



HAL
open science

Conception, synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs fluorés non covalents du protéasome

Massaba Keita

► **To cite this version:**

Massaba Keita. Conception, synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs fluorés non covalents du protéasome. Autre. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA114859 . tel-01059792

HAL Id: tel-01059792

<https://theses.hal.science/tel-01059792>

Submitted on 27 Nov 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

DISCIPLINE : Chimie Médicinale

ANNÉE 2009 - 2012

SÉRIE DOCTORAT N° 12031

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue le 14/12/2012

Par

Melle Massaba KEITA

Conception, synthèse et évaluation biologique
d'inhibiteurs fluorés non covalents du protéasome 26S

Directeur de thèse :

Mme Sandrine ONGERI Professeur (Université Paris-Sud 11)

Composition du jury :

Président du jury :

Bruno FIGADERE

Directeur de recherche (Université Paris-Sud 11)

Rapporteurs :

Michèle BAUDY FLOC'H

Directeur de recherche (Université de Rennes 1)

Thierry BRIGAUD

Professeur (Université de Cergy-Pontoise)

Examineurs :

Thomas LECOURT

Maitre de conférences (Université Paris Descartes)

Benoit CROUSSE

Directeur de recherche (Université Paris-Sud 11)

Sommaire

Introduction Générale

Chapitre I : Inhibiteurs du protéasome et intérêt du fluor en chimie médicinale

I. Les inhibiteurs du protéasome:	3
I.1. Structure et fonction du protéasome :	3
I.1.a. Le protéasome 26S :	5
I.1.b. Rôle du protéasome:	9
I.2. Les inhibiteurs du protéasome:	10
I.2.a. Les inhibiteurs covalents:	11
I.2.b. Les inhibiteurs non-covalents:	24
II. Intérêt du fluor en chimie médicinale :	31
II.1. Généralités sur le fluor :	31
II.1.a. Propriétés physico-chimiques du fluor.	31
II.1.b. Effet du fluor sur la lipophilie :	32
II.1.c. Effet du fluor sur l'acidité, basicité et liaison hydrogène	33
II.1.d. Effet du fluor sur les propriétés biologiques	34
II.1.e. Inhibiteurs d'enzymes par modification de la réactivité chimique :	38
II.1.f. RMN du fluor et applications :	40
II.2. Les peptidomimétiques fluorés:	51
II.2.a. isostères fluorés de la liaison peptidique :	52
II.2.b Les acides aminés fluorés :	55
II.2.c. les isostères fluorés de l'état de transition:	58

Chapitre II : Synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs du protéasome dérivés de scaffolds α et β hydrazino acides

I. Objectifs et conception:	60
II. Synthèse:	66
II.1. Synthèse d'analogues β -hydrazino acides trifluorométhylés:	66
II.2. Synthèse d'analogues non fluorés β -hydrazino acides:	68
II.2.a. analogues β -hydrazino acides non fluorés avec la phénylalanine sur la partie 4 :	68
II.2.b. analogues β -hydrazinoacide non fluorés avec la 3,4,5-triméthoxybenzylamine sur la partie 4 :	70

II.2.c. analogues β -hydrazinoacide non fluorés avec la liaison amine sur la partie 1	72
II.3. Synthèse d'analogues α -hydrazino acides	75
II.3.a analogues α -hydrazinoacides avec la lysine sur la partie 2:	75
II.3.b. analogues α -hydrazinoacides avec le tryptophane sur la partie 2:.....	76
III. Résultats de l'évaluation biologique:	78
IV. Modélisation moléculaire :.....	86
IV.1. Validation de notre modèle:	87
IV.2. <i>Docking</i> de nos molécules:.....	91
V. Evaluation biologique par RMN du ^{19}F :	94
V.1. Principe de l'évaluation biologique par fluorescence:	94
V.2. Approche par RMN du fluor:	95
V.2.a. Substrat fluoré 1:	96
V.2.b. Substrat fluoré 2 :	100
V.2.c. Substrat fluoré 3 :	103
V.3. Application à la détermination des IC_{50} :	108
V.3.a. Rappel sur la cinétique enzymatique: ²⁰⁶	108
V.3.b. Détermination du K_m par fluorescence:	112
V.3.c. Détermination du K_m par RMN du fluor:	114
V.4. Détermination de l' IC_{50} :	115
V.4.a. Par fluorescence:.....	115
V.4.b. Par RMN du ^{19}F :.....	119
V.5. Conclusion et perspectives:	119
VI. Conclusion du chapitre II :	120

Chapitre III : Motifs contraints et fluorés : cyclopropane, *N*-aminoaziridine

I. Objectifs :	121
II. Rappels sur les structures peptidiques contenant un motif cyclopropane non fluoré :.....	125
II.1. Les peptidomimétiques contraints :	125
II.2. Voie d'accès aux peptidomimétiques cyclopropaniques :.....	126
II.3. Les cyclopropanes comme isostères de dipeptides :	129
II.4. Les cyclopropanes et les structures secondaires:.....	130
II.4.a. Hélice α :	130
II.4.b. Coude β :.....	132
II.4.c. Brin β :	132

II.5. Peptidomimétiques cyclopropaniques et fluorés :	134
III. Rappels bibliographiques sur le mode d'accès des cyclopropanes trifluorométhylés	135
III.1. Cyclopropanation par des carbènes trifluorométhyles (voie 2):	135
III.2. Cyclopropanation par réaction de Michael Tandem addition nucléophile-cyclisation (voie 1 et 3):	138
IV. Synthèse de cyclopropanes trifluorométhyles:	141
V. Les <i>N</i> -aminoaziridines :	149
V.1. Généralités sur les <i>N</i> -aminoaziridines	149
V.1.a. Synthèse en présence de tétraacétate de Plomb	149
V.1.b. Synthèse en présence de diacétate d'iodobenzène :	151
V.2. Réaction d'aziridination :	152
V.3. Déprotection des <i>N</i> -aminoaziridines:	155
VI. Conclusions et perspectives du chapitre 3 :	156

Conclusion Générale

Partie Expérimentale

Introduction générale:

Le protéasome 26S est une macromolécule impliquée dans la dégradation de la majorité des protéines cellulaires. Parmi ces protéines, il y a les différents régulateurs de processus cruciaux tels que les protéines responsables de la progression du cycle cellulaire, de l'apoptose, des réponses inflammatoires, de l'activation de NF- κ B, de la présentation antigénique et de la différenciation cellulaire. Par conséquent, les inhibiteurs du protéasome sont des agents thérapeutiques dans des pathologies tels que le cancer, l'inflammation et les maladies auto-immunes. En effet, les inhibiteurs du protéasome sont connus pour induire la mort sélective des cellules cancéreuses tout en les rendant plus sensibles aux autres traitements anticancéreux existants (chimiothérapie, radiothérapie...). L'objectif de notre laboratoire est de développer des inhibiteurs non covalents du protéasome de structures peptidomimétiques fluorés ou non fluorés, et de montrer l'intérêt du fluor en chimie médicinale. Mon projet de thèse s'inscrit dans ce cadre. Ce manuscrit s'articule en trois chapitres.

Le premier chapitre portera sur un rappel bibliographique de la structure du protéasome et des différentes classes d'inhibiteurs du protéasome décrites dans la littérature. Nous ferons aussi un rappel bibliographique sur l'intérêt du fluor en chimie médicinale. Nous montrerons des exemples où l'incorporation de groupements fluorés a été accompagnée d'une augmentation de l'affinité de molécules bioactives pour les macromolécules cibles et de la stabilité métabolique. Nous verrons aussi comment la RMN du ^{19}F peut être utilisée pour : i) évaluer l'affinité d'un ligand pour son récepteur et déterminer son IC_{50} ii) élucider un mécanisme réactionnel iii) étudier la structure et la dynamique des protéines. Enfin, nous verrons les différentes voies d'accès aux peptidomimétiques fluorés.

Dans le deuxième chapitre, nous parlerons de la démarche effectuée pour concevoir nos inhibiteurs du protéasome et leurs synthèses. Ensuite, grâce aux résultats de l'évaluation biologique nous établirons des relations structure-activité sur l'ensemble des molécules synthétisées. Nous allons aussi voir comment la modélisation moléculaire nous a permis d'émettre des hypothèses sur le mode de liaison de nos composés dans le site actif chymotrypsine-like du protéasome et ainsi de proposer une explication rationnelle aux différentes activités de nos composés. Enfin, pour mettre en valeur l'utilisation du fluor en

chimie médicinale, la technique du FABS basée sur la RMN du ^{19}F sera développée pour déterminer l' IC_{50} de nos molécules.

Le troisième et dernier chapitre portera sur les méthodologies de synthèse que nous avons mises au point pour développer des nouveaux synthons contraints fluorés dans le but de les incorporer dans nos inhibiteurs.

I. Les inhibiteurs du protéasome:

I.1. Structure et fonction du protéasome :

Dans une cellule vivante, le nombre de protéines est en constante balance entre le taux de synthèse et le taux de dégradation. La protéolyse joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie et la régulation de différents processus intracellulaires. La cellule a différentes stratégies pour éliminer les protéines anormales ou pour diminuer la concentration intracellulaire d'un type de protéines. Dans les cellules eucaryotes, les protéines sont dégradées principalement par deux mécanismes protéolytiques distincts. Les protéines intracellulaires à demi-vie longue, les membranes cellulaires et les protéines extra cellulaires sont dégradés par le système lysosomal.¹ La voie ubiquitine-protéasome (UP), est l'autre mécanisme protéolytique. Ce dernier, plus sélectif, est présent dans le cytosol et le noyau et est responsable de la majorité des dégradations non lysosomales. Cette voie (figure 1) utilise de l'ATP et contient le protéasome 26S à sa base. Elle joue un rôle de premier plan non seulement dans la dégradation de protéines à longue et courte durée de vie mais, aussi dans la suppression sélective des protéines anormales, mal repliées ou mal assemblées.² Les produits de dégradation du protéasome sont des peptides qui peuvent être antigéniques du système immunitaire. Un autre rôle du système UP est la régulation de différents processus cellulaires tels que la progression du cycle cellulaire, la différenciation cellulaire, la réponse au stress et l'apoptose.³

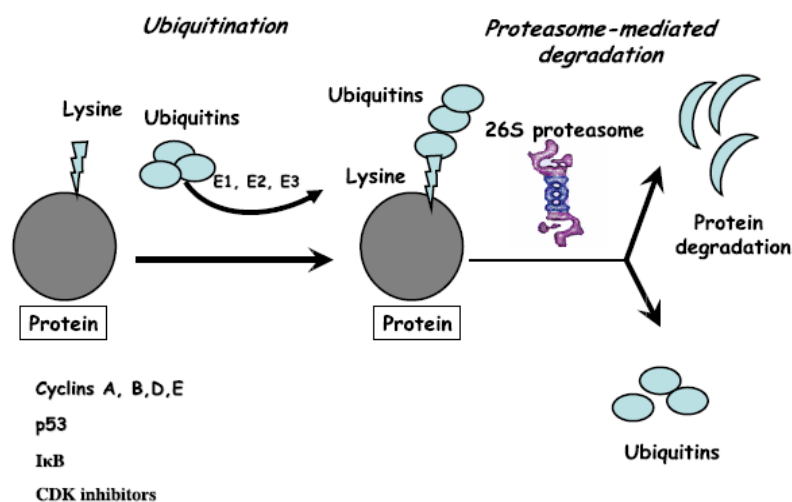
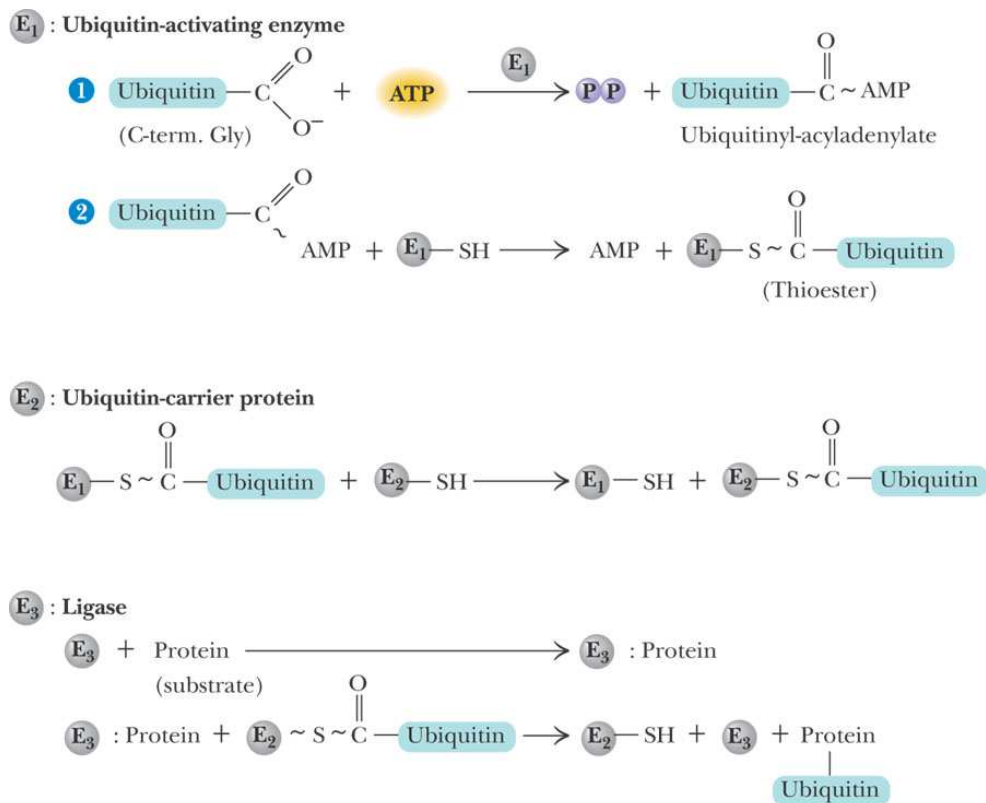


Figure 1 : schéma simplifié du système ubiquitine-protéasome.²

La majorité des protéines dégradées par le protéasome sont préalablement marquées par plusieurs molécules d'ubiquitine, une petite protéine de 8 kDa. Trois enzymes sont nécessaires pour réaliser cette polyubiquitination : l'activateur d'ubiquitine (E1), le transporteur d'ubiquitine (E2) et enfin la ligase d'ubiquitine (E3). Tout d'abord, il y a la formation de liaison thioester entre la partie C-terminale de la glycine de l'ubiquitine et la cystéine de l'enzyme E1. Ce processus est ATP-dépendant. Ensuite, il se produit une transthioestérification de l'enzyme E1 par la cystéine de l'enzyme E2. Enfin, l'enzyme E3 catalyse la formation de liaison entre la partie C-terminale de l'ubiquitine et un résidu lysine de la protéine cible (figure 2).⁴ E3 est capable de reconnaître la protéine cible qui doit être détruite.



© 2005 Brooks/Cole - Thomson

Figure 2 : réaction enzymatique pour la liaison d'ubiquitine à la protéine

I.1.a. Le protéasome 26S :

Le protéasome 26S ATP-dépendant a une forme cylindrique et comprend le protéasome 20S qui assure la protéolyse, et la partie 19S qui permet la fixation des protéines polyubiquitinées.⁵ Entre les deux, se trouve le domaine contenant 6 sites ATPases qui permet le déploiement et la translocation des protéines (figure 3).^{3,5}

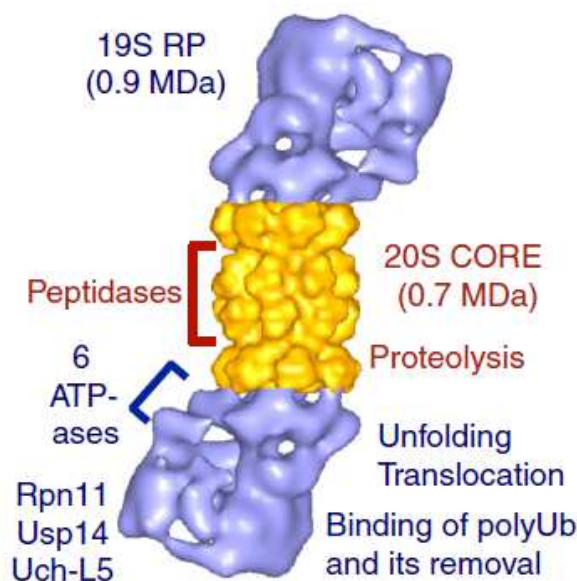


Figure 3 : structure du protéasome 26S d'après Kisselev *et al.*³

Le protéasome 20S :

Le protéasome 20S de masse molaire de 700 kDa est un cylindre creux formé de quatre anneaux empilés. Chaque anneau périphérique est composé de sept sous-unités α tandis que chaque anneau interne est composé de sept sous-unités β .⁴ Les trois sites actifs du protéasome sont situés dans les sous-unités β . Entre les sous-unités $\beta 1$ et $\beta 2$ se trouve le site caspase-like ou post-acide (PA) qui clive de préférence après les résidus acides. Entre les sous-unités $\beta 2$ et $\beta 3$ associée à une trypsine-like (TL) clive après un résidu basique. Enfin entre $\beta 5$ et $\beta 6$ se situe le site chymotrypsine-like (CT-L) responsable du clivage après des résidus hydrophobes (figure 4).^{1,3}

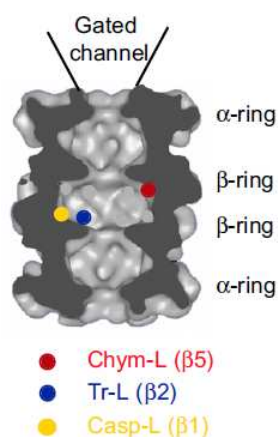


Figure 4 : coupe transversale du protéasome 20S montrant l'emplacement des sites actifs³

Dans tous les sites catalytiques, le résidu *N*-terminal qui est la thréonine 1 (Thr1) est utilisé comme nucléophile, ainsi le protéasome fait partie du groupe des "N-terminal nucléophile (Ntn) hydrolases". La thréonine 1 agit par attaque nucléophile de l'hydroxyle en γ sur le carbonyle des peptides à cliver. L'amine α de la Thr1 joue le rôle de base dans le cycle catalytique (figure 5A).⁶

L'architecture des sites actifs est bien connue grâce à de nombreuses études cristallographiques du protéasome 20S ou 26S⁷⁻¹¹ et d'inhibiteurs cristallisés au sein des différents sites actifs.^{1,12-16} Par exemple la co-cristallisation du TMC95¹ (inhibiteur non covalent du protéasome) au niveau des sites catalytiques du protéasome de levure montre, au niveau des 3 sites catalytiques, deux poches hydrophobes S1 et S3 dont l'occupation est indispensable pour la fixation du substrat au protéasome. L'occupation de deux autres poches accessoires (AS1 et AS2) est nécessaire pour avoir une sélectivité au protéasome par rapport aux autres protéases et d'améliorer l'activité inhibitrice des composés.¹⁷ La formation de liaison hydrogène avec certains acides aminés clés tels que la Thr21, Gly47, Ala49 et Asp114 (qui devient Asp125 dans le protéasome bovin) est aussi fondamentale pour une liaison du substrat au protéasome (figure 5B). Enfin tous les inhibiteurs du protéasome adoptent un feuillet β avec les acides aminés clés cités plus haut (pour plus de détail voir partie inhibiteurs du protéasome et modélisation moléculaire).

La spécificité de clivage de chacun des trois sites catalytiques est due au résidu 45 présent dans la poche S1. En effet, au niveau du site de clivage caspase-like ou post-acide (PA), le résidu 45 est une arginine chargée ce qui favorise les interactions électrostatiques d'où le clivage après les résidus acides. Au niveau du site trypsine, le résidu 45 est une glycine par

conséquent la poche S1 est très spacieuse et peut contenir des gros groupements. Enfin, dans le cas du site chymotrypsine, la position clé est occupée par une méthionine ce qui minimise l'espace de cette poche.¹

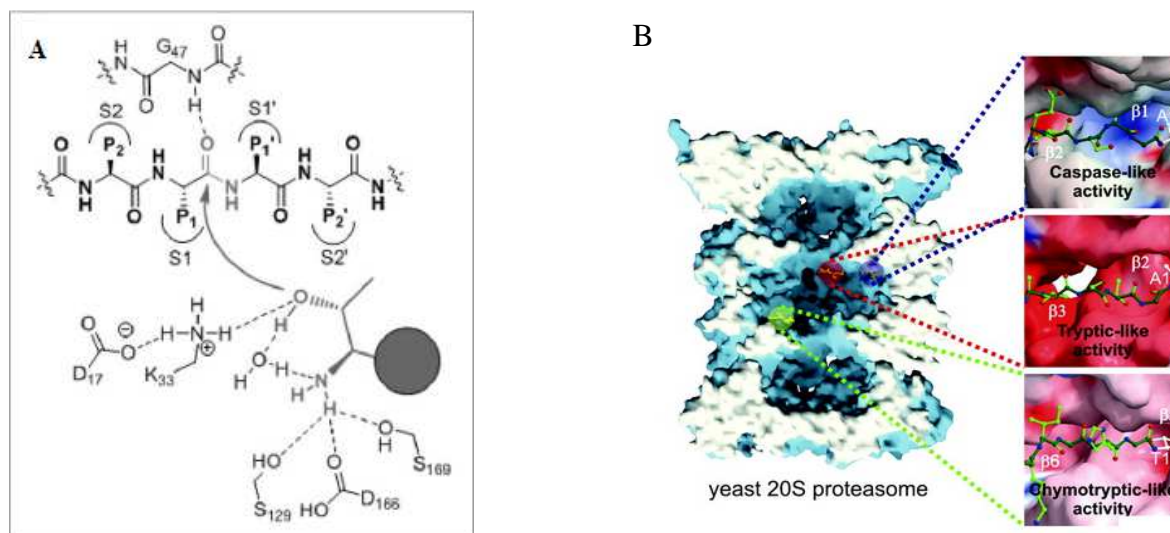


Figure 5 : sites actifs du protéasome d'après Groll *et al.*¹

En cas d'infection, pour augmenter la quantité de MHC (les présentateurs d'antigènes), l'activité du protéasome est altérée dans le but de produire des peptides antigéniques. Cette altération est due à la production d'interféron- γ (IFN- γ) qui stimule l'expression de 3 autres sous-unités β : $\beta 1i$, $\beta 2i$ et $\beta 5i$. Ces sous-unités sont incorporées dans une nouvelle forme de protéasome en remplaçant leurs homologues $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 5$ donnant ainsi l'immunoprotéasome (figure 6).¹⁸ Les interférons γ permettent aussi la surexpression d'un activateur de protéasome PA28 (11S cap) qui remplace la partie 19S.⁶

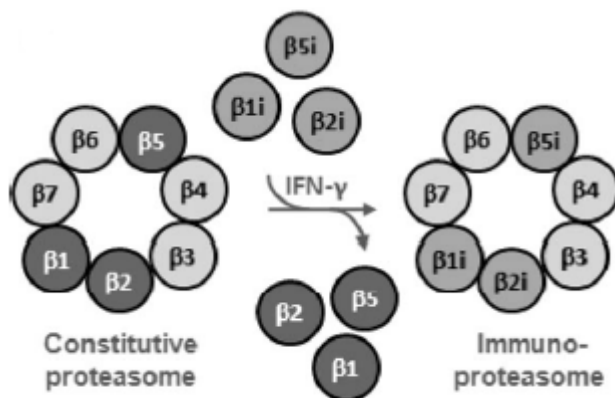


Figure 6 : formation de l'immunoprotéasome

Le complexe régulateur 19S:

La partie régulatrice 19S permet la fixation de protéines polyubiquitinées, leur dépliement et leur translocation dans le protéasome 20S. Cette particule est composée de 19 sous-unités et peut être divisée en deux parties : le couvercle et la base. Le couvercle est constitué de neuf protéines non ATPasiques (Rpn3, Rpn5-Rpn9, Rpn11, Rpn12 et sem1 dans la levure) et, d'une enzyme de deubiquitination (DUBs) dont l'activité est essentielle pour une dégradation efficace des substrats. Cette partie permet la fixation de la protéine polyubiquitinée. La base contient six sous-unités ATPasiques, Rpt1-Rpt6, qui forme un cercle hétéro-hexamérique et constitue le moteur du protéasome.¹⁹ Plusieurs rôles ont été attribués à cette partie ATPasique :

1. Elle fournirait l'énergie nécessaire pour la formation du protéasome 26S par assemblage du complexe 19S et du protéasome 20S.^{20, 21, 22}
2. Elle interagirait directement avec les sous-unités α la partie 20S et fournirait l'énergie nécessaire à l'ouverture du canal permettant le passage des protéines dans le site catalytique.²³
3. Elle fournirait l'énergie nécessaire pour la translocation des protéines dans le site catalytique.²⁴

Une récente publication de Lander *et al.*¹⁹ dans Nature montre l'architecture complète de la partie 19S (figure 7). Ce qui a permis de connaître l'arrangement spatial des récepteurs de protéines ubiquitinées et de l'enzyme de deubiquitination (Rpn11). En effet ils ont démontré que Rpn11 est située directement au dessus de l'entrée du pore et qu'elle est entourée par les récepteurs d'ubiquitines Rpn10 et Rpn13. Ceci a permis de connaître le chemin de dégradation du substrat et sera essentiel à l'élucidation de la façon dont les caractéristiques des modifications de l'ubiquitination peuvent affecter la reconnaissance du substrat et sa dégradation.¹⁹

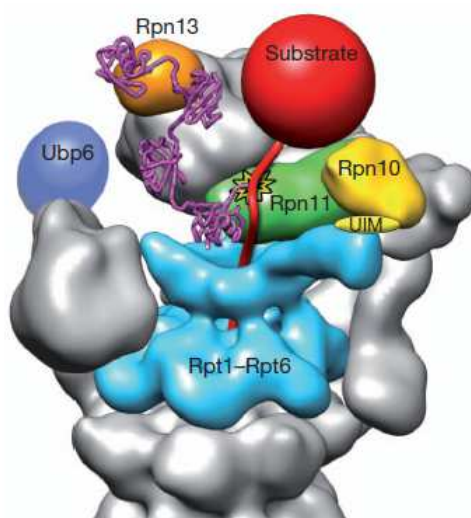


Figure 7 : modèle de reconnaissance, de deubiquitination et d'engagement de substrat polyubiquitiné par le protéasome 19S d'après Lander *et al.*¹⁹

I.1.b. Rôle du protéasome:

La majorité des protéines cellulaires sont dégradées par le système ubiquitine-protéasome. Parmi ces protéines, il y a les différents régulateurs de processus cruciaux comme les protéines responsables de la progression du cycle cellulaire, de l'apoptose, des réponses inflammatoires, de l'activation de NF- κ B, de la présentation antigénique, de la différenciation cellulaire et autres.²⁵ Par conséquent, le protéasome constitue une cible intéressante pour la découverte de médicaments.

