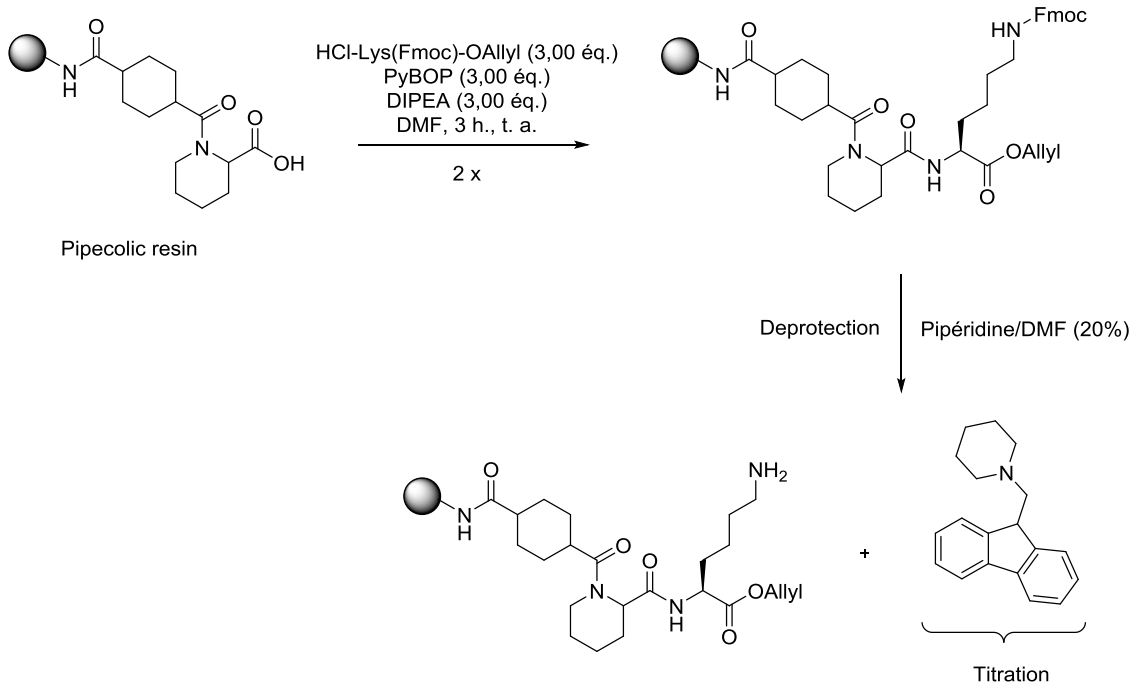
Attachment of d/l-pipecolic acid methyl ester (96):

d/l-Pipecolic acid methyl ester hydrochloride (**183**) (3.4 equiv) was coupled to resin (**182**) by using PyBOP (3.4 equiv), as activating agent, in the presence of DIPEA (8.45 equiv). The reaction mixture was allowed to react for 2 h in DMF, and the process was repeated once more. Finally, the resin was washed with DMF (2x), MeOH, and CH_2Cl_2 (2x), and dried at room temperature under vacuum to yield resin (**184**).

On-resin hydrolysis of pipecolic acid methyl ester:

A mixture of a 2M aqueous solution of lithium hydroxide and tetrahydrofuran (30:70 v/v) was added to resin (**184**). The resin was allowed to agitate on an orbital shaker at room temperature for 24 h. The resin was washed with H_2O (3x), MeOH (2x), and CH_2Cl_2 (3x) to yield Pipecolic-PS resin. The resulting resin was dried under vacuum for 24 h.

Determination of the loading of the Pipecolic resin

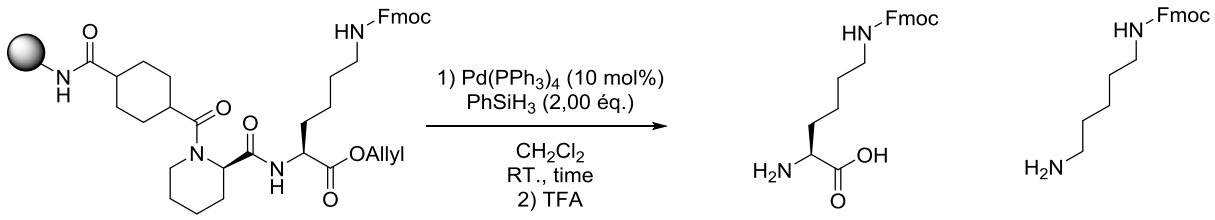


HCl.H-Lys(Fmoc)-OAllyl (3.00 equiv) was coupled to pipecolic resin by using PyBOP (3.00 equiv), as activating agents, in the presence of DIPEA (4.00 equiv). The reaction mixture was allowed to react for 3 h in DMF, and the process was repeated once more. Finally, the resin was washed with DMF (2x), MeOH, and CH_2Cl_2 (2x).

Weight precisely w=5-10 mg of resin in eppendorf, add 1ml of 20% Pip in DMF. shake 20 min transfer 100 µl on the solution (without pipetting beads!) in 10 ml DMF (i.e. dilution x100) mix well, you obtain the solution 'S' to be measured pipette 2ml of this solution (or less, you just have to fill the UV cell) and measure the Absorbance at 301 nm.

NB: use as reference solution a 100x dilution of the same 20% Pip solution in DMF. Loading = 101xAbs at 301nm/7,8 x w (w = mass of resin in mg) the loading is in mmol/g.

General procedure for removal of the allyl group on resin

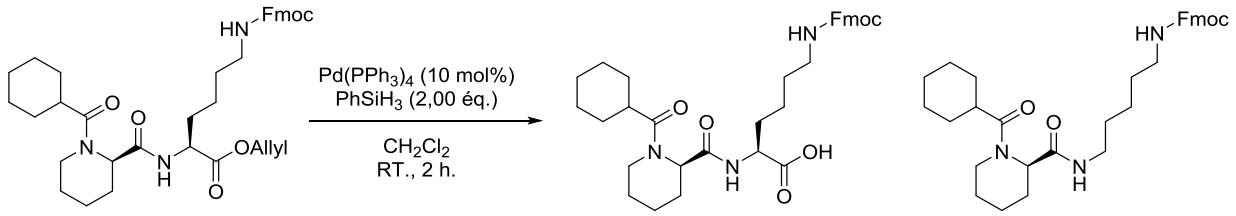


Removal of the allyl group was accomplished with $Pd(PPh_3)_4$ (x equiv., based on the substitution of the resin) and additive ($PhSiH_3$ or dimedone) (x equiv.) in CH_2Cl_2. After filtering the Pd solution, the resin was washed with CH_2Cl_2 (6 x 30 s), H_2O/dioxane (1:9) (2 x 1 min) and DMF (6 x 30 s) and cleaved with TFA. The resulting compound was evaporated under vacuum pressure and analysed by LC/MS.