Il a été établi qu'à cause d'un dysfonctionnement du cycle cellulaire, des cellules cancéreuses deviennent insensibles aux signaux de mort cellulaire et acquièrent la capacité de se diviser de façon autonome et anarchique. Les inhibiteurs du protéasome sont connus pour induire la mort cellulaire rapide et sélective des cellules transformées, mais pas des cellules normales grâce en particulier à la stabilisation des facteurs p53 et p27.²⁶⁻²⁸ Ces facteurs permettent l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1, l'induction de l'apoptose, et l'inhibition de NF- κ B. Ils accroissent ainsi l'apoptose et diminuent la prolifération cellulaire et l'angiogénèse (figure 8).² Ainsi, l'inhibition du protéasome est un objectif souhaitable pour le contrôle de la croissance anormale des cellules tumorales. De plus, des études récentes ont démontré que les inhibiteurs du protéasome utilisés comme traitement adjuvant sensibilisent les cellules cancéreuses aux autres chimiothérapies.²⁹⁻³¹

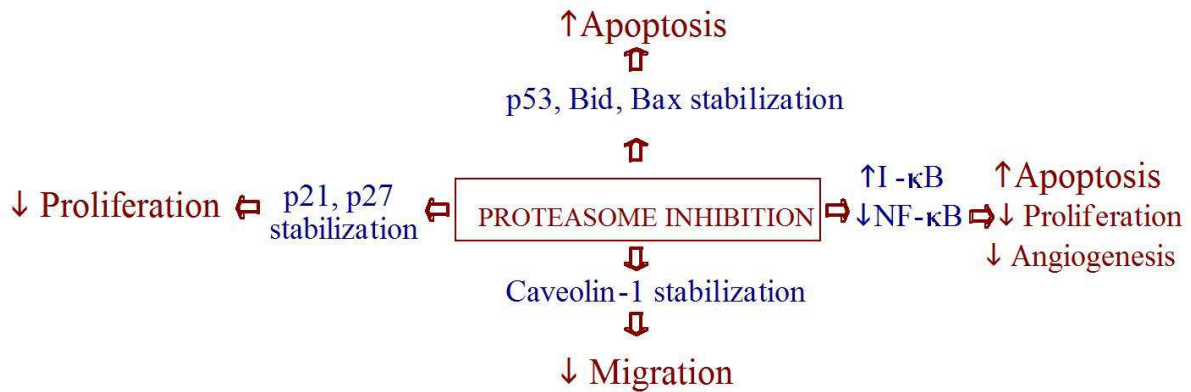


Figure 8 : conséquence de l'inhibition du protéasome³²

I.2. Les inhibiteurs du protéasome:

Parce que plus de 90% des protéines cellulaires sont dégradées par le protéasome, et grâce aux rôles thérapeutiques cités précédemment, la modulation ou l'inhibition de l'activité du protéasome présente un grand intérêt dans les processus biologiques. C'est pour cette raison qu'un grand nombre d'inhibiteurs de cette protéine ont été décrits dans la littérature.^{3,1,6,33,34,35} Le Bortezomib ou Velcade[®] 9 est le premier inhibiteur de protéasome approuvé par la FDA (food and drug administration USA) pour le traitement du myélome multiple en 2003 et du lymphome du manteau en 2006.^{36, 37} Actuellement d'autres inhibiteurs du protéasome sont en phase clinique de développement (figure 9).^{38,39} L'inhibition de tous les sites actifs n'est pas nécessaire pour avoir une activité significative du protéasome. En effet, l'inhibition ou l'inactivation du site chymotrypsine seule entraîne une bonne réduction de protéines dégradées.^{40,41,42} En revanche, l'inhibition des sites caspase et trypsine ont peu d'effet sur l'activité protéolytique globale.^{43,44,45} Par conséquent, presque toutes les molécules inhibitrices du protéasome en clinique agissent principalement sur le site chymotrypsine et ont peu d'effets sur les deux autres sites. Selon leur mode de liaison au protéasome, il existe deux classes d'inhibiteurs : les inhibiteurs covalents et les inhibiteurs non-covalents.

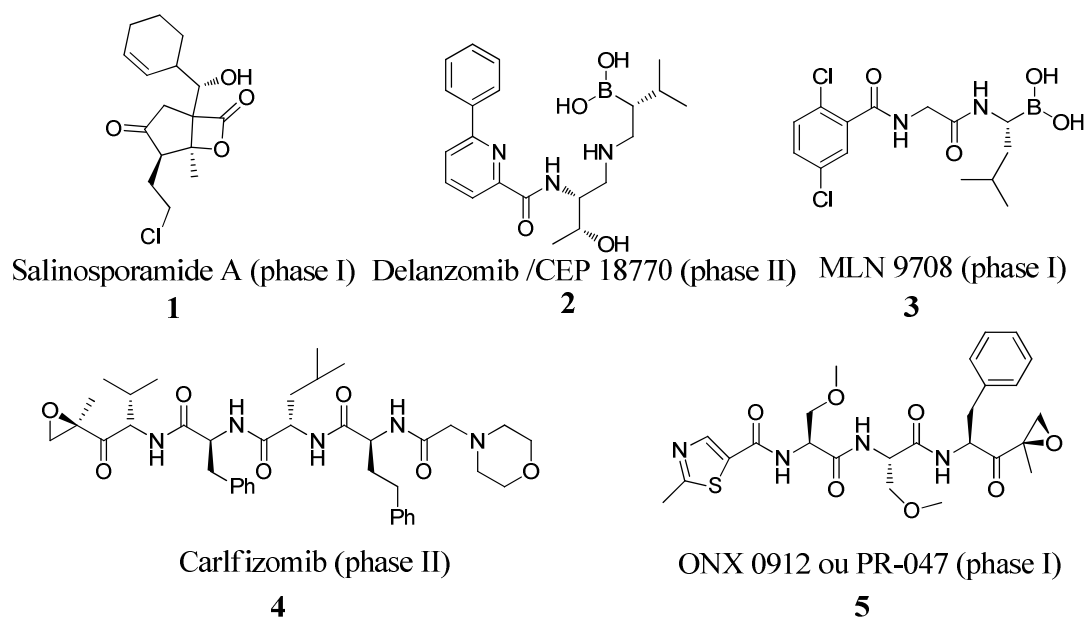


Figure 9 : inhibiteurs du protéasome en phase clinique

I.2.a. Les inhibiteurs covalents:

Ces inhibiteurs sont en général des petites séquences peptidiques avec des fonctions réactives dans la partie C-terminal.^{3,1,6,33} Cette fonction réactive interagit avec la thréonine 1 du site catalytique avec formation de liaison covalente plus ou moins réversible. La partie peptidique permet quant à elle la reconnaissance et occupe les différentes poches du site catalytique. L'avantage de ces inhibiteurs est qu'ils peuvent être utilisés comme outils pour étudier la régulation du système ubiquitine-protéasome dans différents tissus et cellules et comme chef de file de potentiels médicaments. En revanche, l'inhibition prolongée du protéasome par ces molécules est toxique pour presque toutes les cellules et entraîne leur mort par apoptose.⁴⁶ De plus les groupements réactifs de ces composés peuvent réagir avec d'autres nucléophiles de l'organisme entraînant ainsi un manque de sélectivité.

Les peptides aldéhydes:

Ce sont les premiers inhibiteurs du protéasome décrits dans la littérature. Ces composés forment une liaison covalente par attaque de l'hydroxyle de la thréonine 1 du protéasome sur la fonction aldéhydique (figure 10). Ceci conduit à la formation d'une liaison hémiacétale réversible. Ces inhibiteurs rentrent aisément dans la cellule et leur effet est réversible car ils sont facilement oxydés en acides carboxyliques et expulsés de la cellule par le système de

transporteur MDR (MultiDrug Resistance). Par conséquent, il y a une rapide perte d'inhibition lors des expériences dans les cultures cellulaires.¹

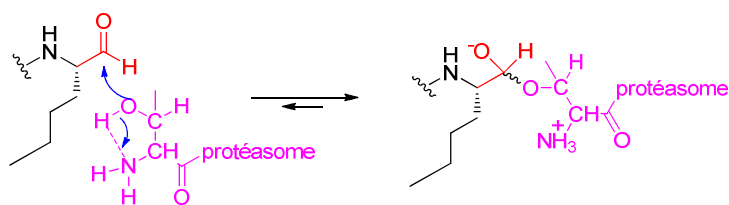
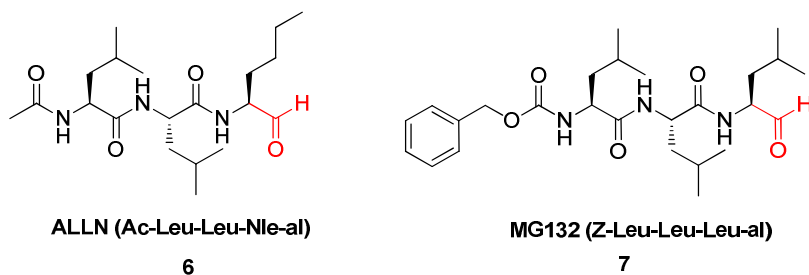


Figure 10 : mécanisme de formation de la liaison hémiacétate des peptides aldéhydes avec la Thr1

Les peptides aldéhydes sont bien connus comme étant des inhibiteurs des protéases à sérine et à cystéine, et peuvent donc inhiber ces protéases *in vivo*.

Par son action inhibitrice 25 fois plus puissante sur les protéases à cystéine telles que la calpaïne et la cathepsine B par rapport à celle sur le protéasome, le peptide ALLN (Ac-Leu-Leu-NLe-al) **6**, utilisé comme inhibiteur de protéasome ($IC_{50} = 2,1 \mu M$ sur CT-L), a d'abord été décrit comme inhibiteur de la calpaïne I.⁴⁷ Plusieurs autres peptides aldéhydes ont été synthétisés.^{48,49} Par exemple MG132 **7**⁵⁰ (Z-Leu-Leu-Leu-al, $IC_{50} = 0,075, 0,67$ et $0,45 \mu M$ sur les sites CT-L, PA et T-L respectivement) en plus d'être plus puissant que ALLN pour inhiber le protéasome, est aussi sélectif au protéasome par rapport à la calpaïne et à la cathepsine B.⁵¹ Cette différence de sélectivité est due au remplacement de Nle par la Leu qui occupe la poche hydrophobe S1 ce qui stabilise l'interaction ligand-protéasome (figure 11, A)). Récemment, des dérivés α -cétoaldéhydiques ont été décrits.¹² Par exemple, le composé **8** a un K_i de l'ordre du nanomolaire sur le site chymotrypsine. Le mécanisme de liaison de ces dérivés a été élucidé par l'équipe du Pr Groll qui a co-cristallisé le dérivé **8** dans le site CT-L du protéasome de levure (figure 11, B)).¹²

A)



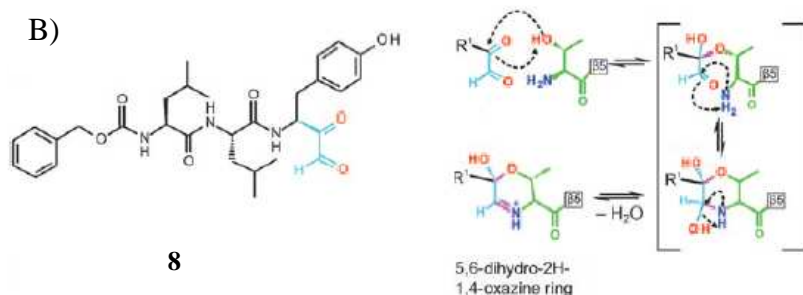
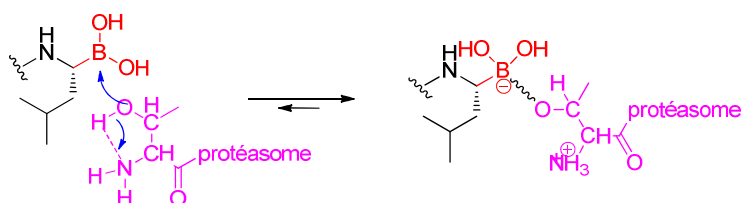


Figure 11 : A) exemple de peptides aldéhydes, B) structure et mécanisme d'action d'un α -cétoaldéhyde ;

Les peptides boronates :

Le Bortezomib ou Velcade[®] **9** est le premier inhibiteur de protéasome approuvé par la FDA (Food and Drug Administration USA) pour le traitement de myélome multiple en 2003 et du lymphome du manteau en 2006 (figure 12a).^{36,37} Depuis cette approbation, la famille des peptides boronates est devenue la plus célèbre des inhibiteurs du protéasome, ce qui a conduit au développement de plusieurs dérivés du Bortezomib.^{1, 5, 52, 53, 54} En effet, les peptides boronates sont plus actifs et plus sélectifs que leurs analogues aldéhydes et n'ont pas d'effet sur les autres protéases à cystéine (Calpaïne et Cathepsine).^{1,5} L'étude cristallographique du complexe Bortezomib/protéasome de levure a montré que le Bortezomib inhibe le protéasome par formation de liaison covalente avec l'hydroxyle de la thréonine 1 pour former un adduit tétraédrique quasi irréversible (figure 12a).¹ Tandis que la partie peptidique fait des liaisons hydrogènes avec les résidus Thr21, Gly47, Ala49, Ala50 et Asp114 du site actif tout en adoptant une structure en feuillet β (figure 12c).

a)



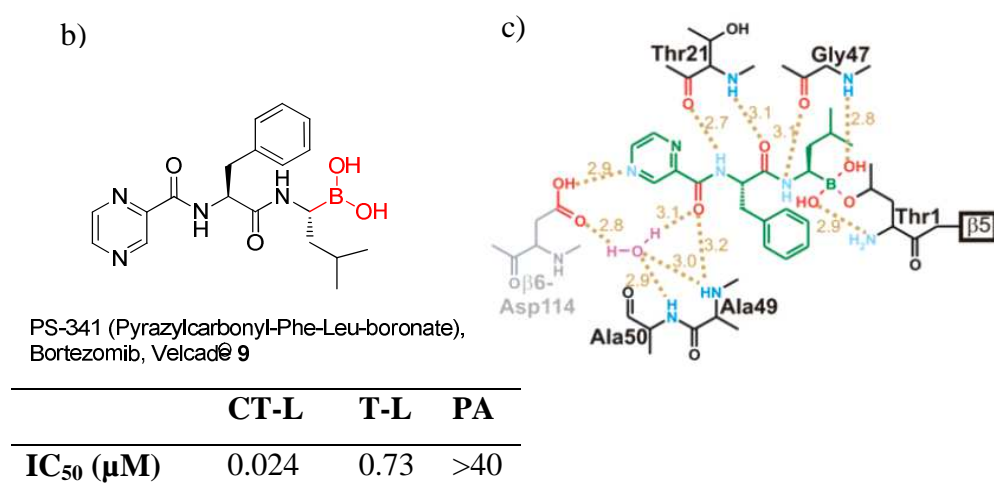
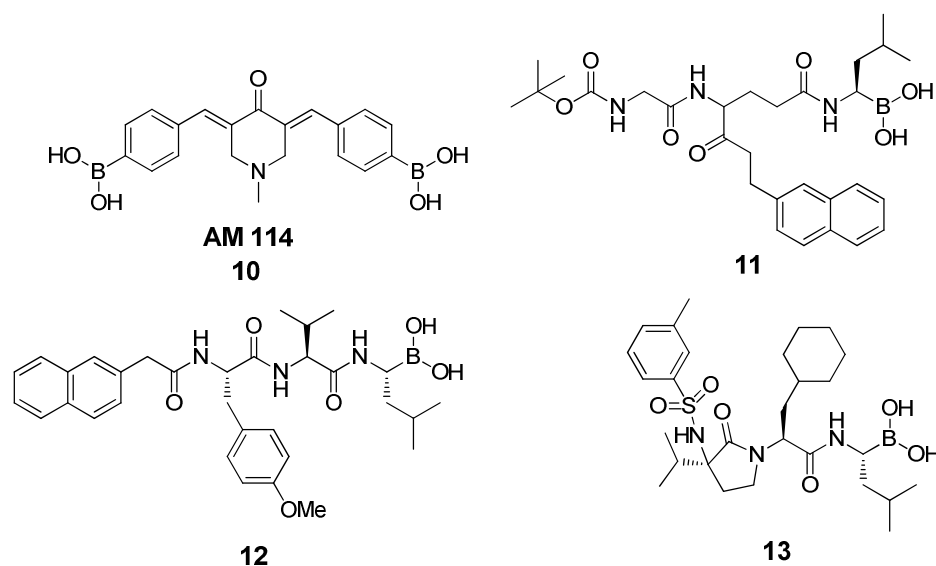


Figure 12 : a) mécanisme d'action du bortezomib, b) IC₅₀ du bortezomib dans les 3 sites catalytiques, c) interaction du Bortezomib dans le site chymotrypsine de la levure (obtenu par diffraction aux rayons X du complexe Bortezomib/site CT-L du protéasome de levure).¹

Néanmoins le manque de sélectivité du Bortezomib vis-à-vis d'autres nucléophiles entraîne certains effets secondaires tels que des nausées, des diarrhées et la neuropathie périphérique. De plus, son administration se fait uniquement par injection intraveineuse. Pour palier à ces problèmes, la compagnie Cephalon a récemment développé une nouvelle molécule plus puissante et plus sélective que le Bortezomib : c'est le CEP-18770 **2** qui est en phase 1 d'étude clinique^{55,56} pour les tumeurs solides et en phase I et II pour le traitement du myélome en rechute.³⁹ Plusieurs études de relation-structure-activité ont été reportées conduisant à de nouveaux dérivés d'acides boroniques inhibiteurs du protéasome 20S. On peut par exemple citer les dérivés chalcones boroniques (AM 114) **10**⁵⁷, les analogues boroniques de la belactosine **11**⁵⁸, les dérivés de tyropeptine **12**⁵⁹ et les boroniques de lactames **13**⁶⁰ (figure 13).



Composé	IC ₅₀ (μM)		
	CT-L	T-L	PA
AM114	1	-	-
11	0,28	>10	8,54
12	6,3	5,6	>40
13	0,008	-	-

Figure 13 : exemples de dérivés d'acide boronique et leur IC₅₀.

Les époxycétones :

Cette famille a été développée après la découverte de l'époxomicine **14** (IC₅₀= 2,7 nM sur CT-L) et de l'éponémicine **15**, deux composés naturels issus de *Streptomyces hygroscopicus*. En effet, ces composés ont montré une activité antitumorale *in vivo* par inhibition irréversible du protéasome.^{61, 62, 63} La co-cristallisation de l'époxomicine dans le protéasome de levure a permis de déterminer le mécanisme d'action de ces composés qui est le même pour tous les époxycétones.¹² Le groupement hydroxyle de la thréonine 1 du protéasome attaque la fonction cétone. L'amine NH₂ de la thréonine 1 attaque ensuite l'époxyde pour former un adduit de type morpholino (figure 14).^{1, 5, 64}

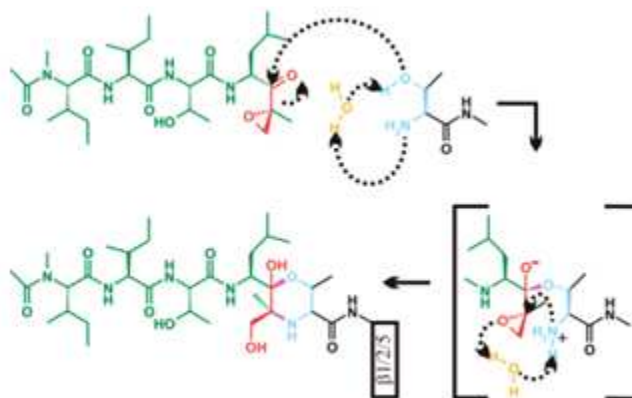
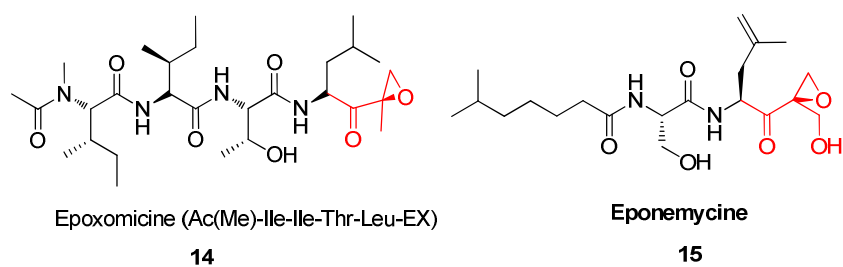


Figure 14 : structure de l'époxomicine et l'éponémicine et leur mécanisme d'action

La pharmacomodulation des différentes parties de l'époxomicine a abouti à plusieurs dérivés dont le carfilzomib **4** (IC_{50} = 6, 2400 et 3600 nM sur CT-L, PA et T-L respectivement) et le composé PR-047 **5** en phase clinique II et I respectivement (figure 15), seconde génération d'inhibiteurs du protéasome développée par la compagnie Proteolix.^{65, 66} Ce térapeptide est actuellement en phase clinique I et II dans le traitement du myélome multiple, le lymphome non-Hodgkinien et les tumeurs solides.⁶⁷ Son analogue YU-101 **16** a la même activité que le Bortezomib mais est aussi plus sélectif du site chymotrypsine par rapport aux autres sites (IC_{50} = 6 nM, 3600 nM, 2400 nM pour CT-L, T-L, et PA respectivement sur le protéasome 20S humain). De plus, il est mieux toléré *in vivo* car inhibe spécifiquement le protéasome, les autres protéases ne sont touchées qu'à partir d'une concentration de 10 μ M.⁶⁷

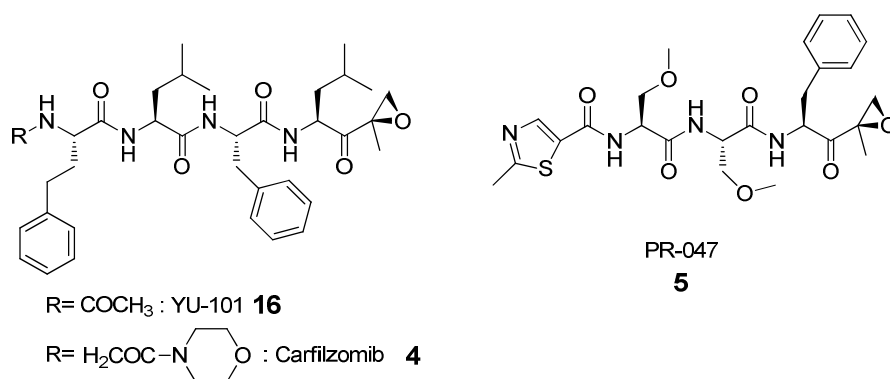


Figure 15 : exemples de dérivés d'époxycétones

Les peptides vinyles:

C'est une autre classe d'inhibiteurs du protéasome possédant un accepteur de Michael à l'extrémité C-terminale. Ils se lient donc au protéasome par attaque de l'hydroxyle de la thréonine 1 sur l'accepteur de Michael ce qui conduit à une inhibition irréversible du protéasome. Trois classes de composés constituent cette famille : les vinyles sulfones, les vinyles esters et les syrbactines.

Les peptides vinyles sulfones :

Les peptides vinyles sulfones sont à l'origine des inhibiteurs des protéases à cystéine, mais ont aussi montré des propriétés inhibitrices irréversibles du protéasome.^{68, 69} Plus de 800 molécules de structure tripeptidique et térapeptidique **17** et **18** ont été préparées, généralement par chimie combinatoire dans le but d'optimiser l'inhibition pour un des trois sites actifs du protéasome (figure 16).^{69, 70, 71, 72} Par exemple **18a** inhibe uniquement le site T-L tandis que **18b** inhibe les trois sites catalytiques.⁷⁰ Les structures cristallographiques de **18a** et **18b** dans le protéasome de levure ont confirmé la formation d'une liaison covalente entre ces composés et la fonction hydroxyle de la thréonine 1 (figure 17).¹³ Leur sélectivité vis-à-vis des différents sites actifs du protéasome est due à l'occupation de la poche S3 par le résidu R4 dans les trois sites catalytiques.¹³ Le principal avantage de ces molécules est que l'on peut fixer des sondes radioactives ou fluorescentes sur leur extrémité N-terminale.^{71, 73, 74} Et comme ils forment une liaison covalente stable avec le protéasome on peut donc les utiliser pour un marquage et une visualisation ciblée des trois sites catalytiques. D'ailleurs certains peptides vinyles sulfones ont été marqués par des groupements fluorescents et utilisés en

clinique pour déterminer la fonction du protéasome et sa dynamique dans les cellules vivantes.⁷⁵

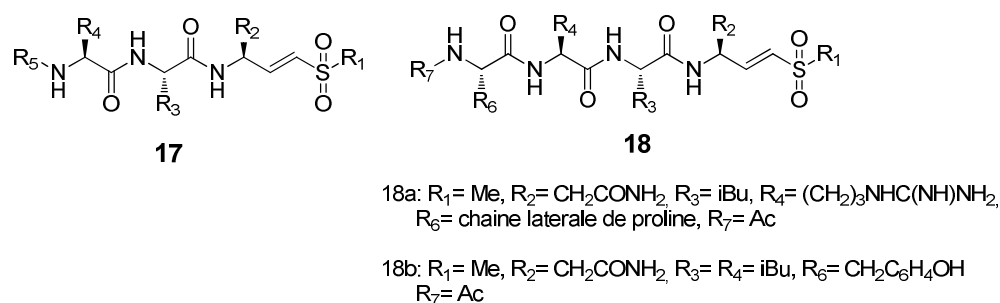


Figure 16 : structures de peptides vinyles sulfones

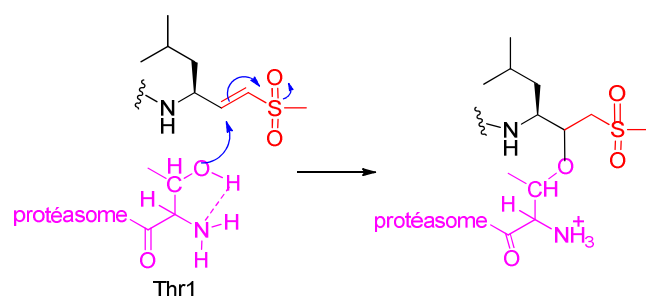


Figure 17 : mécanisme d'inhibition du protéasome par les peptides vinyles sulfones.

Les peptides vinyles esters:

L'unité vinyle ester qui est un excellent accepteur de Michael a été introduite dans la partie C-terminale des peptides. Il en a résulté plusieurs molécules avec différentes structures dont l'activité inhibitrice a été testée sur le protéasome 20S (figure 18).^{76, 77} Il n'y a pas de structure cristallographique de ces composés liés au protéasome. En revanche, l'inhibition irréversible observée lors des tests enzymatiques laisse penser que ces composés se lient au protéasome par attaque de l'hydroxyle de la thréonine 1 sur l'accepteur de Michael.⁷⁶ Les composés **20a** et **20b** inhibent plus particulièrement le site T-L, le site CT-L est peu inhibé et le site PA n'est pas du tout affecté. La modélisation moléculaire a montré que ces molécules peuvent adopter un feuillet β en se liant au site actif.⁷⁷

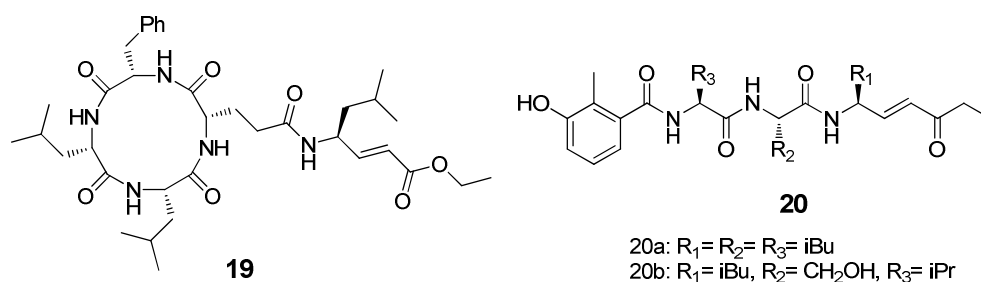
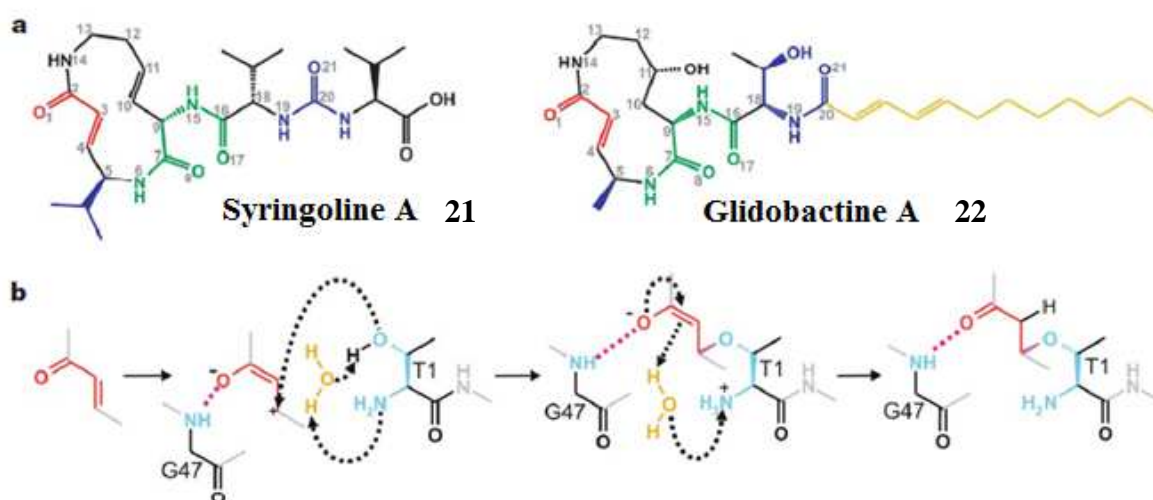


Figure 18 : structure de dérivés de peptides vinyles esters

Les Syrbactines (amides α,β -insaturés):

Cette famille est composée de molécules contenant un macrocycle β -lactame à 12 carbones avec fonction amide α,β -insaturée. Ce macrocycle est lié à une chaîne latérale pseudopeptidique.^{14, 78} Les syringolines^{79, 80} et les glidobactines sont des produits naturels de cette classe. L'étude cristallographique de la syringoline A **21** complexée au protéasome de la levure montre la formation d'une liaison covalente avec la thréonine 1 du site catalytique ce qui forme un adduit irréversible (figure 19b).¹⁴ La syringoline A est aussi active *in vivo* et a un effet antiprolifératif et pro-apoptotique sur les cellules cancéreuses de l'ovaire et les neuroblastomes. D'autres analogues de la syringoline A ont été synthétisés et ont aussi montré une bonne activité inhibitrice du protéasome mais reste tout de même moins actifs que la syringoline A.⁸¹

La glidobactine A **22** isolée des bactéries *Polyangium brachysporum* a une activité cytotoxique sur des lignées cellulaires cancéreuses et prolonge la vie de souris atteintes de leucémie P388.⁸² La co-cristallisation de la glidobactine et du protéasome de levure a montré qu'elle agit de la même manière que la syringoline A (figure 19).¹⁴



Composés	Ki (μM)		
	CT-L	T-L	PA
Syringoline A	0,8	6,7	nd
Glidobactine A	0,05	2,0	Ni à 20 μM

Figure 19 : a) structure de la syringoline A et de la glidobactine A, b) mécanisme d'action des syrbactines, c) constante d'affinité de syringoline A et de la glidobactine A sur le protéasome d'eucaryote.

Les dérivés de β -lactones :

La lactacystine et ses dérivés:

Les γ -lactame- β -lactones sont une autre importante famille d'inhibiteurs du protéasome. Le premier inhibiteur naturel non peptidique du protéasome est la (+)-lactacystine **23** isolée de *Streptomyces lactacystinaeus*. Ce composé agit comme prodrogue *in vivo*, où il régénère spontanément la molécule bioactive: la clasto-lactacystine- β -lactone connu sous le nom de Omuralide **24** avec élimination de N-acétyl-cystéine (figure 20A)).⁸³ L'analyse de la structure des cristaux du complexe Omuralide/ protéasome de levure prône que l'ouverture nucléophile de l'unité β -lactone est cruciale pour l'inhibition, ceci conduisant à la formation d'une liaison covalente avec la thréonine 1 (figure 20B)).^{15, 1} En occupant la poche hydrophobe S1, le groupement diméthyle de l'Omuralide joue un rôle très important dans la sélectivité vis-à-vis des autres protéases à cystéines(figure 20C)). Plusieurs synthèses et évaluations biologiques de l'Omuralide et de ses analogues ont été effectuées.^{84, 85, 86} Les relations structure-activité

ont montré que le cycle β -lactone est essentiel pour avoir une activité inhibitrice du protéasome et que le remplacement du méthyle en C7 par une chaîne aliphatique plus longue augmentait l'activité.

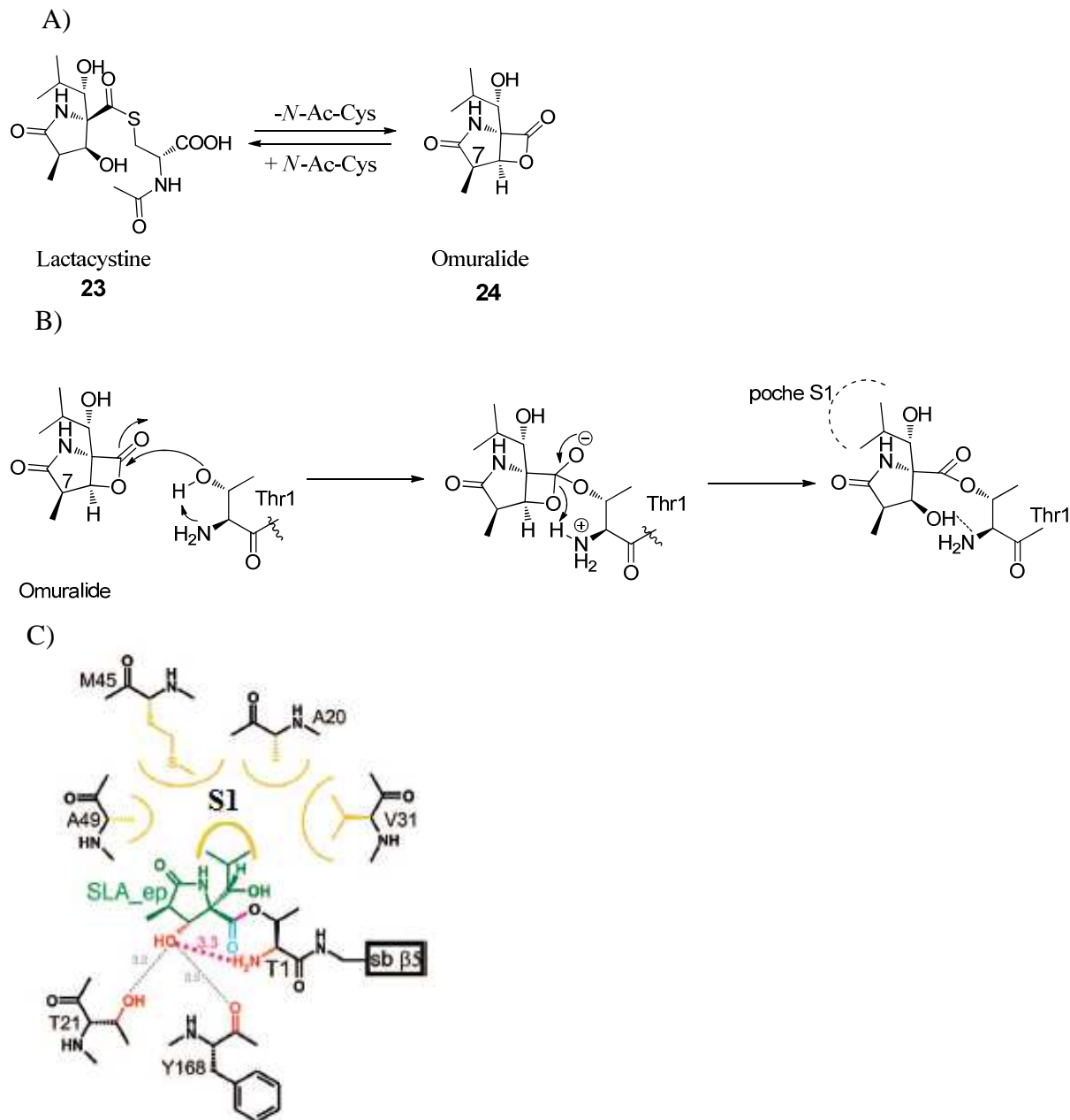
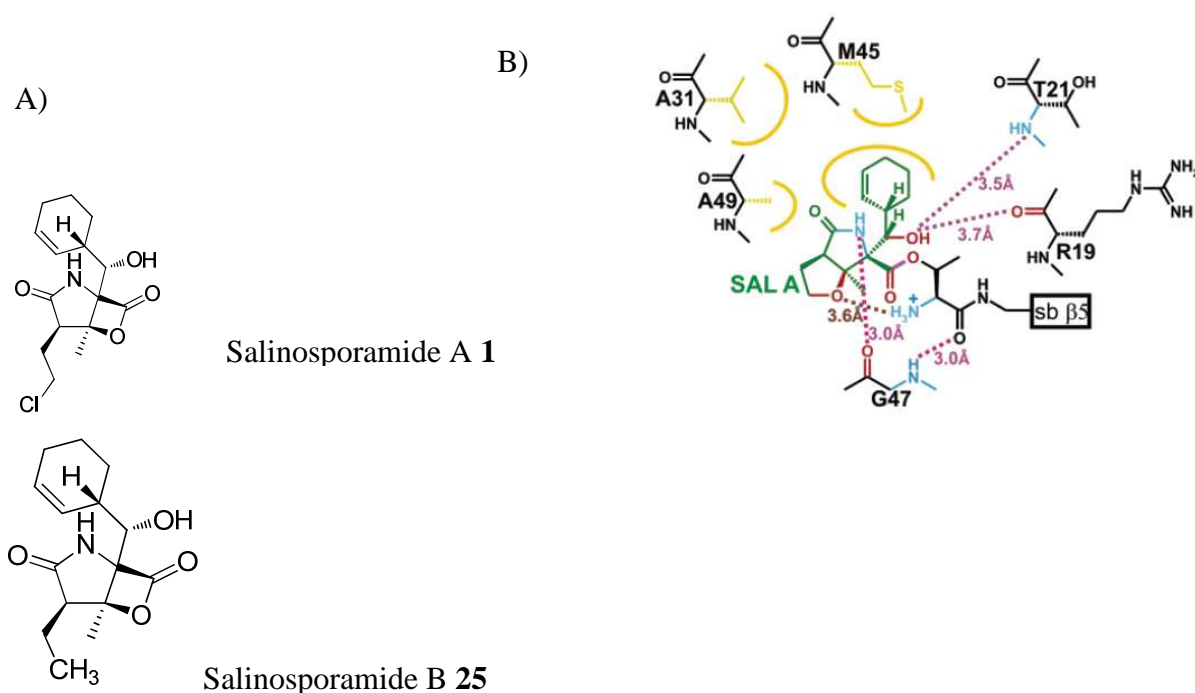


Figure 20 : A) structure de la lactacystine et de l'Omuralide, B) mécanisme d'inhibition de l'Omuralide, C) structure du complexe omeraldine/protéasome dans le site chymotrypsine de la levure.

La Salinosporamide et ses dérivés :

Un autre composé très prometteur de la famille des γ -lactame- β -lactones est la Salinosporamide A **1** développée par la compagnie Nereus (figure 21A)). Elle est isolée d'un actinomycète marin : *Salinospora tropica* et est actuellement en essai clinique de phase 1 pour le traitement du myélome multiple et d'autres cancers.⁸⁷ Elle est administrée par voie intraveineuse aux patients résistants au bortezomib.⁸⁷ La Salinosporamide A est 35 fois plus efficace que l'Omuralide et inhibe de façon irréversible les 3 sites catalytiques du protéasome de lapin ($IC_{50} = 2,6, 21$ et 430 nM pour CT-L, T-L et PA).⁸⁸ Elle est aussi très sélective du protéasome, jusqu'à 1000 fois moins efficace sur les autres protéases tels que la cathepsine A et B, la trypsine et la chymotrypsine.⁸⁹ La cristallisation de la Salinosporamide dans le protéasome de levure a permis de connaître son mode d'action (figure 21B)).^{15, 16} Comme avec l'Omuralide la thréonine 1 attaque d'abord la fonction β -lactone conduisant à la formation d'un adduit ester, ensuite le départ du chlore forme un éther cyclique qui est le produit final (figure 21C)). La compagnie Neureus a aussi effectué des relations structure-activité aboutissant à plusieurs analogues tel que Salinosporamide B.^{90, 88, 91, 92}



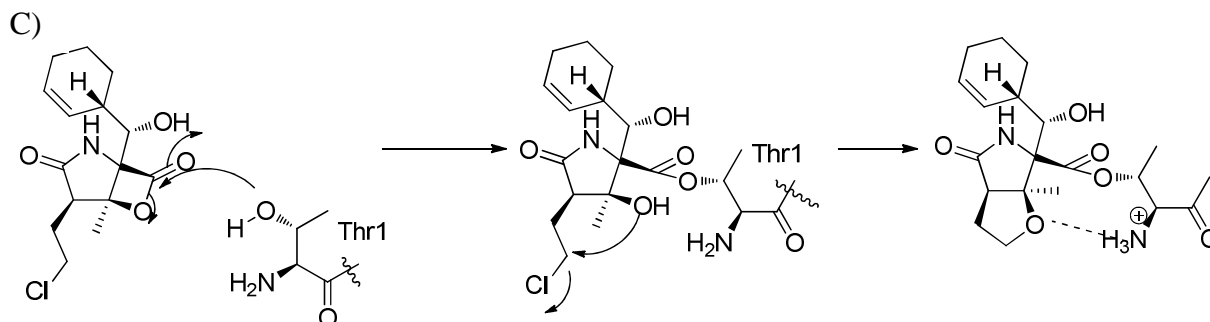


Figure 21 : A) structure de la Salinosporamide A et B, B) structure du complexe Salinosporamide A /protéasome dans le site chymotrypsine de la levure, C) mécanisme d'inhibition du protéasome par la Salinosporamide A.

La Belactosine et ses dérivés :

Les Belactosines A et C sont isolées de *Streptomyces* et possèdent une activité antitumorale intéressante (figure 22). En effet, elles inhibent la croissance cellulaire dans le cancer humain HeLa S3 avec une IC_{50} de 50 et 200 μM respectivement pour la belactosine A et B.⁹³ *In vitro* leur activité sur le protéasome de lapin est comparable à celle de la lactacystine. Des modifications structurales de ces produits naturels tels que l'acétylation de l'amine libre ou l'estérification de l'acide carboxylique augmentent leur efficacité.⁹³

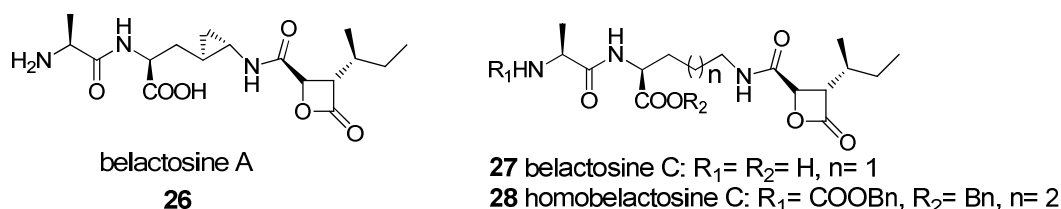


Figure 22 : structures des dérivés de la belactosine

Autres inhibiteurs covalents du protéasome:

D'autres inhibiteurs covalents moins connus du protéasome sont les polyphénols ((-)-epigallocatechin-3-gallate ou EGCG) **29** et les terpénoïdes (le Celastrol) **30** (figures 23). En effet, Dou *et al.* ont montré que les polyphénols contenant une liaison ester inhibent sélectivement le protéasome 20S des procaryotes ($IC_{50} = 86\text{-}194$ nM sur le site CT-L) et le protéasome 26S dans les cellules vivantes dans la tumeur de Jurkat (1-10 μM).⁹⁴ Des études de modélisations moléculaires ont montré que l'inhibition irréversible du site CT-L du

protéasome par l'EGCG implique la formation de liaison acyle entre l'hydroxyle de la Thréonine 1 et la fonction ester de l'EGCG.⁹⁵

Plusieurs Ginsénosides isolés de *Panax ginseng* utilisés dans la médecine traditionnelle, ont été testés pour voir leur capacité à inhiber le protéasome. Tous ces stéroïdes inhibent sélectivement le site CT-L à l'exemple du Celastrol qui a une IC_{50} de 2.5 μ M sur le site CT-L du protéasome du lapin.^{96,97}

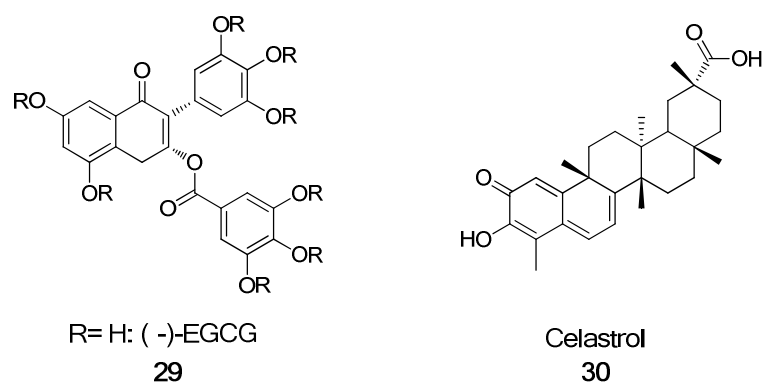


Figure 23 : exemples de polyphénol et de terpénoïde

I.2.b. Les inhibiteurs non-covalents:

Bien que les groupements réactifs des inhibiteurs covalents du protéasome peuvent contribuer à une interaction efficace avec l'enzyme, ils peuvent aussi induire un manque de spécificité par rapport aux autres nucléophiles cellulaires. De plus leur extrême réactivité et leur instabilité limitent leur utilisation *in vivo*.^{72,98,99}

Les inhibiteurs non covalents du protéasome ont été peu étudiés mais présentent un grand intérêt thérapeutique et pourraient induire moins d'effets secondaires que les inhibiteurs covalents.⁴² En effet, ces composés contiennent une structure généralement peptidique qui permet la reconnaissance avec le protéasome mais sont dépourvus de groupements réactifs. Ces inhibiteurs se lient au protéasome par le biais de liaisons faibles (hydrogène, hydrophobe, électrostatique et/ou Van Der Waals).

TMC-95 et ses dérivés :

TMC-95A, B, C et D sont des molécules cycliques naturelles issues du bouillon de fermentation de l'*Aspilospora montagnei* Sacc ayant une activité inhibitrice du protéasome (figure 24).¹⁰⁰ Le stéréoisomère TMC-95A est le plus abondant et aussi le plus actif sur le protéasome humain avec une IC₅₀ de l'ordre du nanomolaire sur CT-L (IC₅₀= 5,4 nM pour CT-L, 200 nM pour T-L et enfin 60 nM pour PA). TMC-95A inhibe l'activité du site CT-L du protéasome d'autres espèces telles que la bovine et la levure avec presque la même efficacité.^{101,102} L'inhibition par le TMC-95A est très sélectif car avec une concentration de 30 μM, la calpaïne, la cathepsine L et la trypsine ne sont pas touchées. Cette molécule est aussi active sur les cellules de leucémie promyélytique (IC₅₀= 9,8 μM) et de cancer de colon humain (IC₅₀= 4,4 μM).

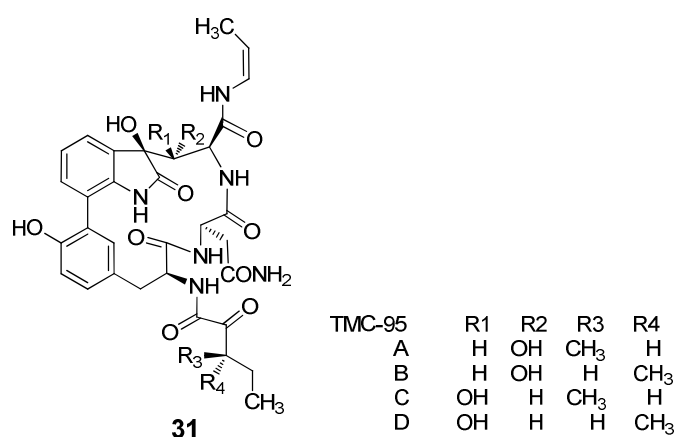


Figure 24 : structure chimique de TMC-95A, B, C, D

Le TMC-95A a été cristallisé dans les trois sites catalytiques du protéasome. L'analyse de ces complexes montre que TMC-95 se lie au niveau de ces sous unités par un réseau serré de liaisons hydrogènes sans aucune modification chimique de la thréonine (figure 25).¹ Ces interactions non covalentes conduisent à la formation d'un feuillet β antiparallèle entre le TMC-95A et les acides aminés clés (Thr1, Thr21, Gly23, Ala49, Asp114) du site catalytique. La chaîne latérale de l'asparagine occupe la poche S3 tandis que la poche S1 est occupée par un motif (Z)-propényle.

L'analyse de cette structure cristallographique a permis la conception et la synthèse de 39 molécules qui contiennent dans leurs structures les éléments importants du TMC-95A nécessaires pour la liaison dans le site catalytique.^{103,104,105}

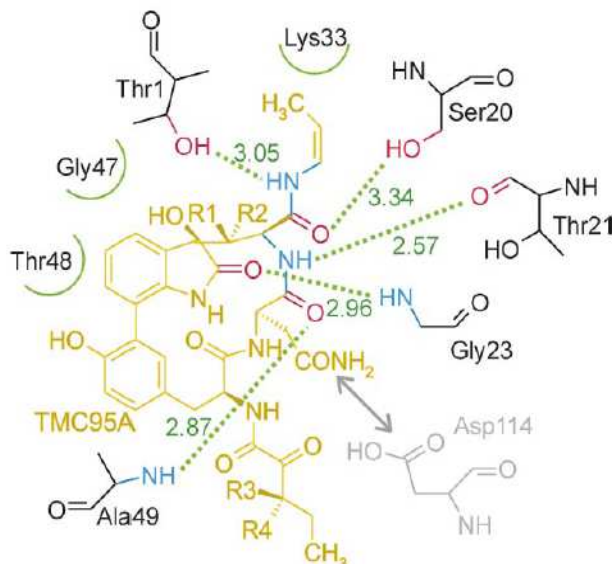


Figure 25 : structure schématique du réseau de liaison hydrogène entre la TMC-95A et le site actif T-L du protéasome de la levure d'après Groll *et al.*¹

Au vu de l'activité de TMC-95A, il n'est pas étonnant que beaucoup d'efforts aient été fournis pour développer des analogues synthétiques. C'est ainsi que plus de 45 analogues linéaires ont été développés et synthétisés.³³ Parmi eux, les peptides linéaires **32** et **33** actifs sélectifs sur un, deux ou trois sites actifs du protéasome avec une constante d'inhibition K_i comprise entre 0,32 et 84 μM (figure 26).¹⁰⁶ Ces dérivés linéaires de la TMC-95 ont une activité inhibitrice significative du protéasome *in vitro* et sur cellules et sont métaboliquement stables.¹⁰⁶ Un analogue du composé **32** a été cristallisé dans le site actif du protéasome et présente une liaison au protéasome similaire au TMC-95A.¹⁷

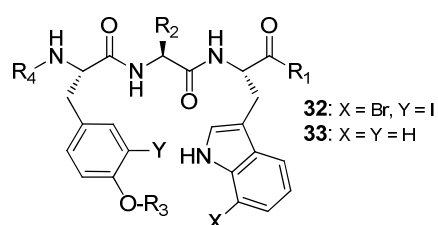


Figure 26 : structure de dérivés linéaires de TMC-95A

Les dérivés d'Aminobenzylstatine et analogues:

Le screening à haut débit effectué par le laboratoire Novartis a montré que le dérivé synthétique de la 2-aminobenzylstatine **34** initialement utilisé pour inhiber la protéase de VIH, présente une activité inhibitrice du protéasome (figure 27).^{107,108,109,110} Cet inhibiteur non covalent du protéasome est beaucoup plus actif sur le site CT-L du protéasome 20S de l'humain ($IC_{50} = 0,9 \mu M$) que sur les sites T-L et PA ($IC_{50} > 20 \mu M$). Cette molécule a été optimisée en utilisant la modélisation moléculaire pour donner le composé **36**. Ainsi le motif statine a été remplacé par un résidu 3,4,5-triméthoxyphénylalanine qui interagit avec la poche S3. La partie N-terminale occupée par le groupement phénoxyphényle occupe les poches accessoires AS1 et AS2. Ce composé est un puissant inhibiteur du site CT-L du protéasome 20S humain avec une IC_{50} de 15 nM. Il bloque aussi l'activité du protéasome ($IC_{50} = 20$ nM) et la prolifération des cellules MDA-MB ($IC_{50} = 60$ nM).¹⁰⁷

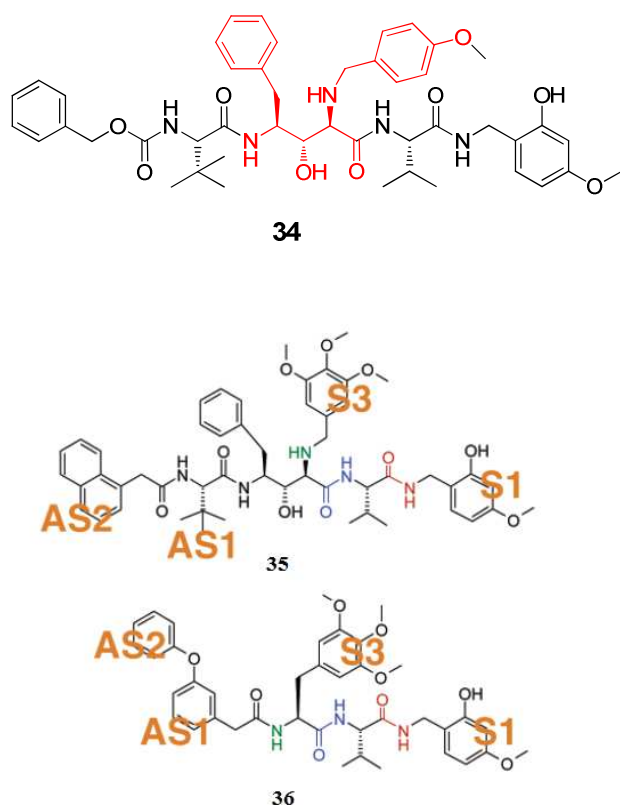


Figure 27 : structure des dérivés d'aminobenzylstatines (en couleur le motif aminobenzylstatine).