- **Summary table for decarboxylation studies:**

Entry	$Pd(PPh_3)_4$	$PhSiH_3$	Dimedone	Time	Temperature	Results
1	10 mol%	30 equiv.	-	2 h.	RT	Decarboxylation
2	10 mol%	30 equiv.	-	2 h.	50 °C	Decarboxylation
3	1,00 éq.	30 equiv.	-	2 h.	RT	Decarboxylation
4	10 mol%	10 equiv.	-	2 h.	RT	Decarboxylation
5	10 mol%	-	10 equiv.	2 h.	RT	Decarboxylation
6	10 mol%	30 equiv.	-	1 h.	RT	Decarboxylation

General procedure for removal of the allyl group on homogeneous phase



Removal of the allyl group was accomplished under Argon atmosphere with $Pd(PPh_3)_4$ (0.1 equiv., based on the substitution of the resin) and $PhSiH_3$ (2.00 equiv.) in CH_2Cl_2. After filtering the Pd solution, the resin was washed with CH_2Cl_2 (6 x 30 s), H_2O/dioxane (1:9) (2 x 1 min) and DMF (6 x 30 s) and cleaved with TFA. The resulting compound was evaporated under vacuum pressure and analysed by LC/MS.

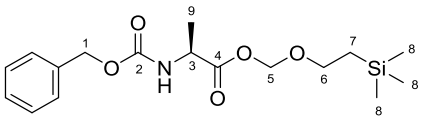
NB: CH_2Cl_2 was freshly distillated.

O-SEM and O-TIPS Esterification of α-Amino Acids

General procedure for the *O*-SEM and *O*-TIPS esterification of amino acids:

To a solution of the amino acid derivative (1.00 equiv.) in CH_2Cl_2 at 0 °C was added dicyclohexylamine (DCA) (1.10 equiv.). The mixture (a white suspension) was stirred at 0 °C for 20 min. Then, SEMCl or TIPSCl was added (1.10 equiv.), and stirring was continued at 0 °C for 12 h. Afterwards, THF was added to the suspension and the mixture was filtered over a plug of Celite, eluting with additional 10 mL of THF. The filtrate was concentrated under vacuum. The crude product was thus purified by flash chromatography (eluent: Petroleum Ether/Ethyl Acetate) to afford the title compound as a viscous colorless oil.

- **(S)-(2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl 2-(benzyloxycarbonylamino)propanoate (Cbz-Ala-OSEM)**



$C_{17}H_{27}NO_5Si$
353,49

To Cbz-Ala-OH (200 mg, 0.86 mmol) in CH_2Cl_2 (3.00 mL) at 0 °C was added dicyclohexylamine (DCA) (197 µL, 0.99 mmol). Then, SEMCl (175 µL, 0.99 mmol) was added.
Purification over flash chromatography (eluent: Petroleum Ether/Ethyl Acetate 85:15).
Colorless viscous oil: 98% of yield.

$[\alpha]_D^{20}$ = – 6.0 (*c* 1.17, $CHCl_3$).

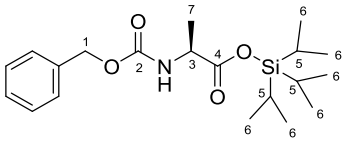
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) *δ* (ppm): 7.37-7.33 (m, 5H, CH_{ar}), 5.39-5.29 (m, 3H, H_5 + NH), 5.10 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H, H_1), 5.07 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H, H_1), 4.41 (q, *J* = 7.3 Hz, 1H, H_3), 3.73-3.66 (m, 2H, H_6), 1.44 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H, H_9), 0.96 (t, *J* = 8.4 Hz, 2H, H_7), 0.02 (s, 9H, H_8).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) *δ* (ppm): 172.7 (C_4), 155.5 (C_2), 136.2 (C_{ar}), 128.5 (2 CH_{ar}), 128.2 (CH_{ar}), 128.1 (2 CH_{ar}), 89.8 (C_5), 68.1 (C_1 or C_6), 66.9 (C_1 or C_6), 49.6 (C_3), 18.6 (C_7), 18.0 (C_9), – 1.5 (3 C_8).

IR (cm^{-1}): 3342, 2953, 1722, 1523, 1454, 1248, 1209, 1103, 1060, 1028, 912, 857, 834, 735, 696.

HRMS (ESI+) m/z: Calcd. for $C_{17}H_{28}NO_5Si$ $[M+H]^+$ 354.1737; found 354.1748.

- **(S)-triisopropylsilyl 2-(benzyloxycarbonylamino)propanoate (Cbz-Ala-OTIPS)**



$C_{20}H_{33}NO_4Si$
379,57

To Cbz-Ala-OH (200 mg, 0.86 mmol) in CH_2Cl_2 (3.00 mL) at 0 °C was added dicyclohexylamine (DCA) (197 µL, 0.99 mmol). Then, TIPSCl (212 µL, 0.99 mmol) was added
Purification over flash chromatography (eluent: Petroleum Ether/Ethyl Acetate 95:5).
Colorless viscous oil: 92% of yield.

$[\alpha]_D^{20}$ = + 5.0 (*c* 1.20, $CHCl_3$).

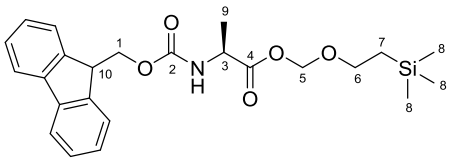
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.36-7.31 (m, 5H, CH_{ar}), 5.37 (brd, *J* = 7.4 Hz, 1H, NH), 5.10 (d, *JAB* = 12.1 Hz, 2H, H_1), 4.38 (q, *J* = 7.3 Hz, 1H, H_3), 1.46 (d, *J* = 10.2 Hz, 3H, H_7), 1.35-1.25 (m, 3H, H_5), 1.07 (d, *J* = 7.4 Hz, 18H, H_6).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.7 (C_4), 155.5 (C_2), 136.3 (C_{ar}), 128.4 (3 CH_{ar}), 128.0 (2 CH_{ar}), 66.7 (C_1), 50.5 (C_3), 18.7 (C_7), 17.6 (6 C_6), 11.7 (3 C_5).

IR (cm^{-1}): 2946, 2868, 1705, 1455, 1341, 1240, 1213, 1189, 1065, 882, 750, 687, 667.

HRMS (ESI+) m/z: Calcd. for $C_{20}H_{34}NO_4Si$ $[M+H]^+$ 380.2257; found 380.2244.

- **(S)-(2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl 2-(((9H-fluoren-9yl)methoxy)carbonylamino)propanoate (Fmoc-Ala-OSEM)**



$C_{24}H_{31}NO_5Si$
441,59

To Fmoc-Ala-OH (200 mg, 0.64 mmol) in CH_2Cl_2 (2.25 mL) at 0 °C was added dicyclohexylamine (DCA) (140 µL, 0.70 mmol). Then, SEMCl (124 µL, 0.70 mmol) was added.
Purification over flash chromatography (eluent: Petroleum Ether/Ethyl Acetate 85:15).
Colorless viscous oil: 82% of yield

$[\alpha]_D^{20}$ = – 4.3 (*c* 1.40, $CHCl_3$).

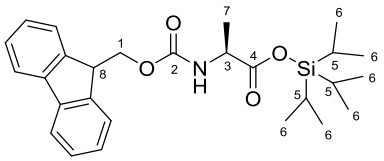
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.77 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH_{ar}), 7.59-7.52 (m, 2H, CH_{ar}), 7.41 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH_{ar}), 7.32 (td, *J* = 7.6, 1.2 Hz, 2H, CH_{ar}), 5.37-5.41 (m, 2H, H_5), 5.30-5.33 (m, 1H, NH), 4.35-4.46 (m, 3H, H_1 + H_{10}), 4.23 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H, H_3), 3.70-3.75 (m, 2H, H_6), 1.47 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H, H_9), 0.97 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H, H_7), 0.02 (s, 9H, H_8).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.7 (C_4), 155.6 (C_2), 143.9 (C_{ar}), 143.7 (C_{ar}), 141.3 (2 C_{ar}), 127.7 (2 CH_{ar}), 127.0 (2 CH_{ar}), 125.1 (2 CH_{ar}), 120.0 (2 CH_{ar}), 89.8 (C_5), 68.1 (C_1 or C_6), 67.0 (C_1 or C_6), 49.7 (C_3) , 47.1 (C_{10}), 18.7 (C_7), 18.0 (C_9), – 1.5 (3 C_8).

IR (cm^{-1}): 3337, 2952, 1722, 1525, 1450, 1247, 1103, 1060, 936, 856, 834, 757, 653.

HRMS (ESI+) m/z: Calcd. for $C_{24}H_{31}NO_5NaSi$ $[M + Na]^+$ 464.1869; found 464.1873.

- **(S)-triisopropylsilyl 2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonylamino)propanoate (Fmoc-Ala-OTIPS)**



$C_{27}H_{37}NO_4Si$
467,67

To Fmoc-Ala-OH (200 mg, 0.64 mmol) in CH_2Cl_2 (2.25 mL) at 0 °C was added dicyclohexylamine (DCA) (140 µL, 0.70 mmol). Then, TIPSCl (150 µL, 0.70 mmol) was added.
Purification over flash chromatography (eluent: Petroleum Ether/Ethyl Acetate 95:5).
Colorless viscous oil: 98% of yield.

$[\alpha]_D^{20}$ = + 4.2 (*c* 1.19, $CHCl_3$).

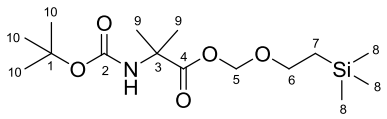
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.78 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, H_{10} or H_{13}), 7.60-7.62 (m, 2H, H_{10} or H_{13}), 7.41 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, H_{12} or H_{11}), 7.32 (td, *J* = 7.6, 1.2 Hz, 2H, H_{12} or H_{11}), 5.46-5.48 (m, 1H, NH), 4.38-4.43 (m, 3H, H_1 + H_8), 4.21-4.24 (m, 1H, H_3), 1.49 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H_7), 1.33 (q, *J* = 8.0 Hz, 3H, H_5), 1.09 (d, *J* = 8.0 Hz, 18H, H_6).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.8 (C_4), 155.5 (C_2), 143.9 (C_{ar}), 143.8 (C_{ar}), 141.2 (2 C_{ar}), 127.6 (2 CH_{ar}), 127.0 (2 CH_{ar}), 125.1 (2 CH_{ar}), 119.9 (2 CH_{ar}), 66.9 (C_1), 50.6 (C_3), 47.1 (C_8), 18.9 (C_7), 17.6 (6 C_6), 11.8 (3 C_5).

IR (cm^{-1}): 3299, 2944, 2867, 1717, 1683, 1540, 1451, 1343, 1265, 1208, 1052, 883, 756, 651.

HRMS (ESI+) m/z: Calcd. for $C_{27}H_{38}NO_4Si$ $[M + H]^+$ 468.2570; found 468.2581.

- **(2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl 2-(tert-butoxycarbonylamino)-2-methylpropanoate (Boc-Aib-OSEM)**



$C_{15}H_{31}NO_5Si$
333,50

To Boc-Aib-OH (200 mg, 0.99 mmol) in CH_2Cl_2 (3.45 mL) at 0 °C was added dicyclohexylamine (DCA) (217 µL, 1.09 mmol). Then, SEMCl (193 µL, 1.09 mmol) was added.
Purification over flash chromatography (eluent: Petroleum Ether/Ethyl Acetate 80:20).
Colorless viscous oil: 76% of yield.

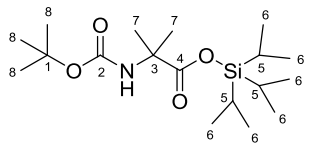
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 5.34 (s, 2H, H_5), 3.70-3.74 (m, 2H, H_6), 1.52 (s, 6H, H_9), 1.43 (s, 9H, H_{10}), 0.93-0.98 (m, 2H, H_7), 0.02 (s, 9H, H_8).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 174.4 (C_4), 154.4 (C_2), 89.9 (C_5), 79.6 (C_1), 67.8 (C_6), 56.1 (C_3), 28.3 (3 C_{10}), 25.2 (2 C_9), 18.0 (C_7), – 1.5 (3 C_8).

IR (cm^{-1}): 2978, 1713, 1503, 1366, 1249, 1163, 1076, 857, 834, 755.

HRMS (ESI+) m/z: Calcd. for $C_{15}H_{32}NO_5Si$ $[M + H]^+$ 334.2050; found 334.2054.

- **triisopropylsilyl 2-(tert-butoxycarbonylamino)-2-methylpropanoate (Boc-Aib-OTIPS)**



$C_{18}H_{37}NO_4Si$
359,58

To Boc-Aib-OH (200 mg, 0.99 mmol) in CH_2Cl_2 (3.45 mL) at 0 °C was added dicyclohexylamine (DCA) (217 µL, 1.09 mmol). Then, TIPSCl (233 µL, 1.09 mmol) was added.

Purification over flash chromatography (eluent: Petroleum Ether/Ethyl Acetate 95:5).
Colorless viscous oil: 97% of yield.

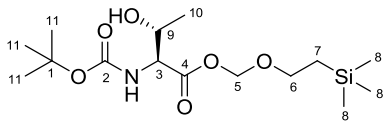
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 5.30 (brs, 1H, NH), 1.53 (s, 6H, H_7), 1.40 (s, 9H, H_8), 1.27-1.34 (m, 3H, H_5), 1.06 (d, J = 7.2 Hz, 18H, H_6).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 175.0 (C_4), 154.3 (C_2), 79.1 (C_1), 56.9 (C_3), 28.4 (3 C_8), 25.0 (3 C_7), 17.7 (6 C_6), 11.9 (3 C_5).

IR (cm^{-1}): 2946, 2869, 1704, 1497, 1454, 1384, 1366, 1306, 1249, 1156, 1069, 882, 732, 684, 648.

HRMS (ESI+) m/z: Calcd. for $C_{18}H_{38}NO_4Si$ $[M + H]^+$ 360.2570; found 360.2568.

- **(2S,3R)-(2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl 2-(tert-butoxycarbonylamino)-3-hydroxybutanoate (Boc-Thr-OSEM)**



$C_{15}H_{31}NO_6Si$
349,50

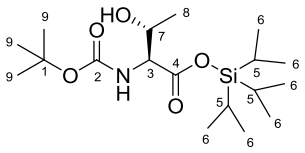
To Boc-Thr-OH (200 mg, 0.91 mmol) in CH_2Cl_2 (3.17 mL) at 0 °C was added dicyclohexylamine (DCA) (199 µL, 1.00 mmol). Then, SEMCl (177 µL, 1.00 mmol) was added.
Purification over flash chromatography (eluent: Petroleum Ether/Ethyl Acetate 75:25).
Colorless viscous oil: 83% of yield.