Les peptides et pseudopeptides:

Dans cette classe de peptides et pseudopeptides inhibant l'activité du protéasome, nous pouvons citer le peptide naturel Argyrine A (figure 28). C'est un octapeptide cyclique isolé de la mycobactérie *Archangium gephyra* qui inhibe le protéasome avec la même efficacité que le Bortezomib **9**.¹¹¹ A ce jour, son mécanisme d'action n'a pas encore été élucidé.

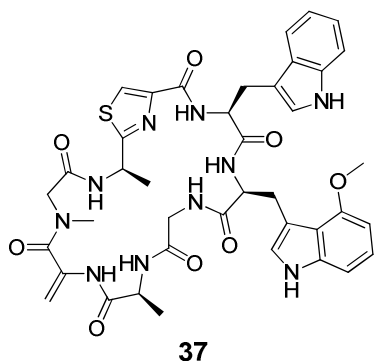


Figure 28 : structure de l'Argyrine

Cette classe est aussi constituée de lipopeptides qui sont obtenus par ajout d'une chaîne aliphatique sur l'extrémité N-terminale d'un peptide ayant montré une activité inhibitrice du protéasome.¹¹² Le groupement lipophile peut avoir deux fonctions: améliorer l'activité inhibitrice et permettre le passage de la membrane cellulaire. Ainsi les lipopeptides **38** et **39** inhibent les sites CT-L et PA du protéasome de levure avec une IC₅₀ de l'ordre du micromolaire (figure 29).¹¹² La structure de ces molécules peut être modifiée pour inhiber sélectivement un ou plusieurs sites actifs du protéasome.

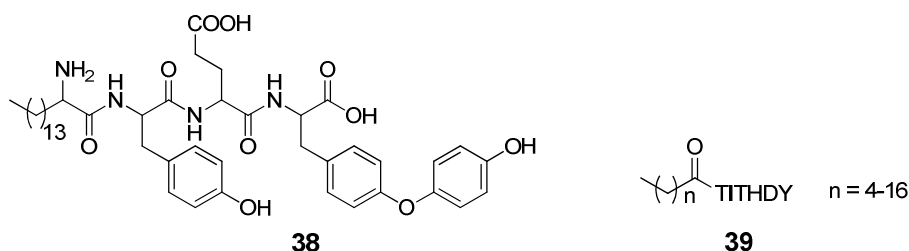
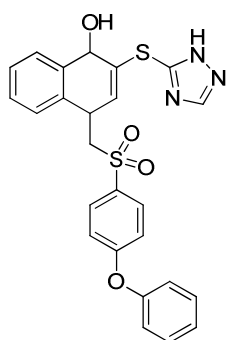


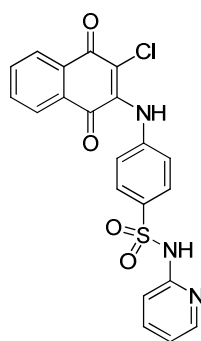
Figure 29 : structure des lipopeptides inhibiteurs du protéasome

Les inhibiteurs non peptidiques:

La majorité des molécules de cette classe ont été identifiées par un criblage de larges bibliothèques de molécules chimiques.³ On peut par exemple citer les hydronaphtoquinones telles que **40**¹¹³ et les naphtoquinones telles que PI-083 **41**^{114,115} (figure 30). Ces molécules inhibent sélectivement le protéasome des cellules cancéreuses tout en ciblant les trois sites catalytiques. En revanche les cellules normales ne sont pas touchées.



41



PI-083 **40**

Figure 30 : structures des hydronaphtoquinones et des naphtoquinones

Les hydrouurées, une autre classe d'inhibiteurs ont été récemment identifiées par criblage. Les relations structure-activités effectuées sur ces molécules ont aboutis au composé **42** ayant une constante d'inhibition de l'ordre de 30 nM pour le site CT-L du protéasome. L'étude cristallographique du composé **42** dans le site CT-L du protéasome de levure a montré que les poches S1 et S3 sont occupées par les groupements encombrants tels que les noyaux benzyl et d'adamantane (figure 31). Une absence de liaison covalente entre la Thr1 et le composé **42** est constatée. Enfin ce composé contracte des liaisons hydrogènes avec la Gly47, Thr21 et la Ser118 (figure 31).¹¹⁶

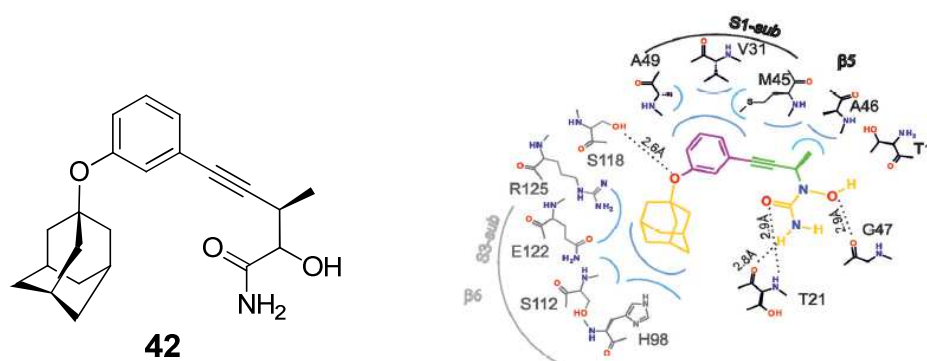


Figure 31 : structure de l'inhibiteur hydroxyurée et sa structure cristallographique dans le site CT-L du protéasome de levure d'après Gallastegui *et al.*¹¹⁶

II. Intérêt du fluor en chimie médicinale:

II.1. Généralités sur le fluor:

II.1.a. Propriétés physico-chimiques du fluor:

Le fluor est le treizième élément par ordre d'abondance dans l'écorce terrestre (0,028%), et est le premier halogène. L'atome de fluor est très particulier car c'est le plus petit élément de la classification périodique après l'hydrogène. Son rayon de Van der Waals est proche de ceux de l'oxygène et de l'azote et c'est l'élément le plus électronégatif selon l'échelle de Pauling (tableau 1) ¹¹⁷.

	H	F	O	N	C	Cl
R _{vdw} (Å)	1,20	1,47	1,52	1,55	1,70	1,75
χ _p	2,20	3,98	3,44	3,04	2,55	3,16

Tableau 1 : rayon de Van der Waals (Å) et électronégativité selon Pauling (χ_p)

Un excellent recouvrement de ses orbitales 2s ou 2p avec les orbitales correspondantes du carbone entraîne une forte polarisation de la liaison carbone-fluor. A ceci s'ajoute la faible polarisabilité de l'atome du fluor pour donner à la liaison C-F l'énergie de dissociation la plus forte que le carbone puisse faire avec un autre élément (tableau 2)¹.

	Longueur de liaison (Å)	Energie de dissociation (Kcal/mol)
CH ₃ -H	1,09	104,3
CH ₃ -F	1,39	108,3
CH ₃ -Cl	1,77	82,9
CH ₃ -Br		69,6

Tableau 2 : comparaison des propriétés physiques de certaines liaisons C-X

Cette force de liaison augmente avec le nombre d'atomes de fluor lié au carbone (tableau 3).

Composé	CH ₃ F	CH ₂ F ₂	CHF ₃	CF ₄
Energie de dissociation (Kcal/mol)	108,3	119,5	127,5	130,5

Tableau 3 : énergie de dissociation de la liaison C-F

II.1.b. Effet du fluor sur la lipophilie :

La notion de lipophilie est très importante dans la conception de médicaments. En effet, il est nécessaire de respecter une bonne balance hydrophile/lipophile dans une molécule pour permettre son absorption, son transport dans les cellules et les tissus et enfin son interaction avec la molécule cible. S'il a été démontré que la fluoration augmente la lipophilie, ceci n'est vrai que pour les composés aromatiques et plus généralement lorsque les atomes de fluor se trouvent en α d'atomes ou de système possédant des électrons π (tableau 4).^{118, 119}

	Log <i>P</i> (octanol/eau)
C ₆ H ₅ -OH	1,48
C ₆ F ₅ -OH	3,23

Tableau 4 : comparaison de log *P* dans les systèmes π

Au contraire la présence de fluor dans une molécule aliphatique décroît la lipophilie mais augmente l'hydrophobie, au point que les molécules hautement fluorées ne sont solubles ni dans les solvants organiques, ni dans l'eau, formant ainsi une troisième phase (tableau 5).^{120, 121}. Cette augmentation de l'hydrophobie est particulièrement appréciée en chimie médicinale car elle stabilise les structures en feuillet β .^{122,123} Il serait donc intéressant d'introduire des groupements fluorés dans les peptidomimétiques qui ont une conformation bioactive en feuillet β .

Structures	Log <i>P</i>	Structures	Log <i>P</i>
CH ₃ CH ₂ OH	-0,32	CF ₃ CH ₂ OH	0,36
CH ₃ CH ₂ CH ₂ OH	0,34	CF ₃ CH ₂ CH ₂ OH	0,39
CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	0,88	CF ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	0,90
CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	1,40	CF ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	1,15

Tableau 5 : comparaison des valeurs log *P* (octanol/eau) des composés fluorés et non fluorés.

II.1.c. Effet du fluor sur l'acidité, basicité et liaison hydrogène:

Acidité, basicité :

Les groupements fluoroalkyles sont très électroattracteurs, par conséquent l'acidité des hydrogènes voisins est fortement augmentée. C'est le cas dans les acides carboxyliques, les alcools et les amides. De même, la fluoration diminue la basicité des amines (tableau 6).^{124, 125}

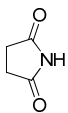
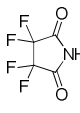
Acidité			
structure	pKa	Structure	pKa
CH ₃ COOH	4,76	CF ₃ COOH	0,5
CH ₃ CH ₂ OH	15,9	CF ₃ CH ₂ OH	12,4
	9,6		2,1
Succinimide		F ₄ -Succinimide	
Basicité			
structure	pKb	Structure	pKb
CH ₃ CH ₂ NH ₂	10,7	CF ₃ CH ₂ NH ₂	3,3
C ₆ H ₅ NH ₂	4,3	C ₆ F ₅ NH ₂	0,36

Tableau 6 : valeurs de pKa et pKb de composés fluorés et non fluorés.

Liaison hydrogène :

Les liaisons hydrogènes jouent un rôle très important dans les interactions entre un ligand et sa cible biologique.

En dépit de sa forte électronégativité et de ses paires d'électrons libres, le fluor est un faible accepteur de liaison hydrogène du fait de la faible polarisation de ses électrons π et σ .¹¹⁷ Si l'atome de fluor lui-même n'est pas directement impliqué dans des liaisons hydrogènes, son effet inductif joue un rôle très important sur l'aptitude des fonctions voisines à donner (HBD) ou à accepter (HBA) des liaisons hydrogènes (tableau 7).^{124, 125}

structure	HBA	HBD	Structure	HBA	HBD
CH ₃ COOH	0,42	0,550	CF ₃ COOH	-	0,951
CH ₃ CH ₂ OH	0,44	0,33	CF ₃ CH ₂ OH	0,18	0,57
Succinimide	-	0,493	F ₄ -Succinimide	-	0,86
CH ₃ CH ₂ NH ₂	0,70	-	CF ₃ CH ₂ NH ₂	0,36	-
C ₆ H ₅ NH ₂	4,3	-	C ₆ F ₅ NH ₂	-	-

Tableau 7 : valeurs des HBA et HBD de composés fluorés

II.1.d. Effet du fluor sur les propriétés biologiques

Les molécules fluorées sont présentes dans la plupart des grandes classes thérapeutiques (figure 32).^{117,126-130}

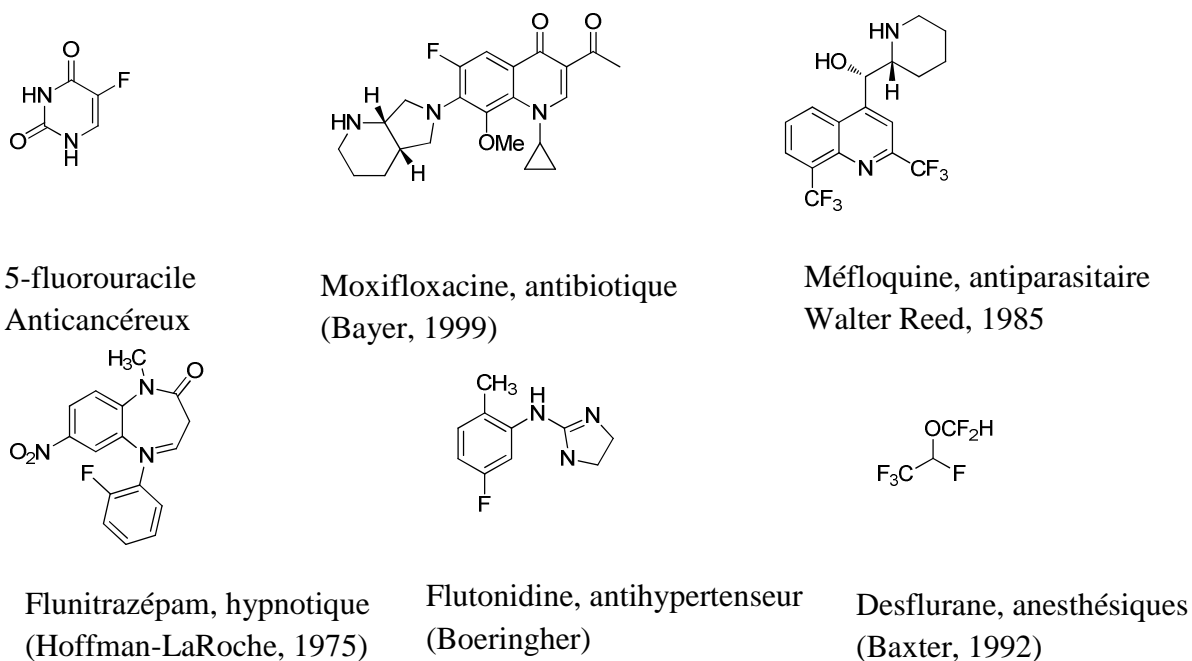


Figure 32 : quelques exemples de médicaments fluorés.

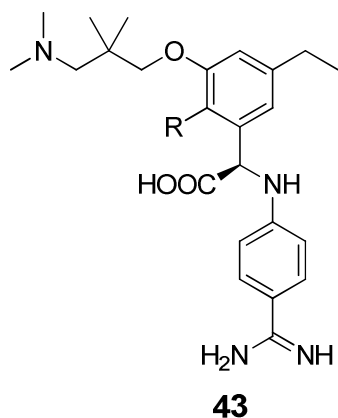
Si l'incorporation de fluor dans une molécule bioactive ne modifie pas toujours son affinité pour sa cible, elle peut engendrer une profonde modification au niveau de son activité biologique. Ainsi le processus d'absorption, de distribution, de reconnaissance et d'interaction avec la cible biologique, le métabolisme et l'élimination de cette molécule seront affectés.

Affinité :

L'affinité d'un substrat pour sa cible est due en premier lieu à sa complémentarité avec la macromolécule cible. La reconnaissance moléculaire est faite grâce à des interactions qui peuvent être des liaisons covalentes, des liaisons hydrogènes, des interactions dipolaires ou hydrophobes.

La présence de fluor peut augmenter la force de ces interactions ce qui pourrait améliorer l'affinité du substrat pour sa cible. Par exemple le fluor, grâce à son effet inductif, peut augmenter le caractère donneur de liaison hydrogène des hydrogènes voisins. De taille comparable à un groupement isopropyle, le groupement CF₃ peut mimer la chaîne latérale de nombreux acides aminés (valine, phénylalanine...) des ligands ou des inhibiteurs d'enzyme. Ainsi, le caractère hydrophobe de ce groupement lui permet d'occuper une poche hydrophobe destinée à accueillir les chaînes latérales d'acides aminés.¹¹⁸

Aussi le changement conformationnel induit par l'introduction de fluor peut augmenter son affinité pour sa cible.¹³¹ La forte électronégativité du fluor, et donc la forte polarité de la liaison C-F, favorise les interactions dipôle-dipôle dans le site de liaison. Cette capacité du fluor a été mise à profit dans les inhibiteurs de la thrombine. En effet, il a été démontré que le composé monofluoré a une affinité cinq fois plus forte pour la thrombine que son analogue non fluoré (figure 33).¹¹⁸



R	K _i - thrombine (μM)
H	1,6
F	0,26

Figure 33 : affinité d'inhibiteur fluoré de la thrombine

Absorption :

L'absorption est le parcours effectué par le médicament depuis son site d'administration jusqu'à sa cible biologique. En fonction du site d'administration le principe actif aura à traverser la barrière intestinale (voie orale), la barrière hémato-encéphalique (si la cible se

trouve dans le cerveau) ou la barrière cellulaire du microorganisme pathogène (si la cible est un agent infectieux pathogène). Ces étapes de transport sont dépendantes de facteurs comme la lipophilie, le pKa, la solubilité et le poids moléculaire. Comme on a pu le voir précédemment, la présence d'atome de fluor peut modifier certains facteurs comme l'augmentation de la lipophilie ou de l'hydrophobie d'une molécule. Elle peut aussi agir sur le pKa, soit en augmentant l'acidité des protons voisins ou en diminuant la basicité des amines. Ce dernier effet a été exploité pour diminuer la basicité de la fonction amidrazone d'inhibiteurs de la thrombine. Cela a conduit à une augmentation du pic de concentration maximale sanguine après administration par voie orale du composé chez le rat (figure 34).^{132,}

133

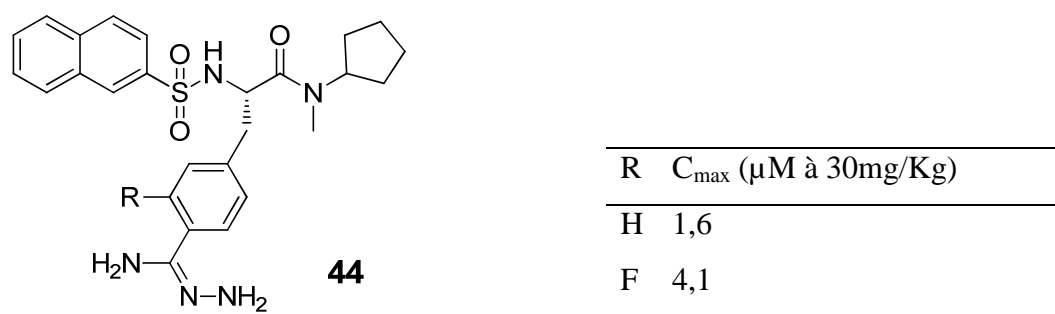
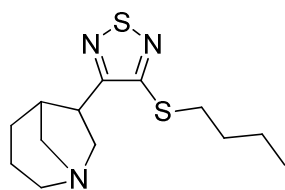


Figure 34 : influence du fluor sur le pKa et l'absorption

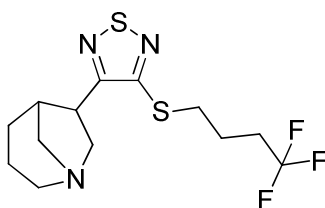
Métabolisme:

Métabolisme oxydatif :

Le ralentissement du métabolisme oxydatif est l'une des raisons les plus fréquentes d'introduction d'atomes de fluor dans une molécule. En effet, la force de liaison C-F (voir page 31) combinée à la formation difficile de liaison O-F explique cette résistance à l'oxydation.¹¹⁷ Les groupements fluoroalkylés tels que CF₂, CF₃, C₂F₅ ont une inertie quasi-totale à l'oxydation, ils peuvent donc remplacer un groupe alkyl pour éviter le métabolisme oxydatif. Un exemple significatif de cette stratégie est illustré sur la figure 35, où la protection de la chaîne latérale par le groupement CF₃ (composé 46) conduit à une augmentation de la concentration plasmatique du composé analgésique muscarinique.¹³⁴



(5*S*, 6*S*) exo **45**



(5*S*, 6*S*) exo (LY316108) **46**

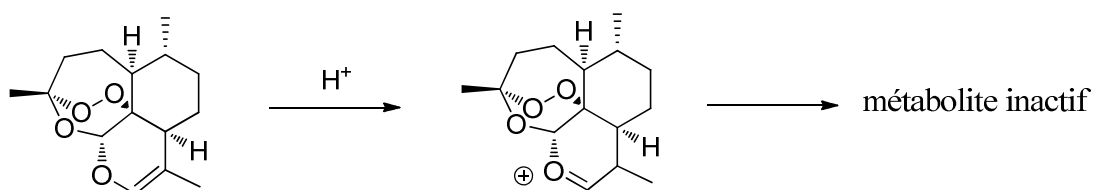
Produits	Ki (nm)	Concentration plasmatique (ng/Kg) après 1h
(5 <i>S</i> , 6 <i>S</i>) exo	0,45	21
(5 <i>S</i> , 6 <i>S</i>) exo(LY316108)	0,40	805

Figure 35 : augmentation de la concentration plasmatique par ralentissement du métabolisme

Métabolisme hydrolytique :

Le fluor est connu pour déstabiliser la formation de carbocation situé en β .¹¹⁷ Cette propriété du fluor est exploitée en vue de renforcer la résistance au métabolisme hydrolytique. Au laboratoire, cette propriété a été mise à profit dans la synthèse d'un analogue trifluométhylé de la désoxoartémisinine, un composé aux propriétés antipaludiques. La protonation de la double liaison de la désoxoartémisinine conduit à la formation d'oxonium qui évolue très rapidement vers un métabolite inactif. L'introduction de CF_3 sur la double liaison défavorise la formation de cet oxonium et empêche ainsi la formation de métabolite inactif. De plus, le dérivé fluoré est actif *in vivo*, ce qui n'est pas le cas de la désoxoartémisinine (figure 36).^{135,}

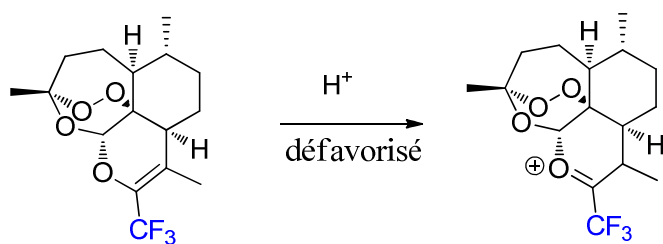
136



Désoxoartémisinine **47**

In vitro IC_{50} = 20nM

In vivo (test de Peters) 0% de survie



CF₃-désoxoartémisinine 48

In vitro IC₅₀ = 6,3 nM

In vivo (test de Peters) 90% de survie

Figure 36 : activités antimalariques *in vitro* et *in vivo* de glycols dérivés de l'artémisinine

II.1.e. Inhibiteurs d'enzymes par modification de la réactivité chimique :

L'introduction de fluor dans une molécule peut modifier sa réactivité chimique. Cette modification est liée à trois facteurs : la force de la liaison C-F, le caractère électro attracteur des substituants fluorés, et la perte d'ion possible dans les processus de β-élimination. Sur ces bases les différentes stratégies pour concevoir les inhibiteurs d'enzyme sont :

Les inhibiteurs analogues de substrats :

L'atome de fluor peut mimer stériquement un hydrogène et stéréo-électroniquement un hydroxyle. D'autres groupements fluorés sont utilisés pour mimer d'autres fonctions (figure 37). Ainsi les monofluoroalcènes sont des mimes non hydrolysables de la liaison peptidique.¹¹⁷

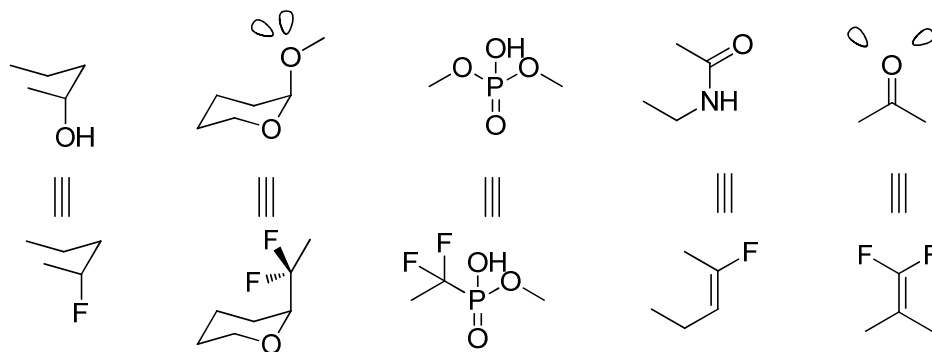


Figure 37 : mimes fluorés de groupes fonctionnels

Les inhibiteurs stabilisant ou déstabilisant les intermédiaires réactionnels :

Le caractère électronégatif du fluor peut être utilisé pour défavoriser le développement d'une charge positive. Dans un processus biologique impliquant un état de transition chargé positivement cette propriété peut être mise à profit. Les fluorocétones sont de très bons mimes de l'état de transition tétraédrique impliqué dans l'hydrolyse de la liaison peptidique. Le carbonyle de ces fluorocétones est très électrophile, ce qui facilite l'attaque de l'entité nucléophile du site actif de l'enzyme. L'intermédiaire tétraédrique formé avec l'enzyme est très stable, par conséquent l'équilibre ne peut pas être déplacé et l'enzyme se trouve ainsi inhibée. L'exemple d'une aspartyl protéase est montré sur la figure 38.¹³⁷

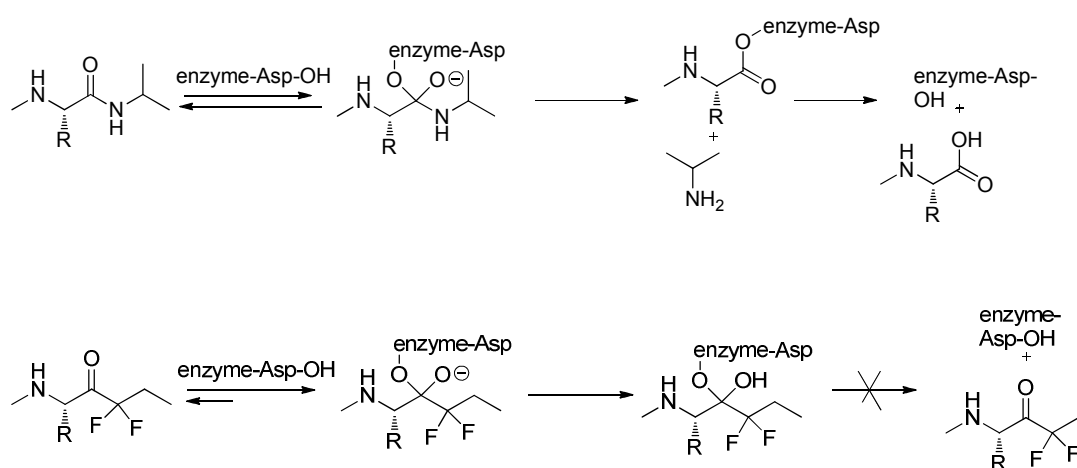


Figure 38 : inhibition d'une protéase à sérine par une α -amino trifluorométhylcétone

Inhibiteurs irréversibles : concept de substrat-suicide :

Cette inhibition est due à un départ d'ion fluorure suivant une réaction de β -élimination. Bien que l'anion fluorure ne soit pas un bon nucléofuge à cause de la grande force de liaison C-F, les cétones, imines et esters donnent facilement cette réaction de β -élimination (figure 39). La présence d'un tel groupement électroattracteur est importante car le produit d'élimination est un accepteur de Michael, d'autant plus réactif qu'un ou plusieurs atomes de fluor seront présents sur la double liaison. Cet accepteur de Michael pourrait former un adduit irréversible avec un nucléophile du site actif d'une enzyme (figure 39).