$[\alpha]_D^{20}$ =– 11.9 (c 1.18, $CHCl_3$).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 5.41 (d, J = 9.2 Hz, 1H, NH), 5.34 (d, J = 6.0 Hz, 1H, H_5), 5.31 (d, J = 6.0 Hz, 1H, H_5), 4.23-4.31 (m, 2H, H_9 + H_3), 3.67-3.71 (m, 2H, H_6), 2.60 (brs, 1H, OH), 1.42 (s, 9 H, H_{11}), 1.23 (d, J = 6.8 Hz, 3 H, H_{10}), 0.91-0.93 (m, 2H, H_7), – 0.01 (s, 9H, H_8).

HRMS (ESI+) m/z: Calcd. for $C_{15}H_{32}NO_6Si$ $[M + H]^+$ 350.1999; found 350.2003.

- **(2S,3R)-triisopropylsilyl 2-(tert-butoxycarbonylamino)-3-hydroxybutanoate (Boc-Thr-OTIPS)**



$C_{18}H_{37}NO_5Si$
375,58

To Boc-Thr-OH (200 mg, 0.91 mmol) in CH_2Cl_2 (3.17 mL) at 0 °C was added dicyclohexylamine (DCA) (199 µL, 1.00 mmol). Then, TIPSCl (214 µL, 1.00 mmol) was added.
Purification over flash chromatography (eluent: Petroleum Ether/Ethyl Acetate 90:10).
Colorless viscous oil: 93% of yield.

$[\alpha]_D^{20}$ = – 2.7 (*c* 1.10, $CHCl_3$).

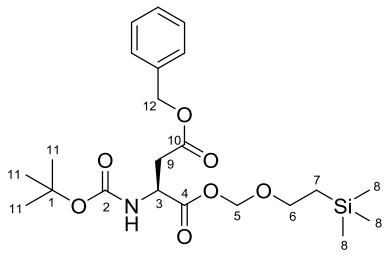
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) *δ* (ppm): 5.26 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, NH), 4.24-4.34 (m, 2H, H_7 + H_3), 1.45 (s, 9H, H_9), 1.25-1.36 (m, 6H, H_8 + H_5), 1.08 (d, *J* = 7.3 Hz, 18H, H_6).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) *δ* (ppm): 171.3 (C_4), 156.1 (C_2), 79.8 (C_1), 68.3 (C_7), 59.6 (C_3), 28.3 (3 C_9), 20.2 (C_8), 17.7 (6 C_6), 11.9 (3 C_5).

IR (cm^{-1}): 3443, 2946, 2869, 1698, 1504, 1464, 1367, 1297, 1164, 1066, 882, 731, 672.

HRMS (ESI+) m/z: Calcd. for $C_{18}H_{38}NO_5Si$ $[M + H]^+$ 376.2519; found 376.2509.

- **(S)-4-benzyl 1-(2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl 2-(tert-butoxycarbonylamino)succinate (Boc-Asp(OBzl)-OSEM)**



$C_{22}H_{35}NO_7Si$
453,60

To Boc-Asp(OBzl)-OH (200 mg, 0.62 mmol) in CH_2Cl_2 (2.15 mL) at 0 °C was added dicyclohexylamine (DCA) (150 µL, 0.68 mmol). Then, SEMCl (121 µL, 0.68 mmol) was added.
Purification over flash chromatography (eluent: Petroleum Ether/Ethyl Acetate 80:20).
Colorless viscous oil: 86% of yield.

$[\alpha]_D^{20}$ = + 9.4 (*c* 0.85, $CHCl_3$).

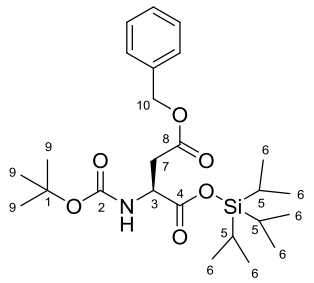
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.33-7.37 (m, 5H, CH_{ar}), 5.49 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, NH), 5.34-5.28 (m, 2H, H_5), 5.12 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, H_{12}), 5.08 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, H_{12}), 4.57-4.63 (m, 1H, H_3), 3.65-3.70 (m, 2H, H_6), 3.07 (dd, *J* = 17.2, 4.8 Hz, 1H, H_9), 2.88 (dd, *J* = 17.2, 4.8 Hz, 1H, H_9), 1.44 (s, 9H, H_{11}), 0.92-0.96 (m, 2H, H_7), 0.01 (s, 9H, H_8).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 170.7 (C_4+ C_{10}), 155.3 (C_2), 135.3 (C_{ar}), 128.6 (2 CH_{ar}), 128.4 (CH_{ar}), 128.2 (2 CH_{ar}), 90.1 (C_5), 80.1 (C_1), 68.0 (C_6 or C_{12}), 66.8 (C_6 or C_{12}), 50.0 (C_3), 36.7 (C_9), 28.2 (3 C_{11}), 17.9 (C_7), −1.5 (3 C_8).

IR (cm^{-1}): 2954, 1716, 1498, 1249, 1158, 1114, 908, 835, 729, 696.

HRMS (ESI+) m/z: Calcd. for $C_{22}H_{36}NO_7Si$ $[M + H]^+$ 454.2261; found 454.2273.

- **(S)-4-benzyl 1-triisopropylsilyl 2-(tert-butoxycarbonylamino)succinate (Boc-Asp(OBzl)-OTIPS)**



$C_{25}H_{41}NO_6Si$
479,68

To Boc-Asp(Bzl)-OH (200 mg, 0.62 mmol) in CH_2Cl_2 (2.15 mL) at 0 °C was added dicyclohexylamine (DCA) (150 µL, 0.68 mmol). Then, TIPSCl (146 µL, 0.62 mmol) was added.
Purification over flash chromatography (eluent: Petroleum Ether/Ethyl Acetate 95:5).
Colorless viscous oil: 92% of yield.

$[\alpha]_D^{20}$ = + 17.8 (*c* 1.01, $CHCl_3$).

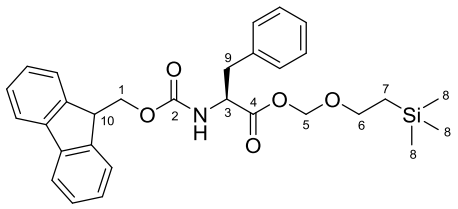
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.28-7.38 (m, 5H, CHar), 5.57 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, NH), 5.13 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, H_{10}), 5.04 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, H_{10}), 4.55-4.60 (m, 1H, H_3), 3.06 (dd, *J* = 17.2, 4.3 Hz, 1H, H_7), 2.88 (dd, *J* = 17.2, 4.6 Hz, 1H, H_7), 1.43 (s, 9H, H_9), 1.25-1.32 (m, 3H, H_5), 1.05 (d, *J* = 7.6 Hz, 18H, H_6).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 171.0 (C_4 or C_8), 170.8 (C_4 or C_8), 155.3 (C_{ar}), 135.4 (CH_{ar}), 128.5 (2 CH_{ar}), 128.3 (2 CH_{ar}), 79.8 (C_9), 66.7 (C_{10}), 50.7 (C_3), 36.8 (C_7), 28.3 (3 C_9), 17.6 (6 C_6), 11.9 (3 C_5).

IR (cm^{-1}): 2946, 2868, 1716, 1497, 1366, 1352, 1214, 1162, 883, 735, 694.

HRMS (ESI+) m/z: Calcd. for $C_{25}H_{42}NO_6Si$ $[M + H]^+$ 480.2781; found 480.2805.

- **(S)-(2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl 2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonylamino)-3 phenylpropanoate (Fmoc-Phe-OSEM)**



$C_{30}H_{35}NO_5Si$
517,69

To Fmoc-Phe-OH (200 mg, 0.52 mmol) in CH_2Cl_2 (1.80 mL) at 0 °C was added dicyclohexylamine (DCA) (113 µL, 0.57 mmol). Then, SEMCl (100 µL, 0.57 mmol) was added.
Purification over flash chromatography (eluent: Petroleum Ether/Ethyl Acetate 80:20).
Colorless viscous oil: 86% of yield.

$[\alpha]_D^{20}$ = + 19.7 (*c* 0.91, $CHCl_3$).

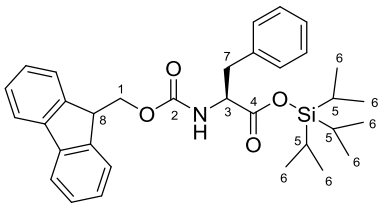
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.78 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_{15} or H_{12}), 7.58 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, H_{14} or H_{13}), 7.43 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H_{14} or H_{13}), 7.27-7.35 (m, 5H, CH_{ar}), 7.16 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H, H_{15} or H_{12}), 5.39 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, NH), 5.34 (brs, 1H, H_5), 5.33 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, H_5), 4.71-4.76 (m, 1H, H_1 or H_{10}), 4.44-4.49 (m, 1H, H_1 or H_{10}), 4.33-4.37 (m, 1H, H_1 or H_{10}), 4.23 (t, J = 7.1 Hz, 1H, H_3), 3.67-3.72 (m, 2H, H_6), 3.12-3.24 (m, 2H, H_9), 0.97 (t, *J* = 8.4 Hz, 2H, H_7), 0.05 (s, 9H, H_8).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 171.2 (C_4), 155.5 (C_2), 143.7 (C_{ar}), 143.6 (2 C_{ar}), 141.2 (C_{ar}), 135.5 (C_{ar}), 129.3 (2 CH_{ar}), 128.6 (2 CH_{ar}), 127.6 (2 CH_{ar}), 127.1 (2 CH_{ar}), 127.0 (2 CH_{ar}), 125.1 (CH_{ar}), 125.0 (CH_{ar}), 119.9 (CH_{ar}), 90.0 (C_5), 68.3 (C_1 or C_6), 66.9 (C_1 or C_6), 54.7 (C_3), 47.0 (C_{10}), 38.0 (C_9), 17.9 (C_7), −1.5 (3 C_8).

IR (cm^{-1}): 2953, 1717, 1507, 1248, 908, 857, 834, 729, 699.

HRMS (ESI+) m/z: Calcd. for $C_{30}H_{36}NO_5Si$ $[M + H]^+$ 518.2363; found 518.2358.

- **(S)-triisopropylsilyl 2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonylamino)-3-phenylpropanoate (Fmoc-Phe-OTIPS)**



$C_{33}H_{41}NO_4Si$
543,77

To Fmoc-Phe-OH (200 mg, 0.52 mmol) in CH_2Cl_2 (1.80 mL) at 0 °C was added dicyclohexylamine (DCA) (113 µL, 0.57 mmol). Then, TIPSCl (122 µL, 0.57 mmol) was added.
Purification over flash chromatography (eluent: Petroleum Ether/Ethyl Acetate 95:5).
Colorless viscous oil: 75% of yield.

$[\alpha]_D^{20}$ = + 14.6 (*c* 1.03, $CHCl_3$).

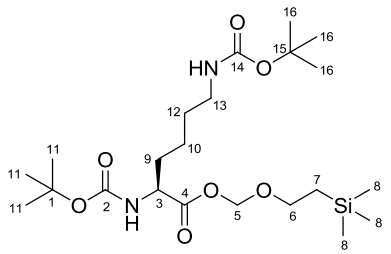
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) *δ* (ppm): 7.79 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH_{ar}), 7.59 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH_{ar}), 7.43 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH_{ar}), 7.23-7.35 (m, 7H, CH_{ar}), 5.41 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, NH), 4.71-4.46 (m, 1H, H_8 or H_1), 4.44-4.48 (m, 1H, H_8 or H_1), 4.30-4.35 (m, 1H, H_8 or H_1), 4.23 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, H_3), 3.30 (dd, *J* = 13.9, 5.7 Hz, 1H, H_7), 3.13 (dd, *J* = 14.0, 6.5 Hz, 1H, H_7), 1.30-1.39 (m, 3H, H_5), 1.09-1.03 (m, 18H, H_6).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 171.3 (C_4), 155.5 (C_2), 143.7 (2 C_{ar}), 141.2 (2 C_{ar}), 136.0 (C_{ar}), 129.3 (2 CH_{ar}), 128.5 (2 CH_{ar}), 127.6 (2 CH_{ar}), 126.9 (2 CH_{ar}), 125.1 (2 CH_{ar}), 125.0 (2 CH_{ar}), 119.9 (CH_{ar}), 66.9 (C_1), 55.7 (C_3), 47.0 (C_8), 38.0 (C_7), 17.7 (3 C_6), 11.8 (3 C_5).

IR (cm^{-1}): 2946, 2867, 1705, 1506, 1450, 1353, 1213, 1049, 908, 883, 728, 698.

HRMS (ESI+) m/z: Calcd. for $C_{33}H_{42}NO_4Si$ $[M + H]^+$ 544.2883; found 544.2892.

- **(S)-(2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl 2,2,14,14-tetramethyl-4,12-dioxo-3,13-dioxa-5,11-diazapentadecane-6-carboxylate (Boc-Lys(Boc)-OSEM)**



$C_{22}H_{44}N_2O_7Si$
476,68

To Boc-Lys(Boc)-OH.DCHA (400 mg, 0.76 mmol) in CH_2Cl_2 (2.65 mL) at 0 °C was added SEMCl (149 µL, 0.84 mmol) was added.
Purification over flash chromatography (eluent: Petroleum Ether/Ethyl Acetate 80:20).
Colorless viscous oil: 82% of yield.

$[\alpha]_D^{20}$ = – 2.7 (*c* 1.48, $CHCl_3$).

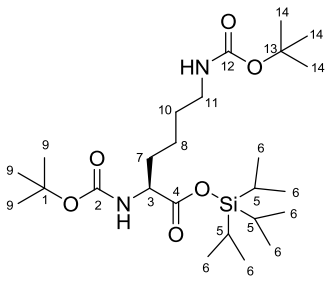
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) *δ* (ppm): 5.35-5.36 (m, 1H, H_5), 5.28-5.29 (m, 1H, H_5), 5.12 (brs, 1H, NH), 4.59 (brs, 1H, NH), 4.28 (brs, 1H, H_3), 3.68-3.72 (m, 2H, H_6), 3.08-3.11 (m, 2H, H_{13}), 1.81-1.88 (m, 1H, H_9), 1.61-1.70 (m, 1H, H_9), 1.43 (s, 18H, H_{11} + H_{16}), 1.36-1.52 (m, 4H, H_{12} + H_{10}), 0.93-0.97 (m, 2H, H_7), 0.01 (s, 9H, H_8).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.5 (C_4), 156.0 (C_{14} or C_2), 155.5 (C_{14} or C_2), 89.6 (C_5), 79.9 (C_{15} or C_1), 79.1 (C_{15} or C_1), 68.1 (C_6), 53.3 (C_3), 40.0 (C_{13}), 32.2 (C_9 or C_{12}), 29.5 (C_9 or C_{12}), 28.4 (3 C_{16} or 3 C_{11}), 28.3 (3 C_{16} or 3 C_{11}), 22.4 (C_{10}), 18.0 (C_7), – 1.5 (3 C_8).