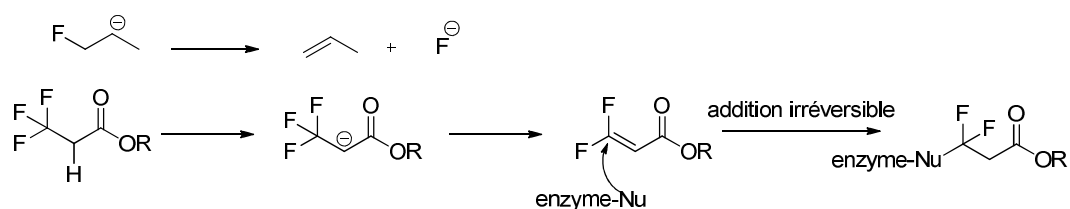


Figure 39 : le fluor dans les réactions de β -élimination.

II.1.f. RMN du fluor et applications :

Le criblage de larges bibliothèques de molécules a beaucoup été utilisé ces dernières années pour la découverte de nouveaux médicaments. Dans ce contexte, la RMN du ^1H a été utilisée pour la découverte de potentiels inhibiteurs dans plusieurs classes thérapeutiques, notamment des inhibiteurs de la matrice métalloprotéase stromélysine (MMP-3)¹³⁸, de la protéine de papillomavirus humaine E2¹³⁹, etc...

La RMN du ^{19}F , quant à elle, a été utilisée pour l'étude d'interactions ligands-protéines avec des protéines contenant des acides aminés fluorés ou des ligands fluorés.^{140,141} Le criblage de molécules par RMN du ^{19}F présente de nombreux avantages par rapport à la RMN du ^1H ¹⁴¹:

1. Une abondance isotopique de 100%, ce qui conduit à une plus grande sensibilité. En théorie, la sensibilité du noyau ^{19}F est de 0.83 fois celle du proton, mais en pratique le fluor est plus sensible que le proton.
2. Les solvants protiques, les tampons ou les détergents n'interfèrent pas avec la mesure, ce qui permet un screening dans des solutions tamponnées mieux appropriées pour la stabilité et la solubilité des protéines.
3. L'absence de chevauchement entre les différents signaux observés en RMN du ^{19}F permet le screening d'un large mélange de structures chimiques et d'automatiser l'analyse du spectre.
4. La grande sensibilité du fluor à son environnement permet de voir une variation du signal d'un ligand libre ou lié à son récepteur.

Avec toutes ces propriétés, il n'est pas étonnant que la RMN ^{19}F ait été utilisée dans les tests d'interaction ligand-protéine, les mesures d' IC_{50} , pour l'élucidation d'un mécanisme réactionnel et les études structurales et dynamiques des protéines.

Application dans le criblage de l'interaction ligand-récepteur:

Le criblage de l'interaction ligand-récepteur par RMN du ^{19}F de ligands fluorés a beaucoup été utilisé dans la littérature.^{142, 143, 144} Cette technique consiste à faire un criblage d'une librairie de ligands fluorés sur une macromolécule cible. Les ligands ayant une affinité pour la cible sont identifiés par un élargissement et/ou un déplacement chimique de leurs signaux par RMN du ^{19}F . Bien que efficace et très utilisée, cette technique présente certains inconvénients et limitations. En effet, on peut détecter la fixation de ligands non spécifiques tandis que les ligands avec une forte affinité pour le récepteur, les ligands avec une cinétique lente et ceux peu solubles dans l'eau ne sont pas détectés. De plus, l'application de cette technique est limitée aux ligands fluorés.

Pour remédier à ces inconvénients une nouvelle technique appelée « Competition ligand-based NMR screening » a été développée.^{145, 146, 147, 148} Cette approche appelée FAXS (Fluorine chemical shift Anisotropy and eXchange for Screening) consiste à mettre en compétition une ou plusieurs molécules chimiques avec un ligand fluoré appelé molécule « espion ». Cette molécule « espion » doit avoir une faible ou moyenne affinité pour la macromolécule cible. Ces expériences sont en général réalisées en présence d'une molécule fluorée qui n'interagit pas avec le récepteur et dont le signal reste constant : c'est l'étalon interne ou molécule contrôle. Le diagramme schématique du FAXS est représenté sur la figure 40.

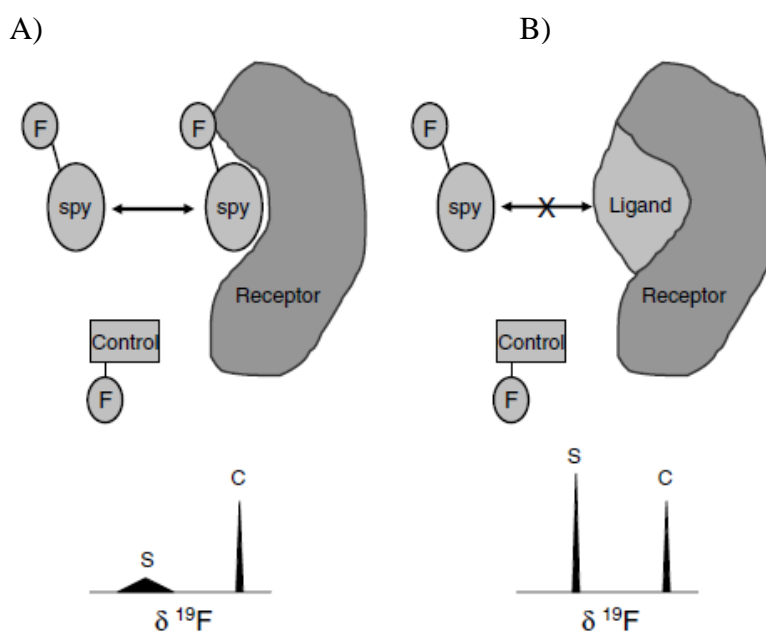


Figure 40 : diagramme schématique de l'expérience FAXS¹⁴²

En absence de ligand du récepteur, la molécule « espion » ayant une affinité pour le récepteur va se fixer au niveau du site catalytique ce qui conduit à un élargissement et une diminution de son signal (figure 40A)). Ce changement d'aspect est dû au fait que la molécule se relaxe différemment suivant si elle est libre ou liée à la protéine cible. En effet, le temps de relaxation transversale T_2 d'une petite molécule est plus long ce qui donne un signal fin. En revanche, ce temps T_2 est plus rapide dans une grosse molécule (protéine) et conduit à un signal plus élargit. Lorsqu'une molécule est liée à une protéine, elle adopte la même propriété de relaxation que cette dernière avec un temps de relaxation T_2 plus court conduisant à un plus signal élargit. En présence de ligand du récepteur, il va y avoir une compétition entre la molécule « espion » et ce ligand. Si ce dernier est plus affiné que l'espion, il va le déplacer du site catalytique et par conséquent son signal devient fin (figure 40B)). Le FAXS marche avec un excès de ligands par rapport au récepteur ainsi les meilleurs résultats sont obtenus avec des ligands fluorés dont l'échange entre la forme liée au récepteur et la forme libre est assez rapide.

Ainsi cette technique de « competition ligand-based NMR screening » est très fiable car elle ne permet la sélection que de ligands spécifiques du récepteur.

Sélection de la molécule « espion »

Le FAXS est une technique qui requiert d'abord l'identification de la molécule « espion » utilisée pour le screening. De plus, la molécule « espion » et la molécule contrôle ne doivent pas avoir le même déplacement chimique. Les deux stratégies envisagées pour la sélection de cette molécule sont décrites dans la figure 41.

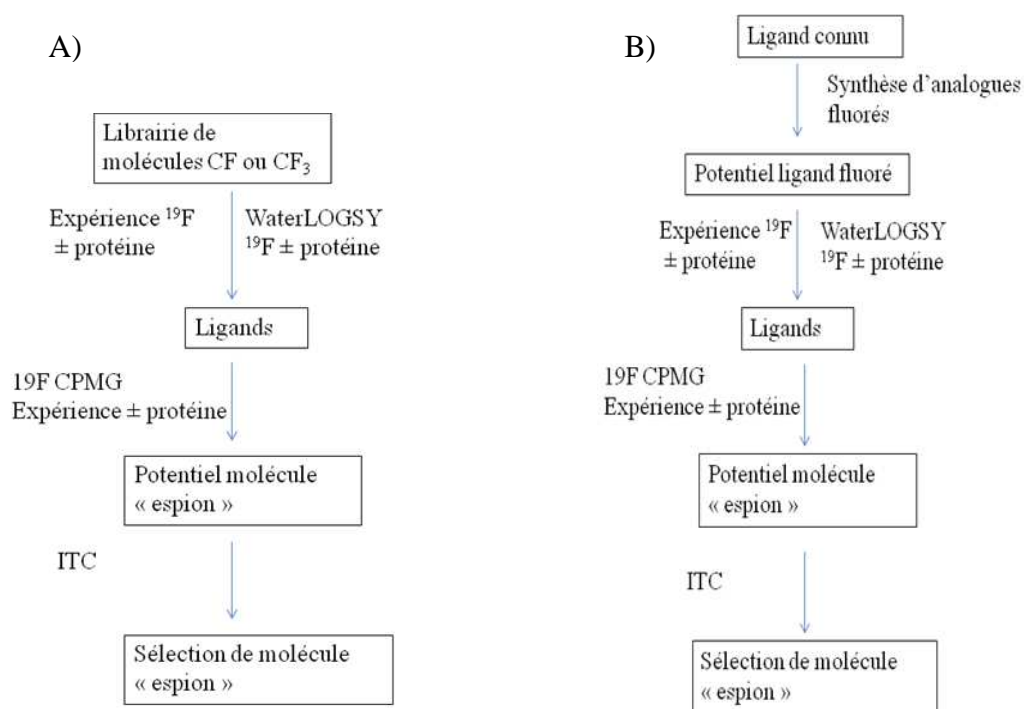


Figure 41 : différentes stratégies pour la sélection de molécules « espion »

Dans la première stratégie, (figure 41A)) on part d'une petite librairie de molécules fluorées. Ces molécules subissent le test de WaterLOGSY (Water-Ligand Observation with Gradient Spectroscopy) qui est un transfert d'aimantation de l'eau au ligand en passant par la protéine. Cette technique permet de sélectionner les ligands qui interagissent avec la protéine cible. Seules les molécules suffisamment solubles, stables et ne présentant pas d'agrégation sont choisies pour la suite. Les ligands sélectionnés subissent ensuite le test de ¹⁹F CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) qui permet de choisir les ligands ayant un signal différent libres et liés à la protéine: exemple de molécules A et B (figure 42). Cette étape est nécessaire afin de trouver la bonne molécule « espion » car le WaterLOGSY peut identifier des molécules dont la relaxation transversale R_2 du ¹⁹F en présence ou absence de protéine n'est visible que pendant une minute. Les ligands identifiés par WaterLOGSY et montrant une atténuation assez significative du signal en présence et en absence de protéine comme le fait la molécule A (figure 42) sont retenus comme potentielles molécules « espion ». Enfin, les constantes de dissociation K_D des potentielles molécules « espion » pour la cible sont déterminées par ITC (Isothermal Titration Calorimetry) ou par fluorescence. Les molécules ayant une faible affinité et un seul site de liaison sur le récepteur sont sélectionnées comme molécules « espion ».

L'autre stratégie (figure 41B)) consiste à partir d'un ligand connu du récepteur sur lequel on fixe un ou plusieurs atomes de fluor. Cette incorporation d'atome de fluor ne doit pas trop influencer l'affinité de la molécule pour son récepteur. La suite est identique à la première stratégie.

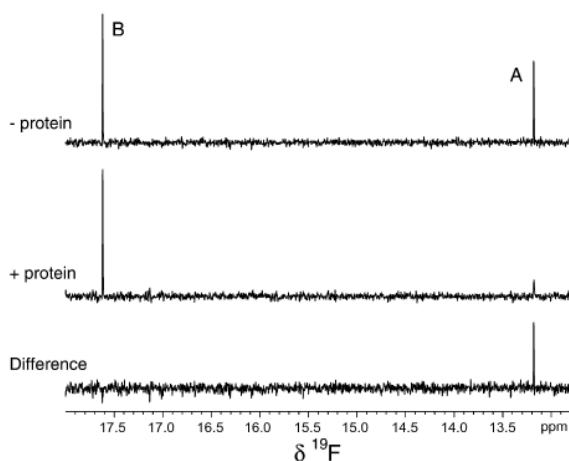


Figure 42 : spectre CPMG ^{19}F de deux molécules A et B.

Le criblage :

Les ligands à tester peuvent ne pas posséder de groupements fluorés et donc pas de caractéristiques spéciales en RMN du ^{19}F . Ils peuvent être testés individuellement ou sous forme de mélange, ce qui augmente la vitesse du screening. Cette technique a donc été appliquée par exemple, pour la recherche de ligand du complexe de protéine eIF4E/eIF4G avec la molécule A comme « espion » (figure 43). Les auteurs ont considéré qu'une molécule est un hit si elle déplace la molécule « espion » de 15%. Seul le mélange 14 est actif sur le mélange de protéine avec un déplacement de 21% de la molécule « espion ».

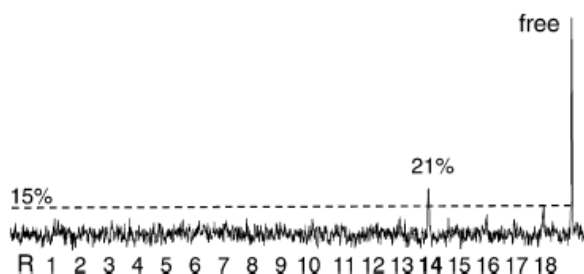


Figure 43 : Spectre de différence entre le spectre de A seul et le spectre de A en présence du complexe eIF4E/eIF4G et de 18 mélanges de ligands.

Application pour la détermination des IC₅₀

La théorie :

Le pourcentage d'inhibition F d'une réaction enzymatique en présence d'inhibiteurs compétitifs, non-compétitifs et incompétitifs est donné respectivement par les équations **1**, **2** et **3**. Un inhibiteur compétitif possède généralement une ressemblance structurale avec le substrat et tous deux entrent en compétition pour se fixer sur le même site enzymatique (=effet isostérique). En revanche, un inhibiteur incompétitif ne se fixe jamais à l'enzyme libre mais seulement à l'enzyme complexée avec le substrat et empêche la formation du produit car le complexe ESI est inactif. Enfin, Un inhibiteur non compétitif a un site de fixation distinct de celui du substrat (site allostérique) et empêche les ajustements conformationnels du site actif pour qu'il y ait catalyse (le complexe ESI est inactif).

$$F = \frac{100[I]}{K_i + [I]} \quad (1)$$

$$F = \frac{100[I]}{\left(\frac{K_M K_i}{[S]} + K_i\right) + [I]} \quad (2)$$

$$F = \frac{100[I]}{\left(\frac{[S] K_i}{K_M} + K_i\right) + [I]} \quad (3)$$

Les valeurs $[S]$ et $[I]$ sont respectivement les concentrations du substrat et celle de l'inhibiteur, K_m est la constante de Michaelis-Menten et enfin K_i est la constante de liaison de l'inhibiteur. Les courbes représentant la simulation des trois équations **1**, **2** et **3** sont représentées sur la figure 44.

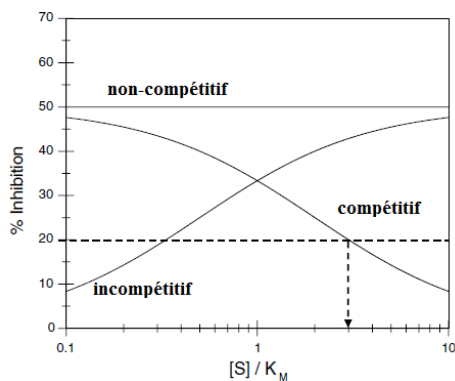


Figure 44 : courbes simulant les équations 1, 2 et 3

Le pourcentage d'inhibition est fonction de la concentration du substrat sur K_m . La courbe est enregistrée dans la phase linéaire de la réaction enzymatique où seulement une fraction de substrat a été transformée en produit. Donc pour tracer cette courbe, il faut pouvoir quantifier la quantité de produits formés, et cette quantification peut ainsi se faire par RMN du fluor. Pour cela, la technique utilisée est le FABS (Fluorine Atoms for Biochemical Screening) ou n -FABS où n est le nombre de fluor utilisé pour la détection.^{149, 150}

Cette technique est basée sur la grande sensibilité du fluor à son environnement, ainsi la modification du substrat fluoré par réaction enzymatique change le déplacement chimique du fluor même s'il est loin du site de la réaction. Par conséquent, on distingue deux signaux différents, l'un correspondant à celui du substrat et l'autre à celui du produit (figure 45). Dans le cas où il y a chevauchement des deux signaux, des modifications des conditions expérimentales sont effectuées pour augmenter la différence de déplacement chimique. Ces variations de déplacement chimique peuvent être une augmentation du pH, de la température ou l'addition de substances qui perturbent différemment le substrat et le produit, comme par exemple les cyclodextrines et les cyclophanes.¹⁵¹

Cette approche nécessite ainsi l'utilisation de substrat ou cofacteur fluoré ce qui est facilement faisable si le substrat ou co-facteur est un peptide. En effet, le groupement fluoré peut être introduit par exemple en position N -terminal avec l'anhydride trifluoroacétique donnant un peptide N -trifluoroacétylé. Le groupement CF_3 peut aussi être incorporé en position C -terminal par formation de liaison amide avec la trifluorométhylamine ou, par l'utilisation d'acide aminé fluoré lors de la synthèse peptidique.¹⁵⁰ Le groupement fluoré doit être introduit dans une position qui n'influence pas l'affinité du substrat pour son récepteur.

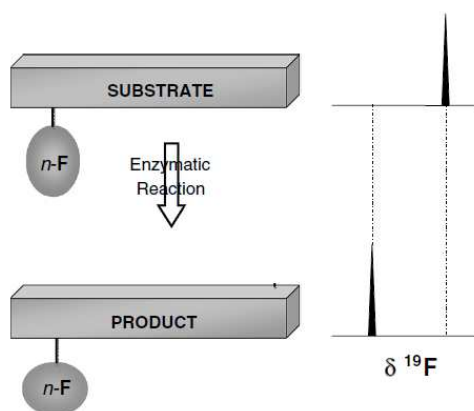


Figure 45 : représentation schématique du FABS (n est le nombre de fluor utilisé pour la détection)¹⁵⁰

Criblage et mesure de l'IC₅₀ :

Un exemple d'utilisation du FABS pour la détermination de l'IC₅₀ d'inhibiteur de la Ser/Thr kinase Akt-1 a été reporté par Dalvit *et al.*¹⁴⁹ Le criblage a été effectué en mettant en contact un ou plusieurs inhibiteurs potentiels, avec une concentration proche de la valeur du *K_m*, avec l'enzyme et le substrat naturel de l'enzyme préalablement fluoré à l'extrémité *N*-terminale (CF₃-CO-ARKRERAYSFGHHA). Ce substrat fluoré en se liant au site actif de l'enzyme est phosphorylé sur le résidu sérine par l'ATP pour donner un produit avec un déplacement chimique en RMN ¹⁹F différent (figure 46a)). Les molécules présentant une affinité pour l'enzyme vont se fixer au niveau du site catalytique empêchant ainsi la fixation du substrat naturel fluoré. Par conséquent, le signal correspondant au produit fluoré résultant de la transformation du substrat n'est pas enregistré. Après un délai bien déterminé d'incubation, la réaction est arrêtée par addition d'un inhibiteur plus fort, par un agent chélatant, par dénaturation de la protéine ou tout simplement par changement de pH. Chaque criblage est réalisé en présence d'un ou deux échantillons sans molécule à tester : ce sont les références avec 0% d'inhibition (figure 46).

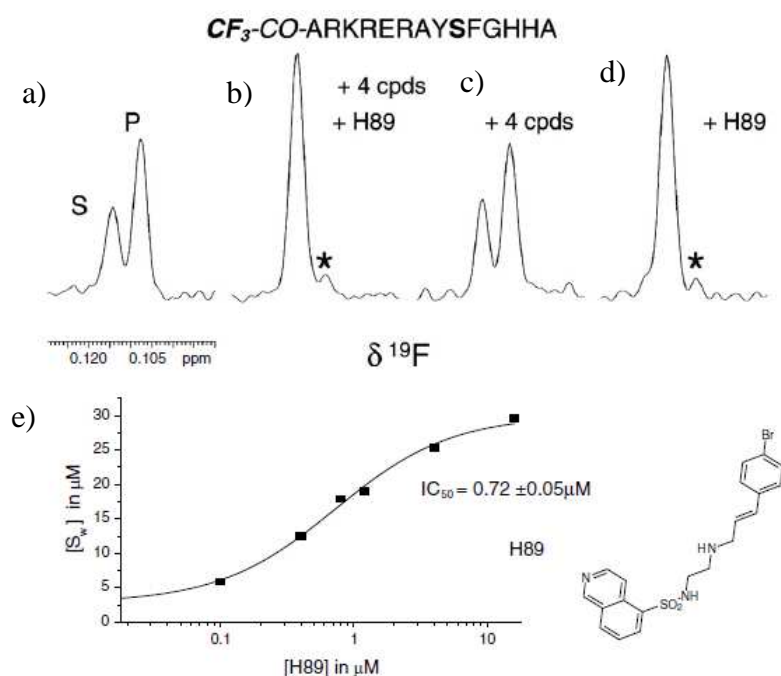


Figure 46 : screening de molécules et mesure de l'IC₅₀ de la molécule H89 avec le FABS

Sont représentées dans la figure 46 a) les références des différents déplacements chimiques du substrat et du produit en absence de molécules tests. En présence d'un mélange de quatre molécules (2-amino-6méthylquinazolin-4-ol, 2-quinoxalinecarboxylate d'éthyle, 5-méthylbenzimidazole et isoquinoline-3-carboxylate de méthyle) et du composé H89 le signal correspondant au produit disparaît, ce qui signifie qu'au moins une molécule de ce mélange inhiberait l'enzyme (figure 46 b)). Le screening des quatre molécules avec l'enzyme a montré un signal équivalent à celui de la référence (figure 46c)) tandis qu'avec la molécule H89 utilisée seule on observe une disparition totale du signal du produit (figure 46 d)). Cela signifie que ce composé est un très bon inhibiteur de la Ser/Thr kinase Akt-1.

L'IC₅₀ de la molécule H89 a donc été obtenu par l'enregistrement de différentes concentrations d'inhibiteurs et par la mesure de l'intégrale du signal ¹⁹F du substrat et du produit (figure 46 e)).

Différentes applications du FABS :

La mise en place facile de la technique du FABS a permis son utilisation dans de nombreuses procédures:

1. Le criblage de molécules modulant l'activité de presque toutes les classes d'enzymes notamment les oxydoreductases, les transférases, les lyases, les isomérases et les ligases est possible. Récemment, le FABS a été appliqué avec succès pour le screening de bibliothèques de molécules inhibitrices de caspases¹⁵², de la thymidine phosphorylase¹⁵³, mais aussi dans la médecine traditionnelle chinoise pour le criblage d'extraits de plantes contre les caspases¹⁵⁴, la protéase du VIH¹⁵⁵, et la propyl oligopeptidase¹⁵⁶.
2. Un criblage simultané contre plusieurs enzymes. Un bel exemple de cette approche est le screening avec la Ser/Thr kinase Akt-1 et la protéase à trypsine.¹⁴⁹
3. La détermination de la fonction d'une nouvelle séquence protéique est importante pour le développement d'agents bioactifs. Ainsi après avoir déterminé le déplacement chimique des produits de substrats fluorés d'enzyme connus, ces derniers sont utilisés pour le criblage de nouvelles protéines dans le but de déterminer leurs fonctions.¹⁵⁰
4. Le FABS peut être aussi utilisé pour un criblage dans les cellules vivantes ou des extraits cellulaires. Comme la cellule ne contient pas naturellement de substance fluorée le signal observé est celui du produit injecté.