IR (cm^{-1}): 3355, 2954, 1693, 1513, 1457, 1391, 1365, 1248, 1165, 1102, 857, 835.

HRMS (ESI+) m/z: calcd. for $C_{22}H_{45}N_2O_7Si$ $[M + H]^+$ 477.2996; found 477.2987.

- **(S)-triisopropylsilyl 2,6-bis(tert-butoxycarbonylamino)hexanoate (Boc-Lys(Boc)-OTIPS)**



$C_{25}H_{50}N_2O_6Si$
502,76

To Boc-Lys(Boc)-OH-DCHA (400 mg, 0.76 mmol) in CH_2Cl_2 (2.65 mL) at 0 °C was added TIPSCl (180 µL, 0.84 mmol).
Purification over flash chromatography (eluent: Petroleum Ether/Ethyl Acetate 90:10).
Colorless viscous oil: 90% of yield.

$[\alpha]_D^{20}$ = + 1.20 (*c* 0.82, $CHCl_3$).

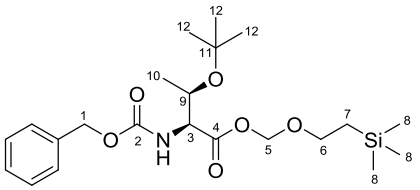
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) *δ* (ppm): 5.07 (brd, *J* = 7.8 Hz, 1H, NH), 4.55 (m, 1H, NH), 4.28 (m, 1H, H_3), 3.10 (m, 2H, H_{11}), 1.83-1.90 (m, 1H, H_7), 1.62-1.72 (m, 1H, H_7), 1.45-1.60 (m, 2H, H_{10}), 1.44 (s, 18H, H_9 + H_{14}), 1.25-1.36 (m, 5H, H_8 + H_5), 1.09 (d, *J* = 7.2 Hz, 18H, H_6).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.6 (C_4), 156.0 (C_{12} or C_2), 155.5 (C_{12} or C_2), 79.6 (C_{13} or C_1), 79.0 (C_{13} or C_1), 54.2 (C_3), 40.2 (C_{11}), 32.4 (C_{10} or C_7), 29.5 (C_{10} or C_7), 28.4 (C_{14} or 3 C_9), 28.3 (C_{14} or 3 C_9), 22.5 (C_8), 17.7 (3 C_6), 11.8 (3 C_5).

IR (cm^{-1}): 3357, 2944, 2868, 1692, 1512, 1461, 1365, 1248, 1165, 883, 733, 674.

HRMS (ESI+) m/z: Calcd. for $C_{25}H_{51}N_2O_6Si$ $[M + H]^+$ 503.3516; found 503.35243.

- **(2S,3R)-(2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl 2-(benzyloxycarbonylamino)-3-tert-butoxybutanoate (Cbz-Thr(*t*Bu)-OSEM)**



$C_{22}H_{37}NO_6Si$
439,62

To Cbz-Thr(*t*Bu)-OH-DCHA (600 mg, 1.22 mmol) in CH_2Cl_2 (7.00 mL) at 0 °C was added SEMCl (244 µL, 1.38 mmol).
Purification over flash chromatography (eluent: Petroleum Ether/Ethyl Acetate 85:15).
Colorless viscous oil: 93% of yield.

$[\alpha]_D^{20}$ = + 4.60 (*c* 1.31, $CHCl_3$).

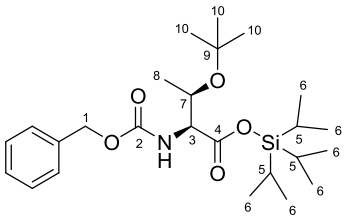
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.31-7.40 (m, 5H, CH_{ar}), 5.59 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, NH), 5.37 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, H_5), 5.26 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, H_5), 5.13 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, H_1), 5.10 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, H_1), 4.21-4.26 (m, 2H, H_9 + H_3), 3.70-3.74 (m, 2H, H_6), 1.22 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H, H_{10}), 1.11 (s, 9H, H_{12}), 0.94-0.98 (m, 2H, H_7), 0.02 (s, 9H, H_8).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 170.9 (C_4), 156.7 (C_2), 136.3 (C_{ar}), 128.5 (2 CH_{ar}), 128.2 (2 CH_{ar}), 128.1 (CH_{ar}), 90.2 (C_5), 74.0 (C_9), 68.3 (C_{11}), 67.2 (C_1 or C_6), 67.0 (C_1 or C_6), 59.9 (C_3), 28.4 (3 C_{12}), 21.0 (C_{10}), 17.9 (C_7), – 1.4 (3 C_8).

IR (cm^{-1}): 2976, 1726, 1505, 1249, 1195, 1087, 1066, 857, 834, 751, 695.

HRMS (ESI+) m/z: Calcd. for $C_{22}H_{38}NO_6Si$ $[M + H]^+$ 440.2468; found 440.2462.

- **(2S,3R)-triisopropylsilyl 2-(benzyloxycarbonylamino)-3-tert-butoxybutanoate (Cbz-Thr(*t*Bu)-OTIPS)**



$C_{25}H_{43}NO_5Si$
465,70

To Cbz-Thr(*t*Bu)-OH-DCHA (500 mg, 1.02 mmol) in CH_2Cl_2 (5.85 mL) at 0 °C was added TIPSCl (240 µL, 1.12 mmol).
Purification over flash chromatography (eluent: Petroleum Ether/Ethyl Acetate 95:5).
Colorless viscous oil: 73% of yield.

$[\alpha]_D^{20}$ = – 16.0 (*c* 1.31, $CHCl_3$).

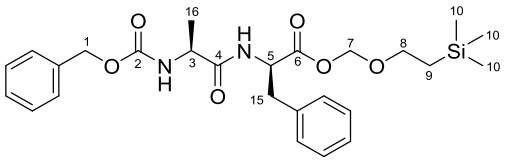
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) *δ* (ppm): 7.31-7.40 (m, 5H, CH_{ar}), 5.55 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, NH), 5.13 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H, H_1), 5.09 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H, H_1), 4.18-4.30 (m, 2H, H_3 + H_7), 1.26-1.33 (m, 3H, H_5), 1.22 (d, *J* = 4.2 Hz, 3H, H_8), 1.14 (s, 9H, H_{10}), 1.08 (d, *J* = 7.9, 18H, H_6).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 171.0 (C_4), 156.6 (C_2), 136.3 (C_{ar}), 128.5 (2 CH_{ar}), 128.2 (2 CH_{ar}), 128.1 (CH_{ar}), 73.9 (C_7), 67.2 (C_9), 66.9 (C_1), 61.1 (C_3), 28.7 (3 C_{10}), 17.7 (6 C_6 + C_8), 11.9 (3 C_5).

IR (cm^{-1}): 2945, 2869, 1717, 1498, 1465, 1283, 1200, 1067, 883, 733, 686.

HRMS (ESI+) m/z: Calcd. for $C_{25}H_{44}NO_5Si$ $[M + H]^+$ 466.2989; found 466.2991.