Application de la RMN du ^{19}F pour l'élucidation d'un mécanisme réactionnel :

Colby *et al.*¹⁵⁷ ont exploité la RMN du fluor comme sonde pour démontrer le mécanisme d'action des sesquiterpènes lactone parthenolide. En effet, il avait été démontré que les dérivés de α -méthylamine lactone servent de prodrogues et que l'amine est libérée selon un mécanisme de rétro-Michael pour régénérer l'énone en présence de nucléophile biologique tel que le glutathion (figure 47).

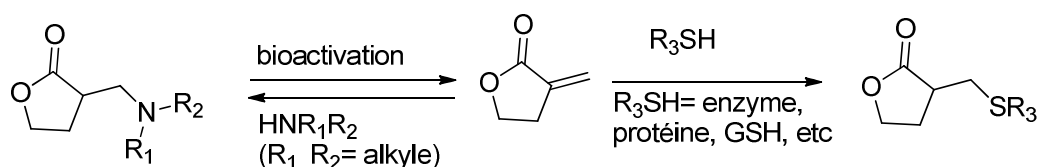
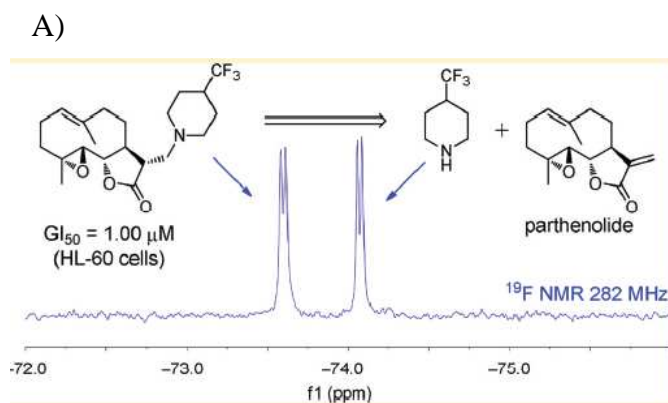


Figure 47 : conversion *in vivo* de α -méthylamine lactone en enone

Ils ont donc incorporé un groupement fluoré sur un composé α -méthylamine lactone et ils ont d'abord vérifié par RMN du ^{19}F que le produit et l'amine fluorée ont des déplacements chimiques différents (figure 48 A)). Ils ont ensuite incubé le produit avec du glutathion et suivi l'apparition du signal correspondant à l'amine fluorée. La figure 48 B)) montre bien que la quantité d'amine libérée en présence du glutathion est beaucoup plus élevée qu'en son absence au même moment.¹⁵⁷ Ils ont ainsi prouvé le mécanisme de rétro-Michael par RMN du ^{19}F .



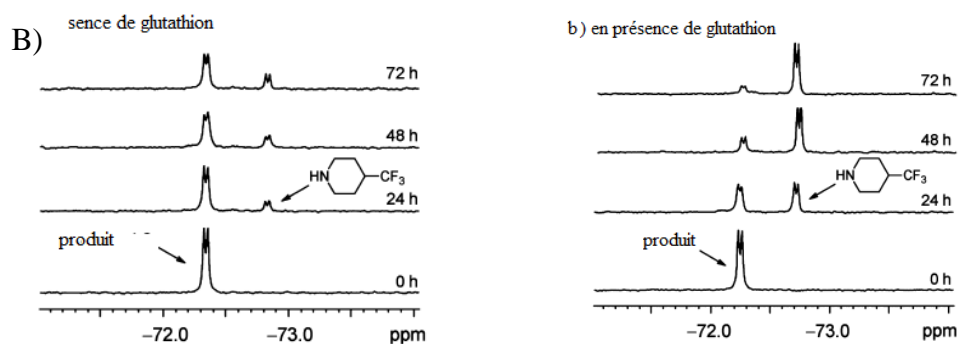


Figure 48 : A) comparaison des déplacements chimiques de l'amine fluorée libre ou liée. B) a) la réaction en absence de glutathion, b) la réaction en présence de glutathion

Application de la RMN du ^{19}F pour étude structurale et dynamique des protéines:

La RMN ^{19}F a aussi été appliquée pour les études structurales et dynamiques de protéines.^{117,158,159} Pour cela, les protéines doivent au préalable être marquées au fluor. Ces protéines fluorées sont obtenues par l'incorporation d'acides aminés fluorés par une approche classique de synthèse chimique ou, par une approche biosynthétique. Si la voie synthétique est efficace dans le cas des peptides, elle perd rapidement de son efficacité du fait de la faiblesse du rendement liée au grand nombre de couplage requise. Par conséquent, l'approche par voie biosynthétique est la plus efficace. Cette stratégie consiste à faire pousser des bactéries dans un milieu contenant des analogues fluorés d'un acide aminé dont il est auxotrophe. Les atomes de fluor servent ainsi de sondes RMN mais peuvent aussi induire des interactions propres. On peut citer dans ce domaine des études sur les états globulaires (molten globular state) de protéines.¹⁶⁰ En effet le fluor a un déplacement chimique différent en RMN selon que la protéine soit native ou dénaturée. De même, une modification de déplacement chimique peut être enregistrée selon que l'acide aminé fluoré est exposé ou non au solvant on peut ainsi déduire la conformation adoptée par la protéine.^{161,162}

Cette méthode est surtout utilisée pour les protéines insoluble donc difficile à cristalliser. L'inconvénient majeur de cette méthode est que selon la nature, le nombre et les positions des molécules de fluors incorporées, la fonctionnalité de l'enzyme pourrait être modifiée ou supprimée.

II.2. Les peptidomimétiques fluorés:

Les peptides jouent un rôle fondamental dans de nombreux processus physiologiques et peuvent être utilisés comme médicaments dans le traitement de plusieurs maladies. Cependant, leur faible biodisponibilité constitue un des inconvénients majeurs de leur utilisation en chimie médicinale. Pour palier ce problème, le développement de peptidomimétiques, qui sont des analogues plus stables des peptides, a connu un grand essor ces dernières années.^{163,164,165} En effet, en plus d'augmenter la sélectivité et l'efficacité des peptides naturel, ces composés peuvent diminuer les effets secondaires, améliorer la biodisponibilité et prolonger l'activité pharmacologique des peptides naturels apparentés.¹⁶⁶ Les peptidomimétiques peuvent aussi être utilisés comme outil pharmacologique pour étudier l'effet des structures secondaires sur l'activité d'une protéine.¹⁶⁷

Les premiers peptidomimétiques ont été obtenus par simple modification des extrémités *N* et *C*-terminales, la méthylation de l'azote de la fonction amide ou le remplacement des L amino acides par des D amino acides (figure 49).^{168,169} L'introduction d'isostère de fonction amide permet d'éviter la dégradation enzymatique et modifie aussi les propriétés biochimiques du peptide en particulier sa conformation et son hydrophobie.¹⁷⁰

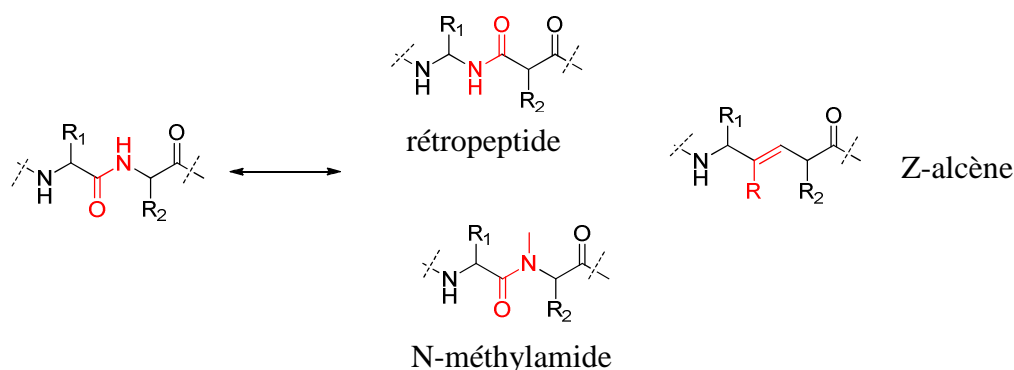


Figure 49: exemples d'isostères de groupement amide

Un très grand nombre de peptidomimétiques sont décrits dans la littérature. Ce chapitre ne se veut pas du tout exhaustif sur les peptidomimétiques en général mais nous nous focaliserons un peu plus précisément sur les modes d'accès et les applications des peptidomimétiques contraints et fluorés.

Comme évoqué précédemment, l'introduction du fluor dans une structure peptidomimétique s'accompagne d'une profonde modification des propriétés physiques, de la réactivité chimique et de l'activité biologique.^{117,126,130} Par conséquent, le développement de peptidomimétiques fluorés comme médicament potentiel est une stratégie très intéressante en chimie médicinale. Pour concevoir les peptidomimétiques fluorés plusieurs approches sont envisagées :

- 1) Utilisation d'isostères fluorés de la liaison peptidique
- 2) Incorporation lors de la synthèse d'acides aminés fluorés
- 3) Utilisation d'isostères de l'état de transition

II.2.a. isostères fluorés de la liaison peptidique :

Le remplacement de la liaison amide par un isostère est une approche classique en chimie médicinale pour la synthèse de peptidomimétiques. Les (Z)-alcènes et le groupement trifluoroéthylamine sont d'excellents isostères non hydrolysables, ce qui palie aux problèmes de stabilité enzymatique des peptides.

Les (Z)-fluoroalcènes:

Les peptides contenant une unité avec une oléfine ont une structure rigide ce qui mime bien un groupement amide et augmente aussi la lipophilie. La faible polarité de la double liaison est compensée par l'incorporation d'un atome de fluor (figure 50).¹⁷¹ Les monofluoroalcènes sont des structures rigides par conséquent la liberté conformationnelle cis/trans est nulle.

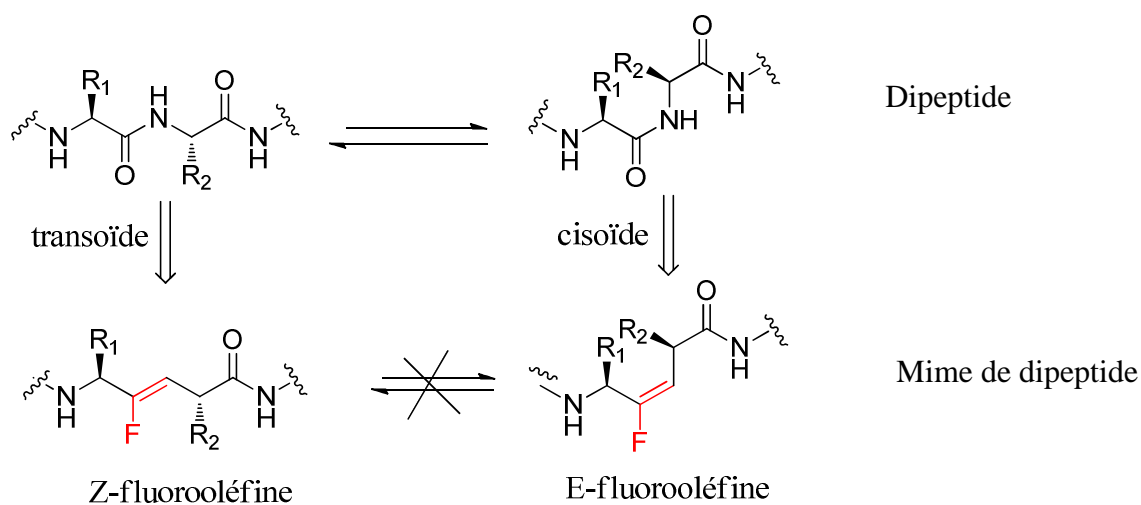


Figure 50: Monofluoroalcène comme mime de liaison peptidique

Sur le plan stérique, la double liaison et le groupement amide ont des longueurs et angles de liaison comparables (figure 51).¹⁷²

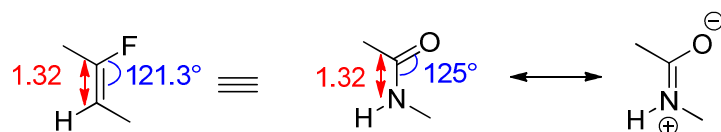
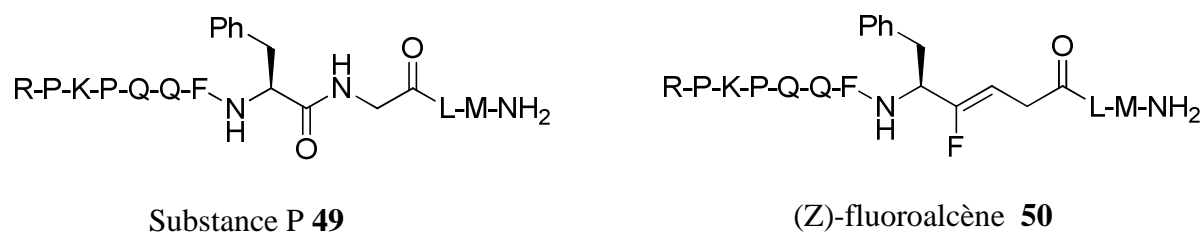


Figure 51 : comparaison de la double liaison et de la liaison amide

Pour prouver cette théorie, Allmendinger *et al.* ont remplacé une liaison peptidique par une liaison monofluoroalcène dans une substance neuropeptide.¹⁷³ Les essais de liaison de ce peptidomimétique sur le récepteur ont montré que son affinité était très proche de celle de la substance neuroleptique native (figure 52).



Produit	IC ₅₀ (nM)
Substance P	1.3
(Z)-fluoroalcène	2.0

Figure 52 : structure et affinité du peptidomimétique fluoré pour le récepteur de la substance P

Le groupement trifluoéthylamine

Le groupement trifluoroéthylamine est aussi un excellent isostère car sa polarité avoisine celle du carbonyle de la fonction amide (figure 53) et peut donc le remplacer. Son effet électroattracteur diminue la basicité de l'amine, et augmente donc le caractère donneur d'hydrogène de la fonction amide adjacente. De plus, l'angle formé par des liaisons CH-CF₃ et CH-NH est proche de celui formé par les liaisons C=O et C-NH d'une fonction amide (figure 51).¹⁷⁴

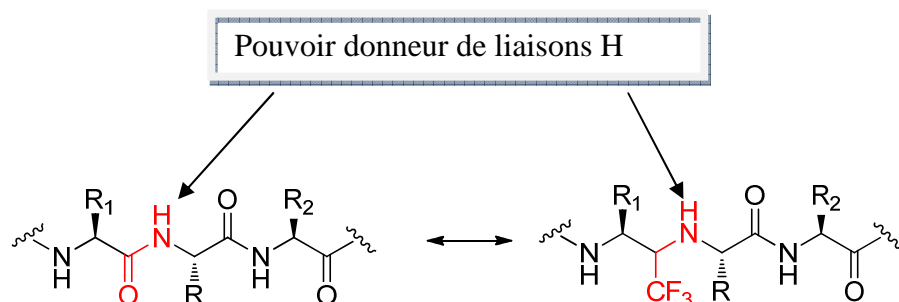


Figure 53 : le groupement trifluoroéthylamine comme isostère de la liaison amide

Zanda *et al.*¹⁷⁴ ont introduit un groupement trifluoroéthylamine dans le rétropeptide de Gellman (figure 54). L'étude conformationnelle par RMN a démontré que l'analogue fluoré de ce rétropeptide adoptait la même conformation en coude β que le rétropeptide de Gellman (figure 54).¹⁷⁴

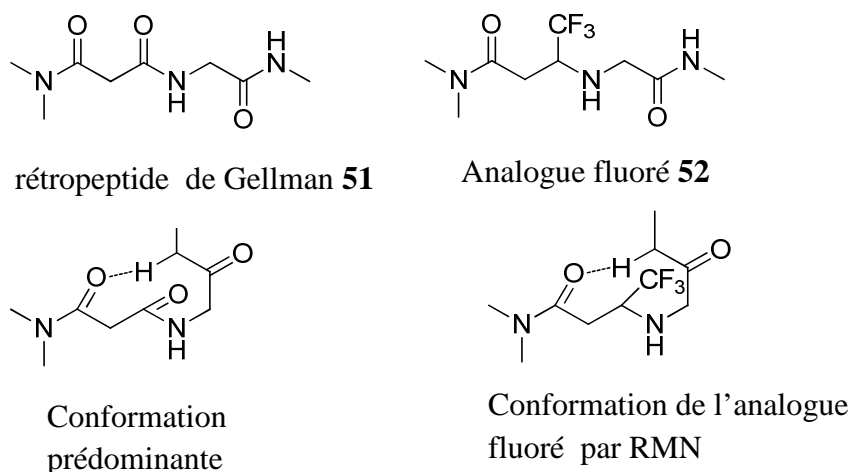
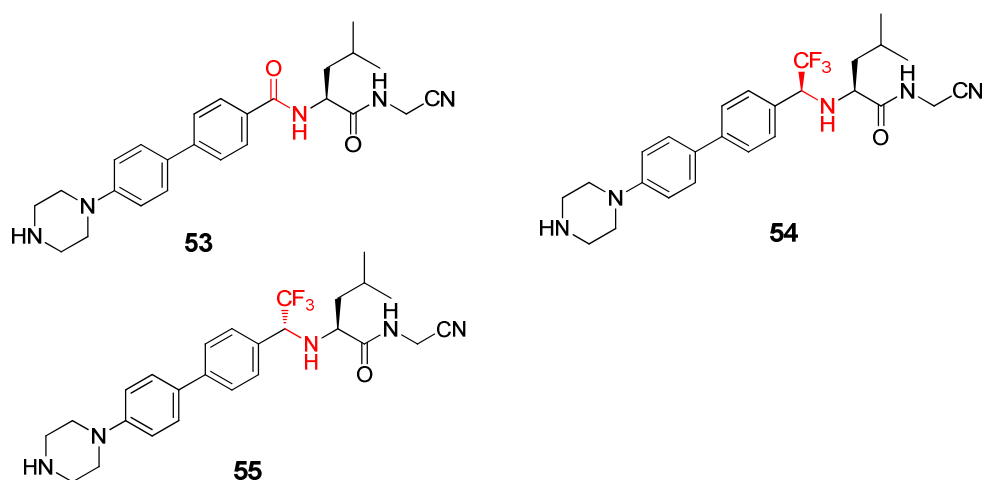


Figure 54: conformation adoptée par le rétropeptide de Gellman et son analogue fluoré

Ce groupement trifluoroéthylamine a été utilisé avec succès par le groupe Merck comme isostère du groupement amide dans les inhibiteurs de la cathepsine K (figure 55).¹⁷⁵ Le remplacement de la liaison peptidique par cet isostère a permis d'augmenter considérablement l'activité du composé. Ils ont même obtenu une sélectivité pour la cathepsine K par rapport aux autres cathepsines avec le produit *syn* **54**.¹⁷⁵



Produit	Cat K	Cat B	Cat L	Cat S
53	11	3950	3725	2010
54	<0,005	1111	47	451
55	4.6	>10 000	68	902

Figure 55: inhibiteurs de la cathepsine IC₅₀ (nM)

II.2.b Les acides aminés fluorés :

Plusieurs synthèses d'acides aminés fluorés ont été décrites.^{117,126} On peut par exemple citer la trifluoroalanine, la (S)- α -trifluorométhylproline¹⁷⁶ qui sont des analogues fluorés d'acides aminés naturels (alanine et proline). D'autres amino-acides fluorés tels que la D-trifluorométhyle norvaline¹⁷⁷, l'acide β -trifluorométhyl- β -amino¹⁷⁸, les fluorotyrosines¹¹⁷ (figure 56) etc... ont aussi été décrites.

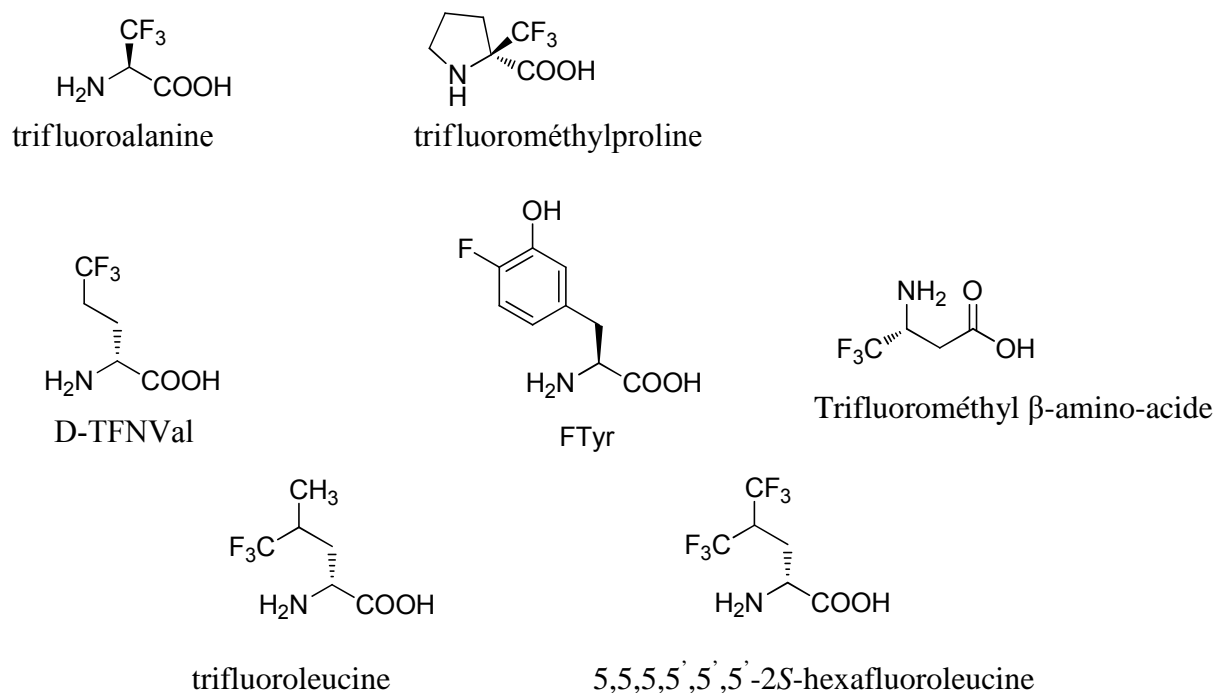
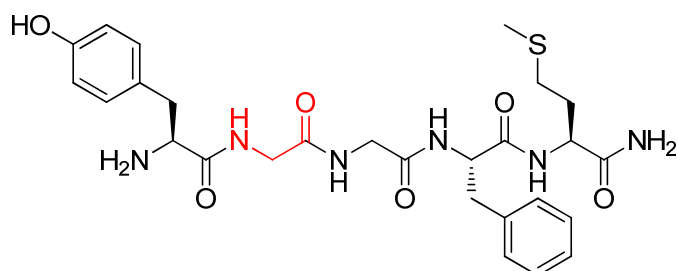


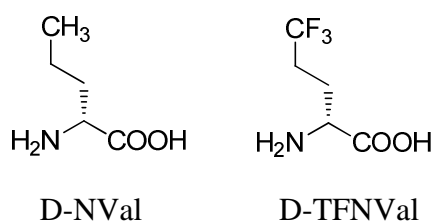
Figure 56: exemples d'acides aminés fluorés

Ainsi, plusieurs équipes ont utilisé ces acides aminés fluorés pour concevoir des peptidomimétiques avec de meilleures activités. Kumar et son équipe ont montré que l'incorporation de la 5,5,5,5',5',5'-2S-hexafluoroleucine dans des peptides à activité antimicrobienne augmentait leur activité et leur résistance aux protéases.¹⁷⁹ Il a aussi été démontré que l'incorporation de la trifluoroleucine permettait de maintenir la structure secondaire des peptides et d'augmenter la stabilité protéique face à la dénaturation chimique et thermique.¹⁸⁰

Un autre exemple est rapporté par Ojima *et al.* dans la synthèse de fluoroenképhaline (figure 57).¹⁸¹ En effet, si le remplacement de la glycine 2 par la D-Nval a permis une augmentation considérable de l'activité analgésique de l'enképhaline, le remplacement de la D-Nval par la (D)-TFNVal entraîne une multiplication de l'activité analgésique par 100 000.



Méthionine-enképhaline : Tyr-Gly²-Gly- Phe-Met **56**



Produit	Activité analgésique ED ₅₀ (10 ⁻⁹ mol/souris)
Tyr-Gly ² -Gly- Phe-Met	700
Tyr-(D)NVal-Gly-Phe-Met-NH ₂	0,04
Tyr-(D)TFNVal-Gly-Phe-Met-NH ₂	0,007

Figure 57: activité analgésique sur la souris

Zanda *et al.* ont mis au point une synthèse asymétrique d'un analogue trifluorométhylé d'un motif statine nommé γ -Tfm-GABOB où le groupement isobutyle est remplacé par le groupement trifluorométhyle (figure 58).¹⁸²

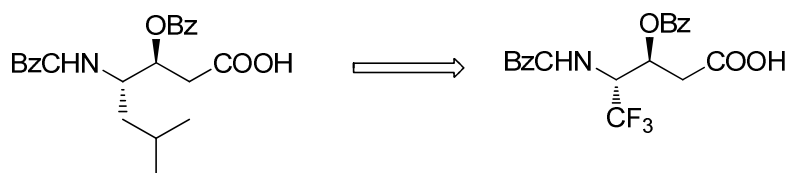
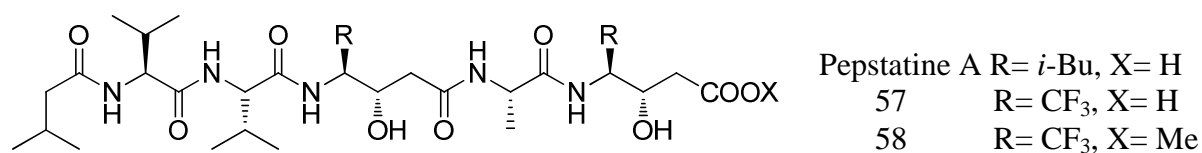


Figure 58: structure de γ -Tfm-GABOB

Ils ont par la suite incorporé ce motif dans la synthèse d'analogues fluorés de pepstatine A qui est un inhibiteur naturel de plusieurs aspartyl protéases. Les analogues fluorés de la pepstatine A n'ont pas montré d'activité inhibitrice sur la protéase de VIH 1 ou 2. En revanche, ils ont permis d'améliorer la sélectivité entre les différentes protéases (figure 59).

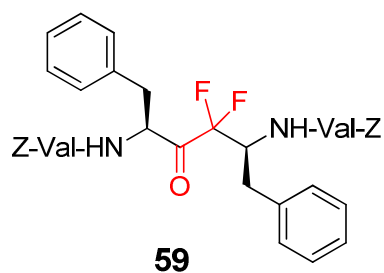


Produit	Protéase du VIH	Plasmepepsine II	Plasmepepsine IV	Cathepsine D
Pepstatine A	2500	0,44	0,61	0,64
57	>150 000	1,3	23	120
58	indéterminé	2,4	96	2900

Figure 59: IC₅₀ (nM) de pepstatine A et ses dérivés fluorés.

II.2.c. les isostères fluorés de l'état de transition:

L'une des stratégies pour inhiber une protéase est de mimer l'état de transition du clivage de la liaison peptidique. Certains inhibiteurs possèdent dans leur structure un mime fluoré de cet état de transition. Sham et *al.* ont développé plusieurs inhibiteurs de la protéase de VIH dans lesquels on retrouve certains de ces isostères (figure 60).¹⁸³ Le carbonyle de la difluorocétone est attaqué par la protéase du VIH ce qui donne un intermédiaire tétraédrique stable (voir page 39)



59

$$K_i = 0,1 \text{ nM}$$

Figure 60: inhibiteurs fluorés de la protéase du VIH

En conclusion, nous avons vu dans ce chapitre les différentes classes d'inhibiteurs du protéasome. La grande diversité et la quantité de ces inhibiteurs montrent l'importance de cette macromolécule comme cible dans le traitement du cancer. D'ailleurs, un de ces inhibiteurs est utilisé dans le traitement du myélome multiple et du lymphome du manteau et,

plusieurs composés sont en études cliniques pour différents cancers. Nous avons aussi mis en évidence le bénéfice apporté par l'incorporation de groupement fluoré sur une molécule bioactive surtout de structure peptidomimétique. En revanche, l'introduction d'un atome de fluor ou d'un groupement fluoré n'a été que très peu effectuée dans le domaine des inhibiteurs du protéasome. On peut citer trois exemples : un dérivé difluorobenzyl indanone dipeptide¹⁸⁴, un dérivé fluoré de la salinosporamide⁹¹, et un dérivé d'époxyétone¹⁸⁵. Par ailleurs, d'une manière plus générale les peptidomimétiques contraints et fluorés sont peu développés, le seul exemple à notre connaissance est l'analogue contraint et fluoré de la substance P contenant le motif (Z)-fluoroalcène. Ainsi, les objectifs de ma thèse sont doubles. Le premier est l'introduction de fluor dans des composés peptidomimétiques potentiellement inhibiteurs du protéasome. Le deuxième est de mettre au point une méthodologie de synthèse des unités peptidomimétiques contraintes et fluorées pouvant ensuite être introduites dans des composés à visée inhibitrice du protéasome mais également dans d'autres composés bio actifs.

I. Objectifs et conception:

Comme évoqué dans mon introduction, les inhibiteurs covalents du protéasome provoquent un grand nombre d'effets secondaires dus à la présence dans leurs structures de groupements réactifs. Par conséquent, notre objectif est de développer de nouvelles molécules inhibitrices du protéasome sans ces fonctions réactives, ce qui pourrait diminuer ces effets secondaires.

Dans un premier temps, nos composés se sont inspirés des molécules analogues des composés aminobenzylstatine des laboratoires Novartis, en particulier de la molécule **36** inhibitrice du site CT-L du protéasome 20S humain avec une IC_{50} de 15 nM (voir chapitre I page 27).¹⁰⁷ Nous visons à cibler principalement le site CT-L car c'est l'inhibition de ce site qui semble nécessaire pour obtenir une bonne activité anti-tumorale des inhibiteurs. Par des études de modélisation moléculaire, il a été montré que la molécule **36** se lie au site actif CT-L en formant un feuillet β avec les résidus 21 à 23 d'un côté et les résidus 47 à 49 de l'autre côté. Elle contracte aussi des liaisons hydrogènes avec la Thr21, la Gly47 et l'Ala49 tout en occupant les poches S1, S3, AS1 et AS2 (figure 61).

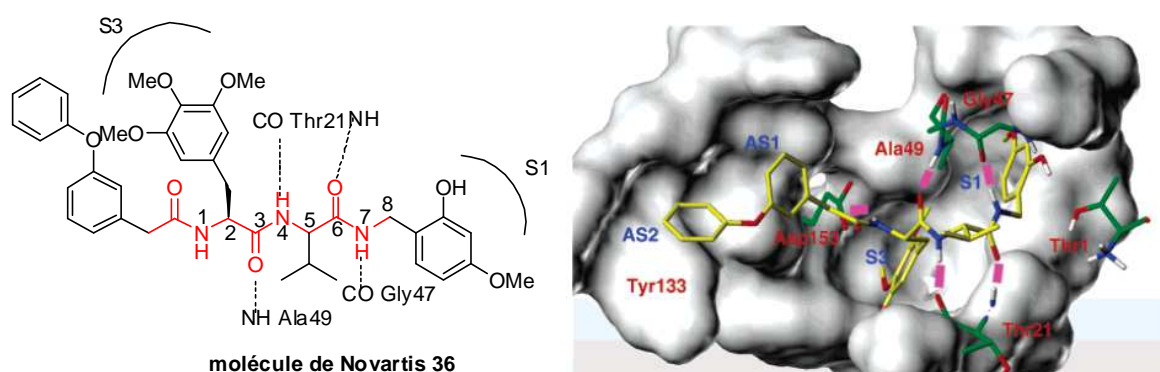


Figure 61: structure de la molécule de Novartis et image de modélisation dans le site CT-L du protéasome.¹⁰⁷

L'objectif de notre laboratoire était de diminuer le caractère peptidique de la molécule de Novartis en remplaçant le résidu valine par un pseudoaminoacide afin d'essayer d'obtenir des inhibiteurs du protéasome d'efficacité comparable tout en augmentant leur stabilité métabolique. Au-delà de notre intérêt pour découvrir de nouveaux inhibiteurs du protéasome, notre laboratoire s'intéresse à la conception de nouveaux peptidomimétiques et de nouveaux

pseudoaminoacides ainsi qu'à l'incorporation de groupements fluorés dans ces structures peptidomimétiques.

Nous avons ainsi conçu de nouveaux scaffolds fluorés ou non fluorés en remplacement du résidu valine de la molécule **36** de Novartis par les motifs β -hydrazino acide trifluorométhylé **60**, β -hydrazino acide **61**, α -hydrazino acide **62**, β -amino acides cyclopropane trifluorométhylé **63** et N-aminoaziridine acide trifluorométhylé **64** (figure 62).

Nous nous sommes particulièrement intéressés aux motifs hydrazino acides "flexibles" et contraints afin de démontrer que les pseudoaminoacides de nature hydrazino acide peuvent mimer les structures des acides α aminés et les structures secondaires des peptides natifs lorsqu'ils sont introduits dans des inhibiteurs de protéase. Les scaffolds α et β -hydrazino acide sont des motifs peptidomimétiques contenant deux atomes d'azotes et peuvent être considérés comme des analogues des α et β -amino acides **65** et **66** respectivement dans lesquels la fonction amine est remplacée par l'hydrazine (figure 62). Les α et β -hydrazino acides peuvent aussi être considérés comme des analogues de β et γ -amino **66** et **67** acides dont les carbones C^β et C^γ sont remplacés par un azote (figure 62).¹⁸⁶ Par conséquent, ces structures peuvent mimer les structures secondaires de peptides naturels, préservant ainsi l'activité biologique tout en augmentant la stabilité métabolique.^{187,188} De plus, ces scaffolds apportent une fonction amine supplémentaire ce qui pourrait augmenter le nombre de liaisons hydrogènes.¹⁸⁹ Cependant à notre connaissance les α -hydrazino acides sont peu utilisés en chimie médicinale et, il n'existe qu'un seul exemple de leur utilisation dans les inhibiteurs d'une sérine protéase.¹⁸⁷ Les rétro hydrazino-azapeptoides ont été récemment décrits comme inhibiteurs covalents du protéasome avec des IC_{50} allant de 50 à 500 μ M.¹⁹⁰ Par ailleurs si les β -amino acides ont été très utilisés¹⁹¹⁻¹⁹³ peu d'exemples existent sur l'incorporation de β -hydrazino acides dans les peptidomimétiques. A notre connaissance, les β -hydrazino acides trifluorométhylés, les N-aminoaziridines acides trifluorométhylés et les β -aminoacides cyclopropane trifluorométhylés ne sont pas décrits dans la littérature.

Chapitre II: Synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs du protéasome dérivés de scaffolds α et β hydrazino acides

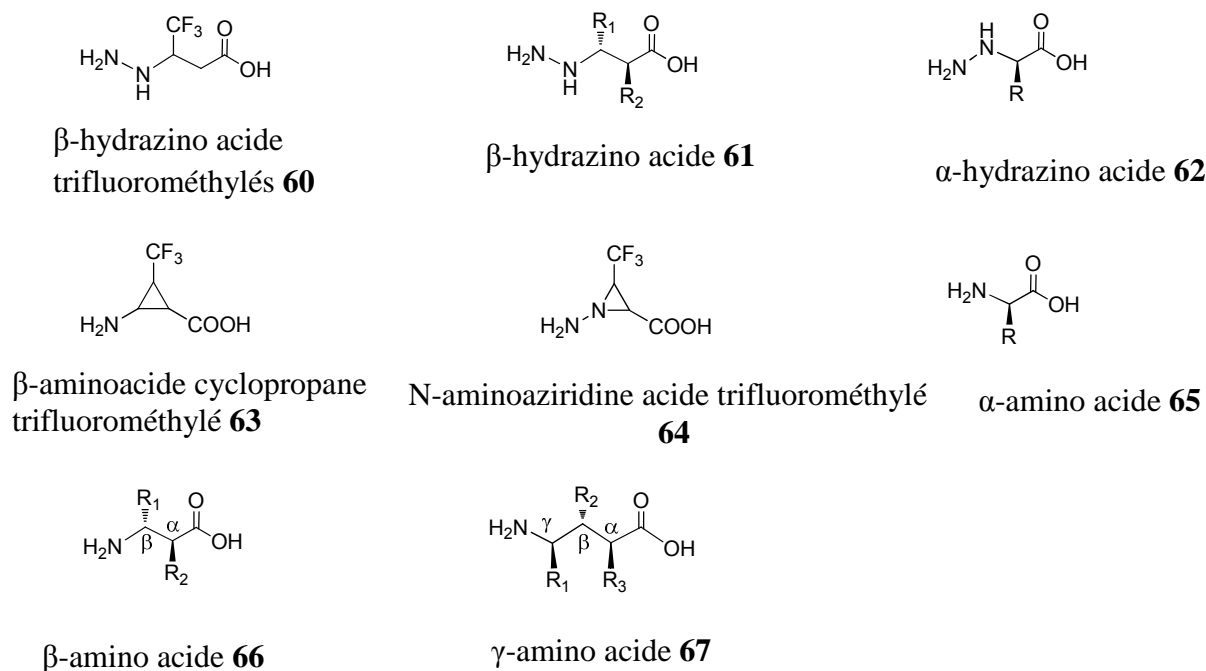


Figure 62: structures générales des amino acides et des hydrazino acides

Sur la figure 63 est représentée la structure générale des molécules que nous avons conçues. Nos molécules sont divisées en quatre parties. Ces quatre parties doivent permettre d'occuper correctement le site actif CT-L du protéasome et de remplir les trois critères qui sont : l'occupation des poches S1, S3, AS1 et AS2 ; la formation de liaisons hydrogènes avec Thr21, Gly47, Ala49 et Asp114 et la formation d'un feuillet β avec les résidus 21 à 23 d'un côté et les résidus 47 à 49 de l'autre. Nous allons effectuer les pharmacomodulations sur chaque partie afin d'établir des relations structures-activité et de tenter d'obtenir des molécules inhibitrices du site CT-L du protéasome (figure 63).

Partie 1 :

Nous envisageons d'introduire sur cette partie les groupements *tert*-butyloxycarbonyle (A.1), 9-fluorénylméthoxycarbonyle (A.2), 3-phénoxyphénylacétyle (A.3) et 2,5-diméthoxyphénylacétyle (A.4). Ces groupements sont assez encombrants et sont susceptibles d'occuper les poches accessoires AS1 et AS2 importantes pour une bonne activité inhibitrice. Ensuite, pour vérifier si une plus grande flexibilité de cette partie pourrait améliorer l'activité en permettant une meilleure occupation des poches AS1 et AS2, nous allons remplacer la

Chapitre II: Synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs du protéasome dérivés de scaffolds α et β hydrazino acides

liaison amide par une liaison amine, et ainsi introduire les motifs 3-phénoxyphényl méthyle (A.5) et 2,5-diméthoxyphényl méthyle (A.6).

Partie 2 :

La partie 2 doit contenir un groupement occupant la poche S3 du site actif CT-L et doit aussi engager une liaison hydrogène avec le résidu Asp114 (qui devient Asp125 dans le protéasome bovin). Nous avons ainsi introduit les résidus lysine protégée (B2) et déprotégée (B1), asparagine (B3), 3,4-diméthoxyphénylalanine (B4) et tryptophane (B5).

Partie 3 :

La partie 3 doit adopter une structure en brin β pour former un feuillet β avec les résidus 21 à 23 d'un côté et les résidus 47 à 49 de l'autre et engager des liaisons hydrogènes avec Thr21, Gly47, Ala49. Comme expliqué précédemment, nous avons décidé d'introduire sur cette partie des motifs hydrazino acides et amino acides contraints.

Dans un premier temps, nous avons introduits le motif β -hydrazino acide trifluorométhylé (C.1). Le groupement trifluorométhyle a été introduit dans le but d'exploiter son effet électroattracteur, ce qui pourrait favoriser la formation de liaison hydrogène entre l'amine de l'hydrazine et un carbonyle d'un acide aminé du site actif du protéasome. De plus, les groupements fluorés augmentent l'hydrophobie et peuvent ainsi stabiliser la formation de feuillet β au sein du site actif. Comme évoqué dans le chapitre 1 le groupement CF_3 peut aussi mimer les chaînes latérales hydrophobes d'acides aminés et occuper une poche accessoire du site actif. Nous avons aussi décidé de synthétiser l'analogue non fluoré dérivé du β -hydrazino acide (C.3) pour évaluer l'apport du groupement trifluorométhyle à la molécule. Par ailleurs, étant donné que les poches S1 et S3 ne sont pas très éloignées, nous souhaitons raccourcir la partie centrale pour permettre aux groupements hydrophobes de nos molécules de les occuper tout en gardant une structure étendue. Pour cette raison, nous avons envisagé de remplacer le β -hydrazino acide par son homologue inférieur l' α -hydrazino acide (C.4). Nous avons aussi proposé l'introduction de pseudoaminoacides contraints : N-aminoaziridine (C.5) et cyclopropanes trifluorométhylés (C.6). La synthèse de ces deux scaffolds contraints est décrite dans la chapitre III mais, ils n'ont pas encore été incorporés dans nos molécules à visée inhibitrice du protéasome. Par conséquent nous n'en parlerons pas dans le chapitre II.

Chapitre II: Synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs du protéasome dérivés de scaffolds α et β hydrazino acides

Partie 4 :

La partie 4 doit contenir un groupement capable d'occuper la poche S1. Dans un premier temps, le résidu phénylalanine (D1) a été gréffé. Sachant que les structures peptidiques sont très facilement dégradées par les protéases, nous souhaitons nous éloigner le plus possible d'une structure peptidique. Pour cette raison, nous avons remplacé ensuite la phénylalanine par la 3,4,5-triméthoxybenzylamine (D2). Nous avons également évalué l'activité inhibitrice des molécules intermédiaires porteuses d'un groupement benzyloxycarbone (D3) et *tert*-butyloxycarbone (D4).

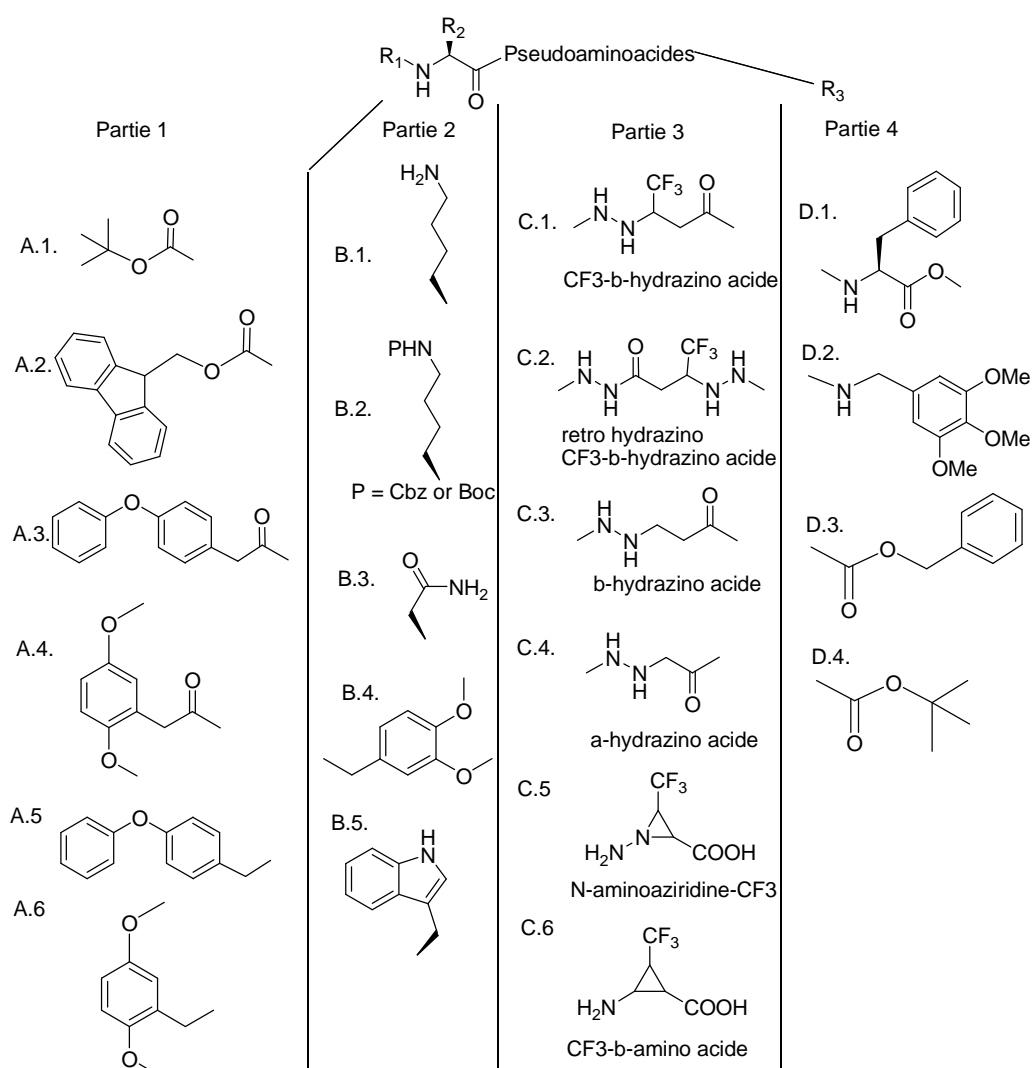


Figure 63: la structure générale de nos molécules et les pharmacomodulations envisagés

Chapitre II: Synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs du protéasome dérivés de scaffolds α et β hydrazino acides

A mon arrivée au laboratoire, un certain nombre de composés portant le motif β -hydrazino acide trifluorométhylé avaient déjà été synthétisés (figure 64).¹⁹⁴⁻¹⁹⁶ J'ai donc poursuivi pendant ma thèse la synthèse des molécules contenant ce motif β -hydrazino acide. J'ai également synthétisé les molécules contenant les motifs α et β -hydrazino acides non fluorés. J'ai ensuite pu établir des relations structure-activité sur l'ensemble des molécules préalablement synthétisées et celles préparées par moi-même qui seront présentées dans la partie 3 de ce chapitre.

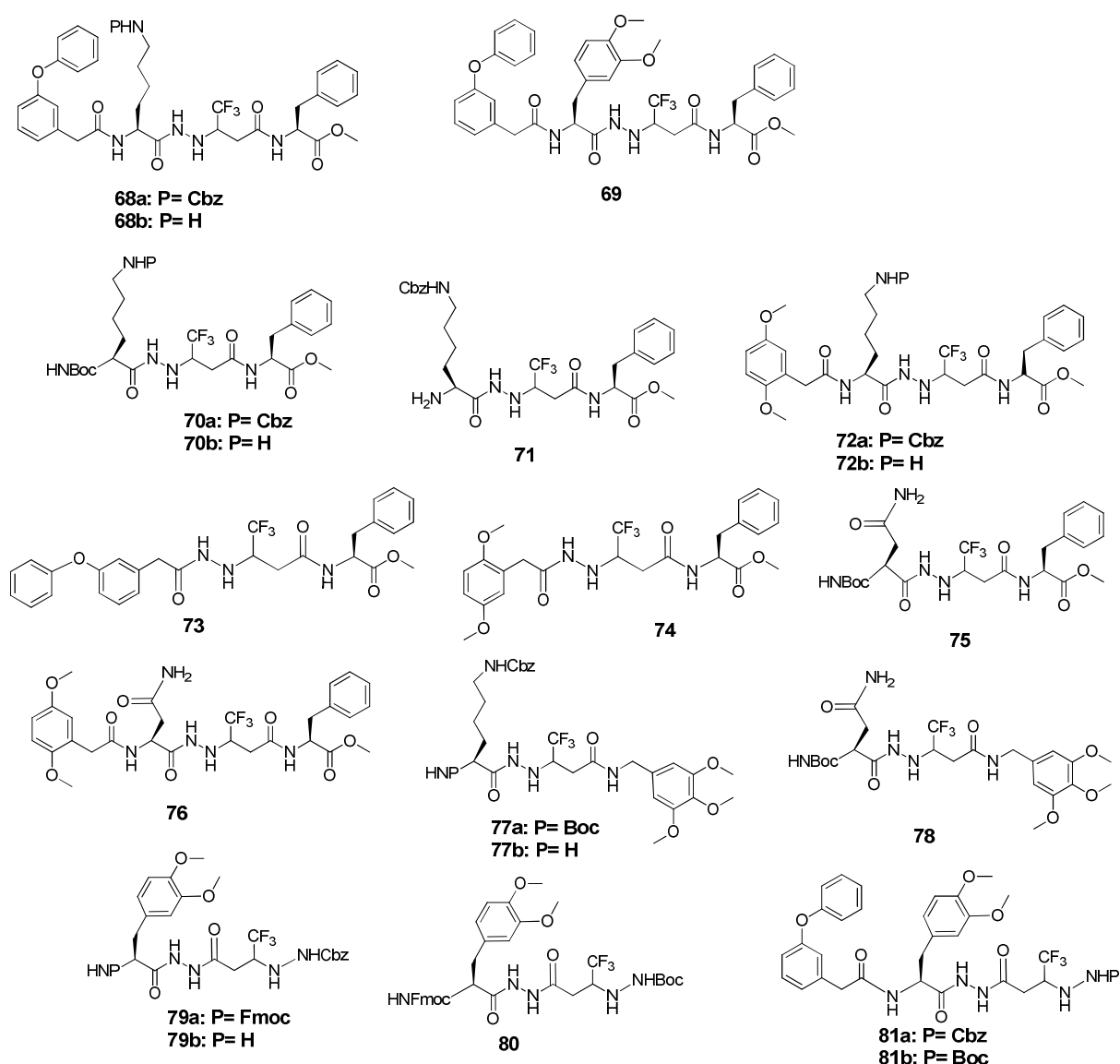


Figure 64: structures des molécules préalablement synthétisées au laboratoire

II. Synthèse:

II.1. Synthèse d'analogues β -hydrazino acides trifluorométhylés:

La synthèse du composé **77b** est décrite dans le schéma 1. La synthèse débute par la réduction de la fonction cétone du 4,4,4-trifluoro-3-oxobutanoate d'éthyle **82** par NaBH_4 suivie d'une déshydratation par P_2O_5 pour donner trifluorocrotonate d'éthyle **84** (produit commercial) avec un rendement de 57% pour les deux étapes. Le composé **85** est obtenu par addition de Michael du carbazate de tertbutyle sur le composé **84** avec un bon rendement (90%). La saponification de l'ester éthylique du composé **85** conduit avec un bon rendement (95%) à l'acide **86** qui est couplé à la 3,4,5-triméthoxybenzylamine **87** à l'aide des agents de couplage HBTU et HOBt en présence de DIPEA dans la DMF pour conduire au composé **88** avec un bon rendement (79%). Le clivage acide du groupement Boc de **88** par le TFA donne **89**. Le couplage entre ce dernier et la Boc-Lys (Z)-OH donne le composé **77a** avec un rendement moyen (45%). A partir de **77a**, nous avons obtenu l'intermédiaire **77b** avec un rendement quantitatif après clivage acide du groupement Boc.

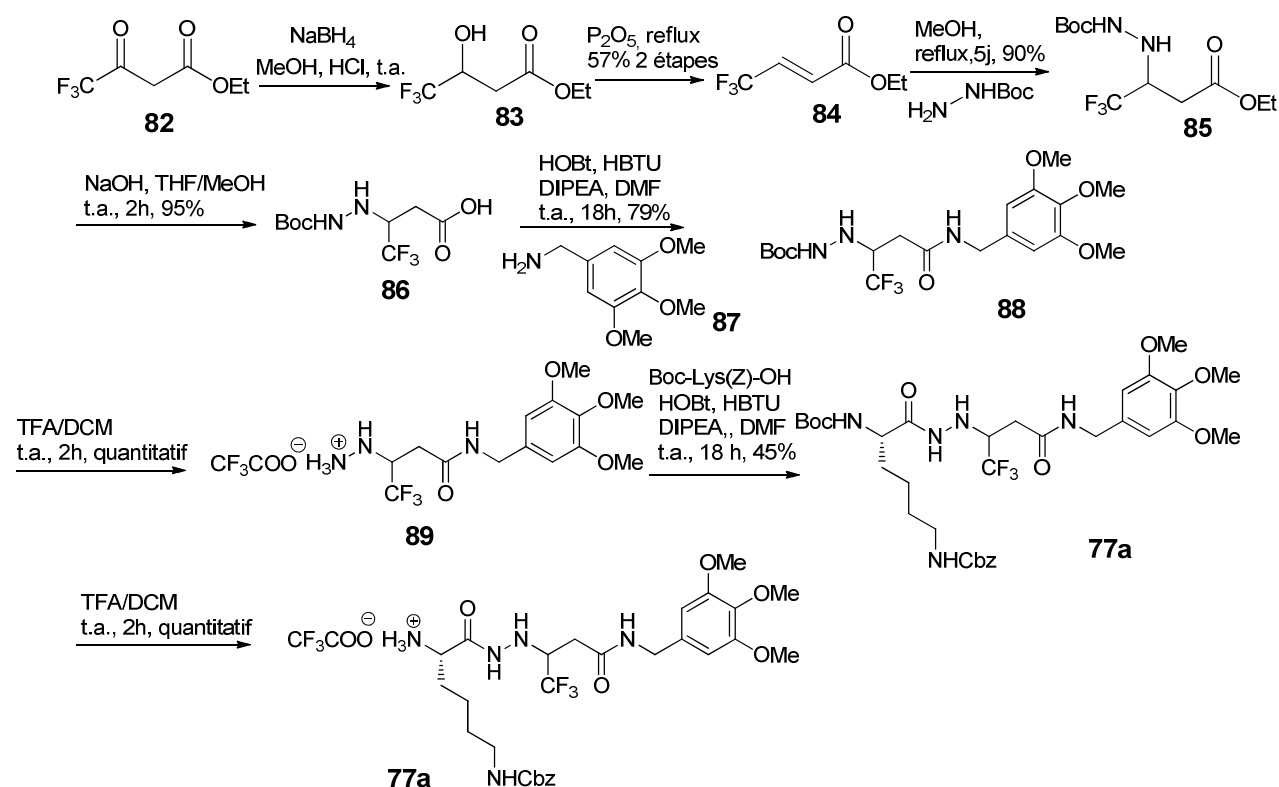


Schéma 1: synthèse des composés **77a** et **77b**

Le composé **91a** est obtenu avec un rendement satisfaisant (57%) par couplage de l'intermédiaire **77b** avec l'acide 2,5-méthoxyphénylacétique **90** en utilisant toujours les mêmes agents de couplage à savoir HBTU et HOBT en présence de DIPEA (Schéma 2). Le produit **91b** est obtenu avec un rendement satisfaisant (75%) après hydrogénéolyse du groupement Cbz (Schéma 2).