- **(S)-(2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl 2-((S)-2-(benzyloxycarbonylamino)propanamido)-3-phenylpropanoate (Cbz-Ala-(D)-Phe-OSEM)**



$C_{26}H_{36}N_2O_6Si$
500,66

To Cbz-Ala-(D)-Phe-OH (100 mg, 0.27 mmol) in CH_2Cl_2 (1.70 mL) at 0 °C was added dicyclohexylamine (DCA) (59 µL, 0.30 mmol). Then, SEMCl (53 µL, 0.30 mmol) was added.
Purification over flash chromatography (eluent: Petroleum Ether/Ethyl Acetate 80:20).
Colorless viscous oil: 75% of yield.

$[\alpha]_D^{20}$ = – 28.6 (*c* 0.84, $CHCl_3$).

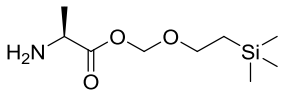
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) *δ* (ppm): 7.22-7.35 (m, 10H, CH_{ar}), 7.12 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, NH), 5.42 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, NH), 5.30 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, H_7), 5.28 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, H_7), 5.09 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H, H_1), 5.05 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H, H_1), 4.88 (m, 1H, H_5 or H_3), 4.25 (m, 1H, H_5 or H_3), 3.62-3.76 (m, 2H, H_8), 3.06-3.20 (m, 2H, H_{15}), 1.29 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, H_{20}), 0.96 (m, 2H, H_9), 0.03 (s, 9H, H_{10}).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 171.8 (C_4 or C_6), 171.0 (C_4 or C_6), 155.8 (C_2), 136.1 (C_{ar}), 135.5 (C_{ar}), 129.3 (2 CH_{ar}), 128.5 (2 CH_{ar}), 128.1 (2 CH_{ar}), 128.0 (2 CH_{ar}), 127.1 (2 CH_{ar}), 90.0 (C_7), 68.3 (C_1 or C_8), 66.9 (C_1 or C_8), 52.9 (C_3 or C_5), 50.4 (C_3 or C_5), 37.6 (C_{15}), 18.7 (C_9), 17.9 (C_{20}), – 1.5 (3 C_{10}).

IR (cm^{-1}): 3313, 2953, 1723, 1662, 1498, 1454, 1247, 1100, 857, 834, 742, 702.

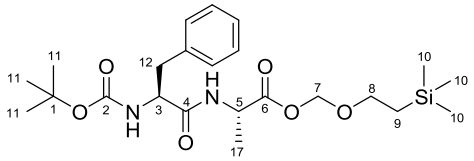
HRMS (ESI+) m/z: Calcd. for $C_{26}H_{37}N_2O_6Si$ $[M + H]^+$ 501.2421; found 501.2421.

- **(S)-(2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl 2-aminopropanoate (H_2N-Ala-OSEM)**



To Fmoc-Ala-OSEM (500 mg, 1.13 mmol) was added a solution of MeCN–Et_2NH (90:10, *c* 0.1 M), and the mixture was stirred for 1.5 h. at RT. Upon completion of the reaction (TLC monitoring), the solvent and diethylamine were removed under vacuum and the free amine H_2N-Ala-OSEM was keep under vacuum for 1 h before being used without further purification.

- **(S)-(2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl 2-((S)-2-(tert-butoxycarbonylamino)-3 phenylpropanamido)propanoate (Boc-Phe-Ala-OSEM)**



$C_{23}H_{38}N_2O_6Si$
466,64

To a solution of Boc-Phe-OH (451 mg, 1.70 mmol) in CH_2Cl_2 (*c* 0.5 M) were successively added DIPEA (787 µL, 4.52 mmol), PyBOP (884 mg, 1.70 mmol) and H_2N-Ala-OSEM (**5**; 248 mg, 1.13 mmol), and the reaction was stirred at RT for 2 h. Upon completion of the reaction, the mixture was washed with HCl (0.1 M; 5 mL) and the resulting aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 (3 × 5 mL). The organic phases were combined and washed with a sat. aq $NaHCO_3$ (2 × 10 mL), and the aqueous phase was further extracted with CH_2Cl_2 (3 × 10 mL). The organic phases were combined, washed with brine (20 mL), dried over $MgSO_4$, and evaporated under reduced pressure.

Purification was performed by column chromatography on silica gel (pentane–EtOAc, 80:20) to give the desired dipeptide.

Yield: 721 mg (91%); colorless oil.

$[\alpha]_D^{20}$ = –4.0 (*c* 0.99, $CHCl_3$).

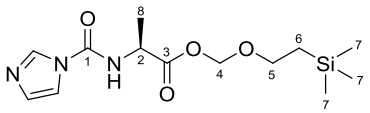
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.19–7.31 (m, 5H, CH_{ar}), 6.51 (brd, J = 6.8 Hz, 1H, NH), 5.34 (d, J = 6.1 Hz, 1H, NH), 5.27 (d, J = 6.1 Hz, 1H, H_7), 5.00 (brs, 1H, H_7), 4.49–4.56 (m, 1H, H_5 or H_3), 4.37–4.38 (m, 1 H, H_5 or H_3), 3.65–3.74 (m, 2H, H_8), 3.07 (m, 2H, H_{12}), 1.40 (s, 9H, H_{11}), 1.37 (s, J = 7.2 Hz, 3H, H_{17}), 0.93–0.97 (m, 2H, H_9), 0.02 (s, 9H, H_{10}).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.1 (C_6 or C_4), 170.8 (C_6 or C_4), 155.4 (C_2), 136.5 (C_{ar}), 129.3 (2 CH_{ar}), 128.5 (CH_{ar}), 126.8 (2 CH_{ar}), 89.7 (C_7), 80.1 (C_1), 68.0 (C_8), 55.4 (C_5 or C_3), 48.1 (C_5 or C_3), 38.3 (C_{12}), 28.2 (3 C_{11}), 18.1 (C_{17}), 17.9 (C_9), – 1.5 (3 C_{10}).

IR (cm^{-1}): 3294, 2953, 1646, 1528, 1250, 1168, 1102.

HRMS (ESI+) m/z: Calcd for $C_{23}H_{39}N_2O_6Si$ $[M+H]^+$ 467.2577; found: 467.2572.

- **(S)-(2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl 2-(1H-imidazole-1-carboxamido)propanoate (Imi-Ala-OSEM)**



$C_{13}H_{23}N_3O_4Si$
313,42

The free amine product H_2N-Ala-OSEM (248 mg, 1.13 mmol) was solubilized in CH_2Cl_2–THF (5:1 v/v, *c* 0.5 M) at RT. Then, CDI (272 mg, 1.68 mmol) was added and the reaction was stirred overnight.
Upon completion of the reaction, the mixture was washed with H_2O (10 mL), the organic phase was separated and the aqueous phase was further extracted with CH_2Cl_2 (2 × 15 mL). The organic layers were combined, dried over $MgSO_4$, and evaporated under reduced pressure.
Imi-Ala-OSEM was purified through a short plug of silica gel (EtOAc–pentane, 70:30) and isolated. Yield: 279 mg (79%); pale oil.

$[\alpha]_D^{20}$ = + 11.2 (*c* 0.89, $CHCl_3$).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 8.17 (s, 1 H, H_{10} or H_9 or H_8), 7.41 (br t, J = 1.4 Hz, 1 H, H_{10} or H_9 or H_8), 7.17 (brd, J = 7.1 Hz, 1H, NH), 7.07 (s, 1 H, H_{10} or H_9 or H_8), 5.41 (d, J = 6.0 Hz, 1 H, H_4), 5.34 (d, J =

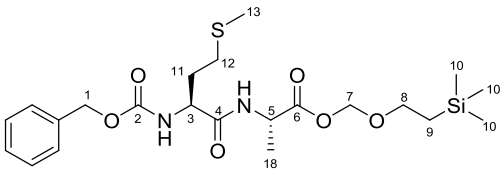
6.0 Hz, 1 H, H_4), 4.62–4.70 (m, 1 H, H_2), 3.67–3.77 (m, 2 H, H_5), 1.55 (d, *J* = 7.2 Hz, 3 H, H_{11}), 0.93–0.97 (m, 2 H, H_6), 0.01 (s, 9 H, H_7).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.2 (C_3), 148.6 (C_1), 136.1 (CH_{ar}), 129.6 (CH_{ar}), 116.4 (CH_{ar}), 89.9 (C_4), 68.1 (C_5), 49.6 (C_2), 17.9 (C_{11}), 17.4 (C_6), –1.6 (3 C_7).

IR (cm^{-1}): 3216, 2953, 1721, 1548, 1249, 1098.

HRMS (ESI+) m/z: calcd for $C_{13}H_{24}N_3O_4Si$ $[M+H]^+$ 314.1536; found: 314.1535.

- **<u>(S)-(2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl 2-((S)-2-(benzyloxycarbonylamino)-4 (methylthio)butanamido)propanoate (Cbz-Met-Ala-OSEM)</u>**



$C_{22}H_{36}N_2O_6SSi$
484,68

To a solution of Imi-Ala-OSEM (131 mg, 0.42 mmol) in CH_2Cl_2 (*c* 1.0 M) at RT were successively added HOBt (6.40 mg, 0.042 mmol) followed by Cbz-Met-OH (178 mg, 0.63 mmol), and the mixture was stirred at RT for 20 h. Upon completion of the reaction (TLC monitoring), the mixture was washed with aq HCl (0.1 M; 5 mL) and the aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 (2 × 10 mL). The organic layers were combined, washed with sat. aq $NaHCO_3$ (2 × 10 mL) and brine (20 mL), dried over $MgSO_4$, and the solvent was evaporated under reduced pressure.
Purification was performed by column chromatography on silica gel (pentane-EtOAc, 80:20) to give the desired dipeptide.
Yield: 142 mg (70%); white solid.

$[\alpha]_D^{20}$ = – 3.80 (*c* 1.04, $CHCl_3$).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) *δ* (ppm): 7.29–7.34 (m, 5 H, CH_{ar}), 6.79 (brd, *J* = 7.1 Hz, 1 H, NH), 5.63 (brd, *J* = 8.2 Hz, 1 H, NH), 5.37 (d, *J* = 6.0 Hz, 1 H, H_7), 5.28 (d, *J* = 6.0 Hz, 1 H, H_7), 5.06–5.13 (m, 2 H, H_1), 4.51–

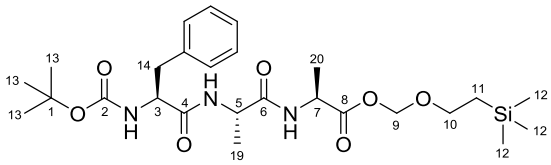
4.60 (m, 1 H, H_5 or H_3), 4.39–4.49 (m, 1 H, H_5 or H_3), 3.65–3.75 (m, 2 H, H_8), 2.59 (t, *J* = 7.2 Hz, 2 H, H_{16}), 1.97–2.09 (m, 5 H, H_{17} + H_{15}), 1.42 (d, *J* = 7.2 Hz, 3 H, H_{18}), 0.93–0.97 (m, 2 H, H_9), 0.01 (s, 9 H, H_{10}).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.1 (C_6 or C_4), 170.8 C_6 or C_4), 156.0 (C_2), 136.1 (C_{ar}), 128.4 (2 CH_{ar}), 128.1 (CH_{ar}), 128.0 (2 CH_{ar}), 89.8 (C_7), 68.0 (C_1 or C_8), 67.0 (C_1 or C_8), 53.5 (C_5 or C_3), 48.1 (C_5 or C_3), 31.8 (C_{16} or C_17), 29.3 (C_{16} or C_{17}), 18.8 (C_{18}), 17.9 (C_9), 15.0 (C_{15}), –1.5 (3 C_{10}).

IR (cm^{-1}): 3302, 2953, 1661, 1536, 1249, 1103, 1051.

HRMS (ESI+) m/z: Calcd for $C_{22}H_{37}N_2O_6SiS$ $[M+H]^+$ 485.2142; found: 485.2147.

- **(2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl (tert-butoxycarbonyl)-L-phenylalanyl-L-alanyl-L-alaninate (Boc-Phe-Ala-Ala-OSEM)**



$C_{26}H_{43}N_3O_7Si$
537,72

This tripeptide was prepared from Imi-Ala-OSEM (176 mg, 0.56 mmol) and Boc-Phe-Ala-OH (126 mg, 0.37 mmol) by following the procedure described for peptide coupling reactions.
Yield: 95 mg (48%); pale oil.

$[\alpha]_D^{20}$ = –11.8 (*c* 1.02, $CHCl_3$).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) *δ* (ppm): 7.16–7.29 (m, 5 H, CH_{ar}), 6.93 (brd, J = 7.2 Hz, 1H, NH), 6.72 (brd, J = 6.8 Hz, 1 H, NH), 5.37 (d, J = 6.0 Hz, 1 H, H_9), 5.28 (d, J = 6.0 Hz, 1 H, H_9), 5.10 (brd, J = 7.6 Hz, 1 H, NH), 4.47–4.55 (m, 2 H, H_7 or H_5 or H_3), 4.38–4.39 (m, 1 H, H_7 or H_5 or H_3), 3.65–3.75 (m, 2 H, H_{10}), 3.00–3.10 (m, 2 H, H_{14}), 1.40 (d, J = 7.2 Hz, 3 H, H_{20} or H_{19}), 1.38 (s, 9 H, H_{13}), 1.32 (d, *J* = 7.0 Hz, 3 H, H_{20} or H_{19}), 0.92–0.97 (m, 2 H, H_{11}), 0.01 (s, 9 H, H_{12}).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.2 (C_8 or C_6 or C_4), 171.3 (C_8 or C_6 or C_4), 171.1 (C_8 or C_6 or C_4), 141.0 (C_2), 136.3 (C_{ar}), 129.3 (2 CH_{ar}), 128.6 (2 CH_{ar}), 127.0 (CH_{ar}), 89.8 (C_9), 80.4 (C_1), 68.1 (C_{10}), 55.7 (C_7

or C_5 or C_3), 48.8 (C_7 or C_5 or C_3), 48.2 ($_C$7 or C_5 or C3), 38.2 (C_{14}), 28.2 (3 C_{13}), 18.3 (C_{20} or C_{19}) , 18.0 (C_{20} or C_{19} or C_{11}), 18.0 (C_{20} or C_{19} or C_{11}), –1.5 (3 C_{12}).

IR (cm^{-1}): 3304, 2953, 1660, 1532, 1248, 1099, 1046, 834.

HRMS (ESI+) m/z: Calcd for $C_{26}H_{44}N_3O_7Si$ $[M+H]^+$ 538.2949; found: 538.2952.