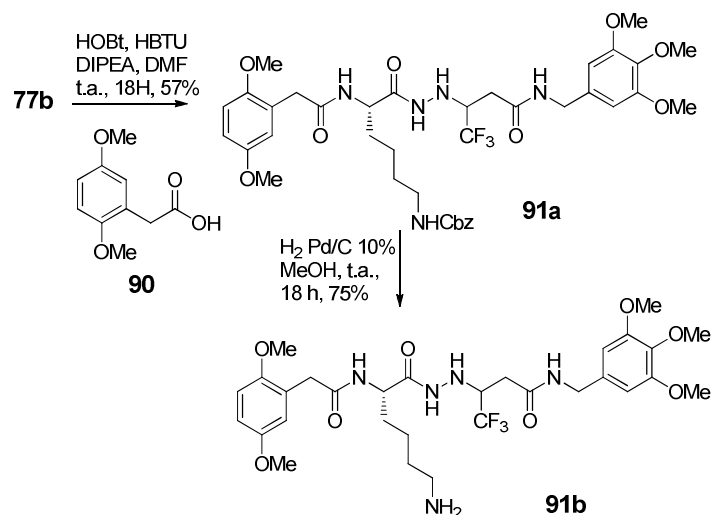


Schéma 2: synthèse des composés **91a** et **91b**

Le produit **93a** est également obtenu avec un bon rendement (71%) après un couplage entre l'acide 3-phénoxyphénylacétique **92** et l'intermédiaire **77b**. Ce produit a ensuite subi une hydrogénéolyse du groupement Cbz pour donner le produit **93b** avec un bon rendement (89%) (schéma 3).

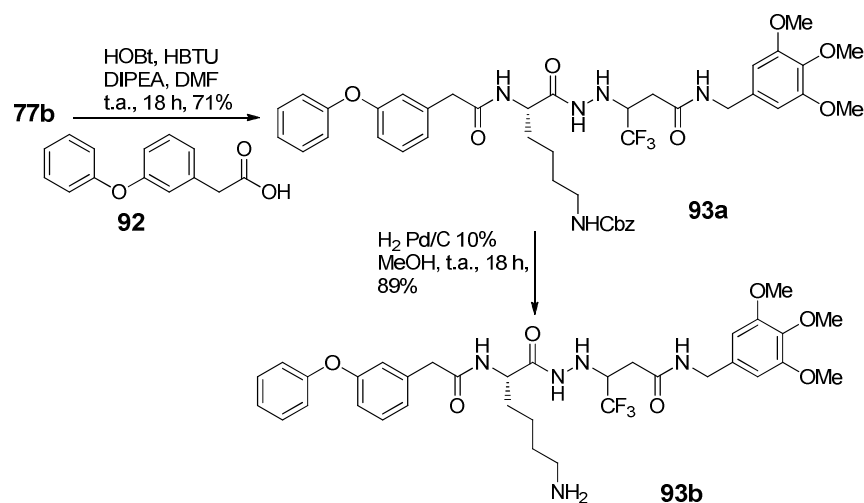


Schéma 3: synthèse des composés **93a** et **93b**

les composés **91a-b** et **93b** sont obtenus sous forme d'un mélange de deux diastéréoisomères en proportion équivalente (50 : 50) non séparables par chromatographie sur gel de silice. Par conséquent c'est le mélange de deux diastéréoisomères de chaque composé qui est testé pour sa capacité à inhiber le site CT-L du protéasome 20S de lapin. En revanche, j'ai resynthétisé la molécule **68b** (figure 64) préparée antérieurement dans le laboratoire et séparé les deux diastéréoisomères par HPLC afin de les tester séparément et d'évaluer l'éventuelle influence de la stéréochimie de la carbone portant le groupement CF_3 sur l'inhibition du protéasome.

II.2. Synthèse d'analogues non fluorés β -hydrazino acides:

II.2.a. analogues β -hydrazino acides non fluorés avec la phénylalanine sur la partie 4 :

Comme évoqué précédemment dans les objectifs généraux nous avons décidé de synthétiser les molécules analogues non fluorés contenant le motif β -hydrazino acide afin d'évaluer l'apport du groupement trifluorométhyle.

La synthèse du composé **101b** est décrite dans le schéma 4. La synthèse commence par la substitution nucléophile du carbazate de tertbutyle sur le 3-bromopropionate d'éthyle **94** dans le toluène anhydre en présence de DIPEA. On obtient le produit **95** avec un rendement moyen de 56%. Ce rendement est expliqué par une 2^{ème} substitution nucléophile par l'amine secondaire de **95** sur le 3-bromopropionate d'éthyle. Après saponification de l'ester éthylique de **95**, l'acide **96** obtenu est couplé à l'ester méthylique de la L-phénylalanine en utilisant HBTU et HOBt dans la DMF en présence de la DIPEA pour donner le produit **97** avec un bon rendement (76%). Le clivage acide du groupement protecteur Boc par le TFA dans le DCM donne le produit **98** qui est couplé avec la Boc-lys(Z)-OH dans les mêmes conditions décrites précédemment pour donner le produit **99** avec un faible rendement (36%). Le clivage du groupement Boc en milieu acide du produit **99** donne l'intermédiaire **100**. Le couplage de cet intermédiaire avec l'acide 3-phénoxyphénylacétique en présence d'HBTU et d'HOBt comme agents de couplage donne le composé **101a** avec un assez bon rendement (58%). Le composé **101b** est obtenu après hydrogénéolyse du groupement Cbz (H_2 en présence de Pd/C 10%) avec un rendement de 89%.

Chapitre II: Synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs du protéasome dérivés de scaffolds α et β hydrazino acides

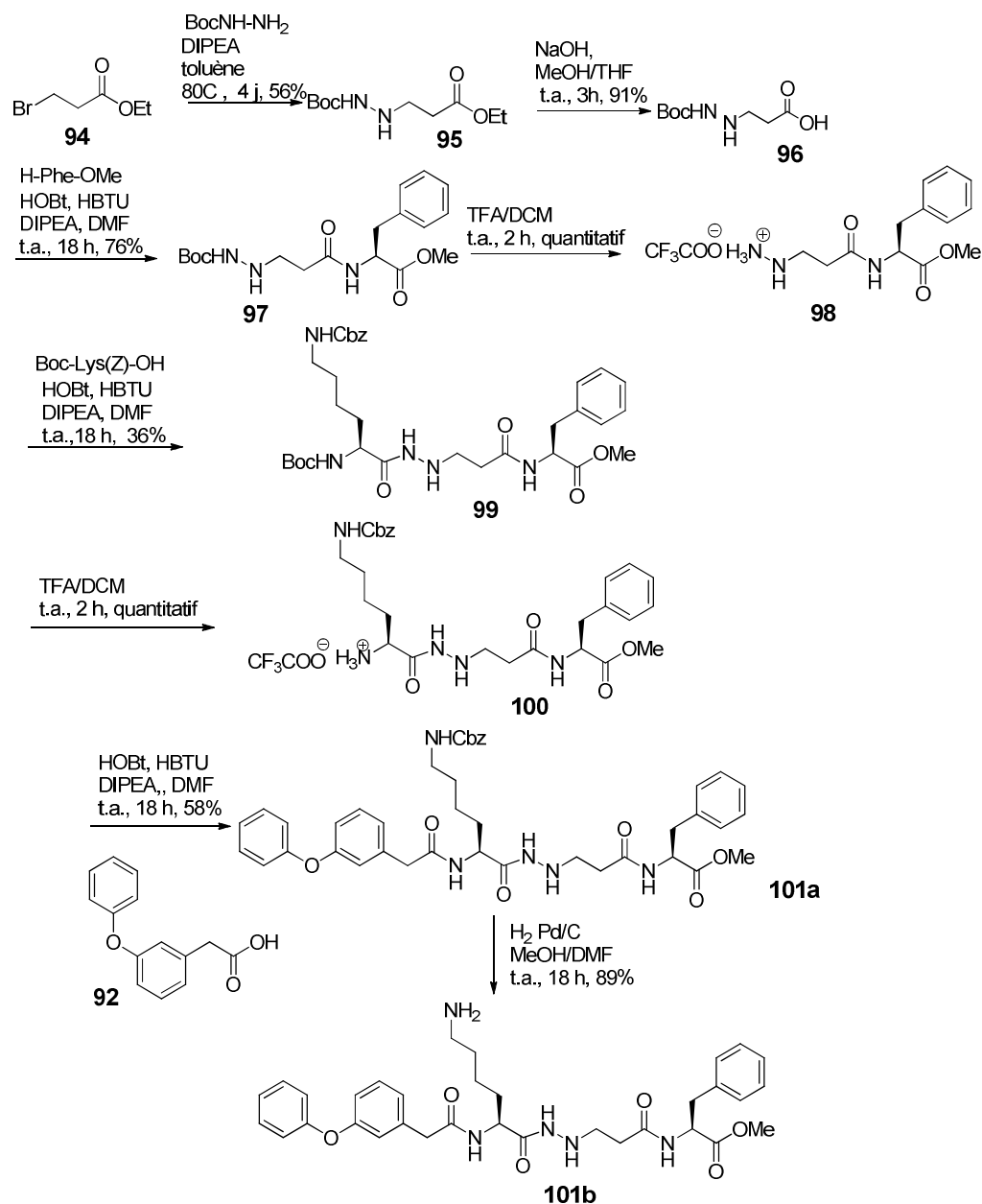


Schéma 4: synthèse des composés **101a** et **101b**

Le composé **102a** est obtenu par couplage de l'intermédiaire **100** avec l'acide 2,5-diméthoxyphénylacétique. La purification sur colonne de silice nous permet d'isoler deux produits distincts : le composé **102a** (rendement : 38%) et un autre produit **103** qui résulte du couplage entre l'amine secondaire de l'hydrazine et l'acide 2,5-méthoxyphénylacétique avec un rendement de 20%. Ceci expliquerait le faible rendement de cette réaction (38%). Le

clivage du Cbz de **102a** par une hydrogénation catalytique dans un mélange MeOH/DMF donne le composé **102b** avec un rendement de 70% (schéma 5).

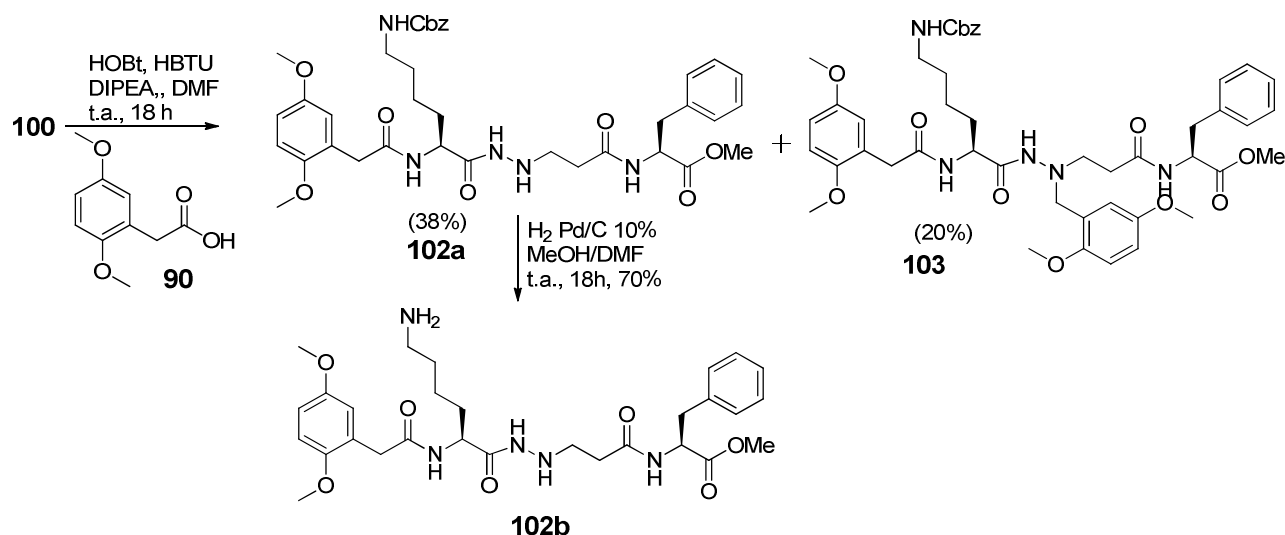


Schéma 5: synthèse des composés **102a** et **102b**

II.2.b. analogues β -hydrazinoacide non fluorés avec la 3,4,5-triméthoxybenzylamine sur la partie 4 :

La synthèse des composés **108a** et **108b** est décrite dans le schéma 6. Le couplage peptidique entre l'intermédiaire acide **96** et la 3,4,5-triméthoxybenzylamine **87** conduit au produit **104** avec un rendement moyen (52%). Le clivage acide du groupement Boc par traitement de **104** avec du TFA suivi du couplage peptide avec la Fmoc-Lys(Boc)-OH donne le produit **106**, un produit intermédiaire qui sera testé (nous ne sommes pas partis de la Boc-Lys(Z)-OH en raison d'un problème d'approvisionnement de ce composé. La molécule cible **108b** étant totalement déprotégée, le problème de groupement protecteur ne se posait donc pas). La déprotection de l'amine α du composé en présence de 10% de pipéridine dans le DMF donne l'intermédiaire amine **107**. La formation de la liaison amide entre **107** et l'acide 2,5-diméthoxyphénylacétique conduit au produit **108a**. Le pseudopeptide final **108b** est obtenu après traitement acide du composé **108a** avec un rendement quantitatif (schéma 6).

Chapitre II: Synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs du protéasome dérivés de scaffolds α et β hydrazino acides

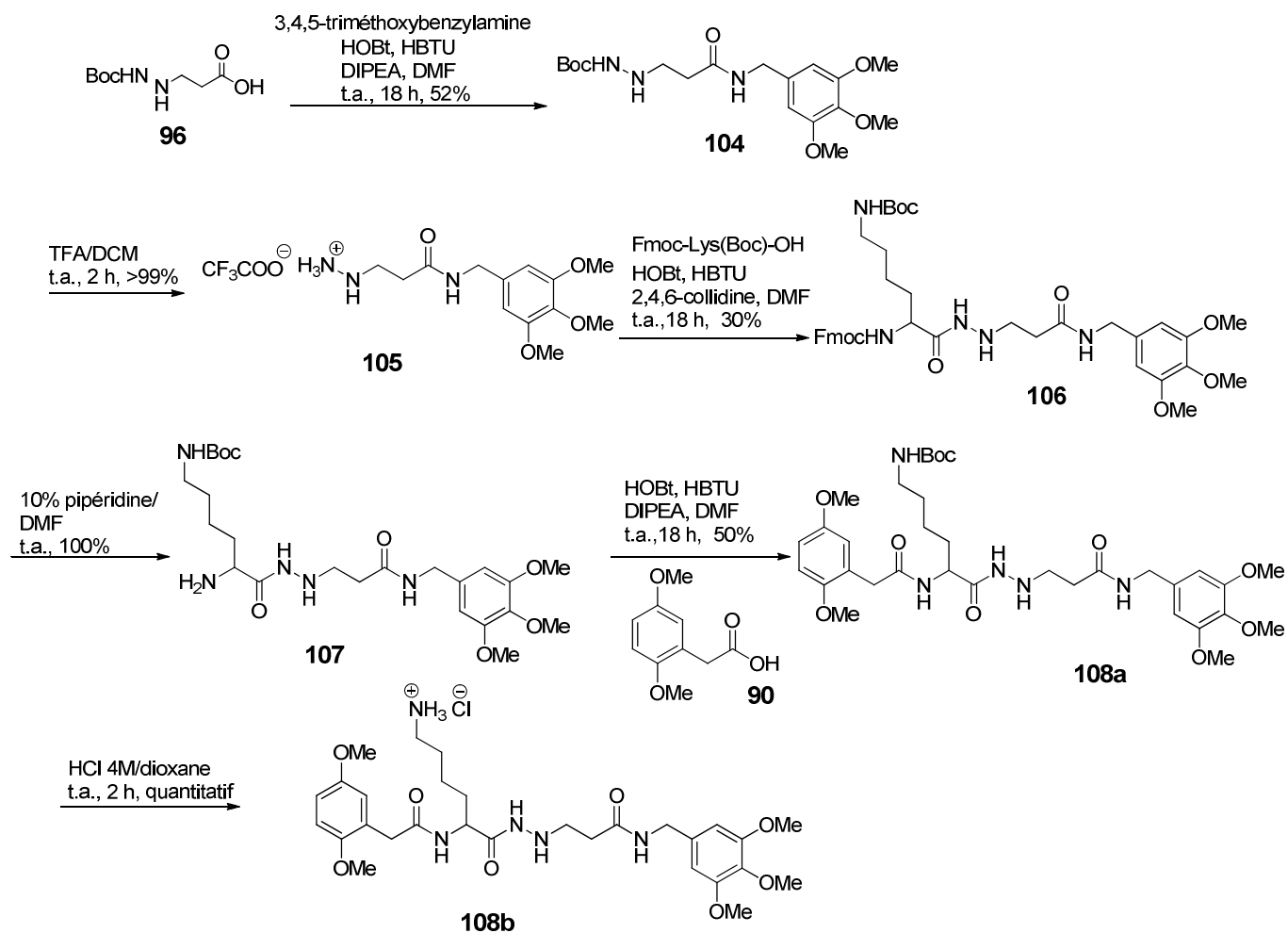


Schéma 6 : synthèse des composés **108a** et **108b**

L'un des composés finaux **109a** est obtenu par couplage entre l'intermédiaire **107** et l'acide 3-phénoxyphénylacétique avec un rendement moyen de 52%. Le clivage du Boc de l'amine ϵ de la lysine en présence de HCl 4M dans le dioxane donne le composé final **109b** avec un rendement quantitatif (schéma 7).

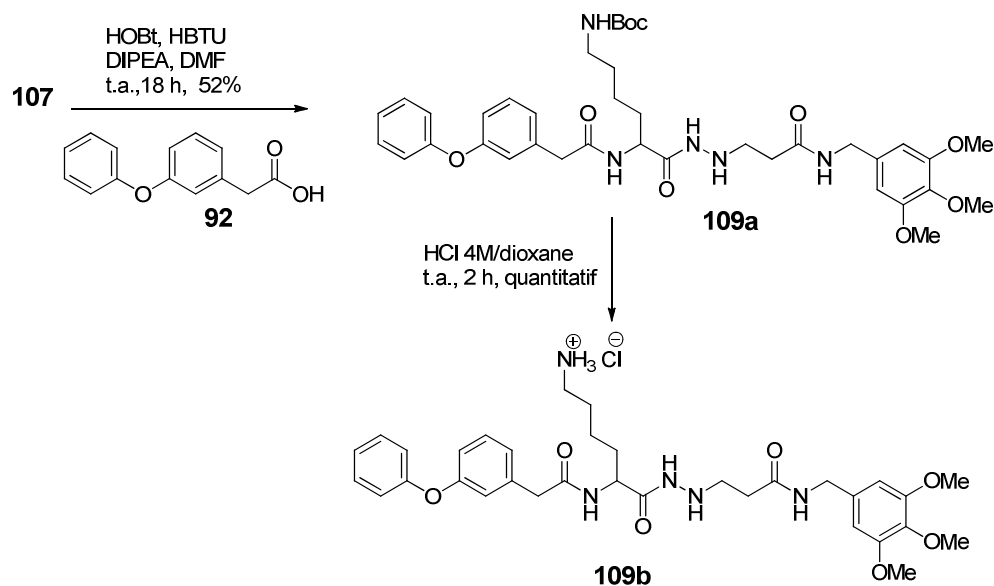


Schéma 7 : synthèse des composés **109a** et **109b**

II.2.c. analogues β -hydrazinoacide non fluorés avec la liaison amine sur la partie 1

Comme évoqué dans mes objectifs, nous essayons de vérifier si la flexibilité de la partie 1 pourrait améliorer l'activité. Par conséquent, nous souhaitons remplacer la fonction amide de la partie 1 par une fonction amine plus flexible. Pour réaliser cette réaction d'amination, nous avons deux possibilités : la première étant une réaction de substitution nucléophile d'une amine sur un halogénure d'alkyle et la deuxième une amination réductrice. Nous avons donc décidé de tester les deux méthodes sur une réaction modèle mettant en jeu l'amine et le H-Phe-OMe avant d'engager notre peptidomimétique :

Essais 1 (schéma 8) : la réduction de la 2,5-diméthoxybenzaldéhyde **110** commercial par NaBH_4 conduit à l'alcool **111** qui est transformé en produit bromé **112** en présence de PBr_3 dans le DCM. La substitution du brome par l'amine de l'ester méthylique de la L-phénylalanine conduit au produit **113** avec un rendement moyen de 48%.

Essai 2 (schéma 9) : nous avons essayé d'effectuer une amination réductrice entre l'amine libre de l'ester méthylique de la L-phénylalanine et la 2,5-diméthoxybenzaldéhyde **110**. Pour réaliser cette réaction nous avons d'abord pensé à isoler l'imine **114** formée lors de la première étape et de la réduire par la suite par NaBH_4 . Malheureusement nous n'avons

obtenu qu'une trace du produit attendu et récupéré le produit de départ. Nous avons donc décidé de réaliser l'étape de réduction sans isoler l'imine et en ajoutant rapidement l'agent réducteur après la formation de l'imine. La première fois nous avons utilisé le $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ comme agent réducteur. La réaction ayant encore échoué (produit de départ), nous avons décidé de changer d'agent réducteur en utilisant cette fois le NaBH_3CN en présence d'acide acétique. Nous avons obtenu l'amine **113** désirée avec un rendement de 71%. Au vu de ces deux essais, l'amination réductrice s'est avérée plus efficace (71% de rendement pour une étape) que la substitution nucléophile (27% pour 3 étapes) pour obtenir l'amine désirée **113**. A partir de l'aldéhyde **110** Nous avons donc choisi l'amination réductrice pour synthétiser les molécules cibles **117b** et **118b** portant l'amine sur la partie 1.

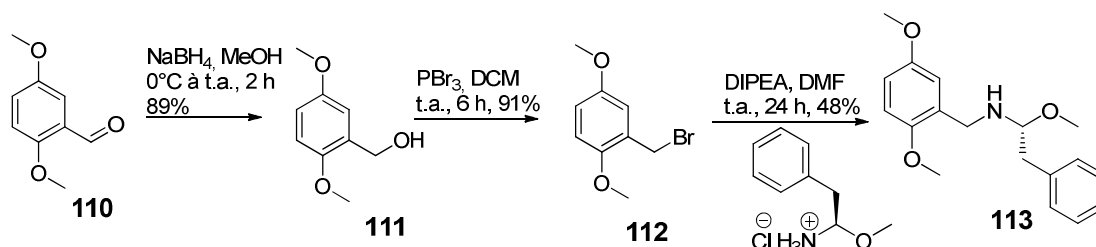


Schéma 8 : essai d'amination par substitution

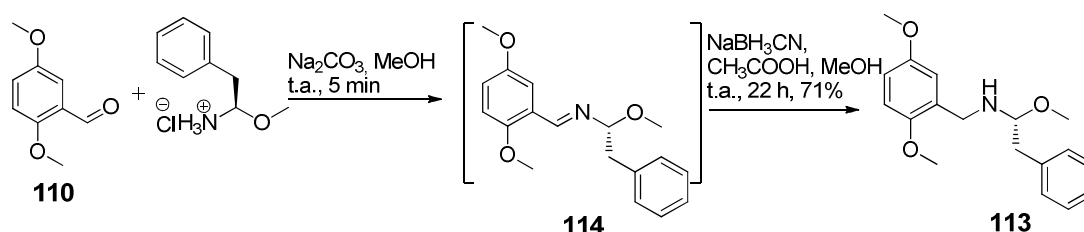


Schéma 9: essai d'amination par amination réductrice

L'application de cette réaction d'amination réductrice à l'intermédiaire **100** n'a pas marché, et on n'obtient qu'une trace de produit attendu. Nous avons émis l'hypothèse que l'azote secondaire de l'hydrazine pourrait réagir lors de la réaction d'amination réductrice (comme précédemment lors des réactions de couplage peptidique, composé **103**). Par conséquent cette amine a été protégée à partir du composé **99** par le groupement benzoyle en présence de pyridine pour donner le composé **115** avec un très bon rendement (84%). L'amine **116** obtenue après le clivage acide du groupement Boc est mise en réaction avec le 3-phénoxybenzaldéhyde et le 2,5-diméthoxybenzaldéhyde en présence de NaBH_3CN et d'acide

Chapitre II: Synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs du protéasome dérivés de scaffolds α et β hydrazino acides

acétique pour donner **117a** et **118a** respectivement avec un assez bon rendement pour **117a** (58%) et rendement moyen pour **118a** (42%). L'hydrogénolyse des groupements Cbz des composés **117a** et **118a** a conduit aux produits finaux **117b** et **118b** respectivement, avec de bons rendements (91% et 86% respectivement) (schéma 10).

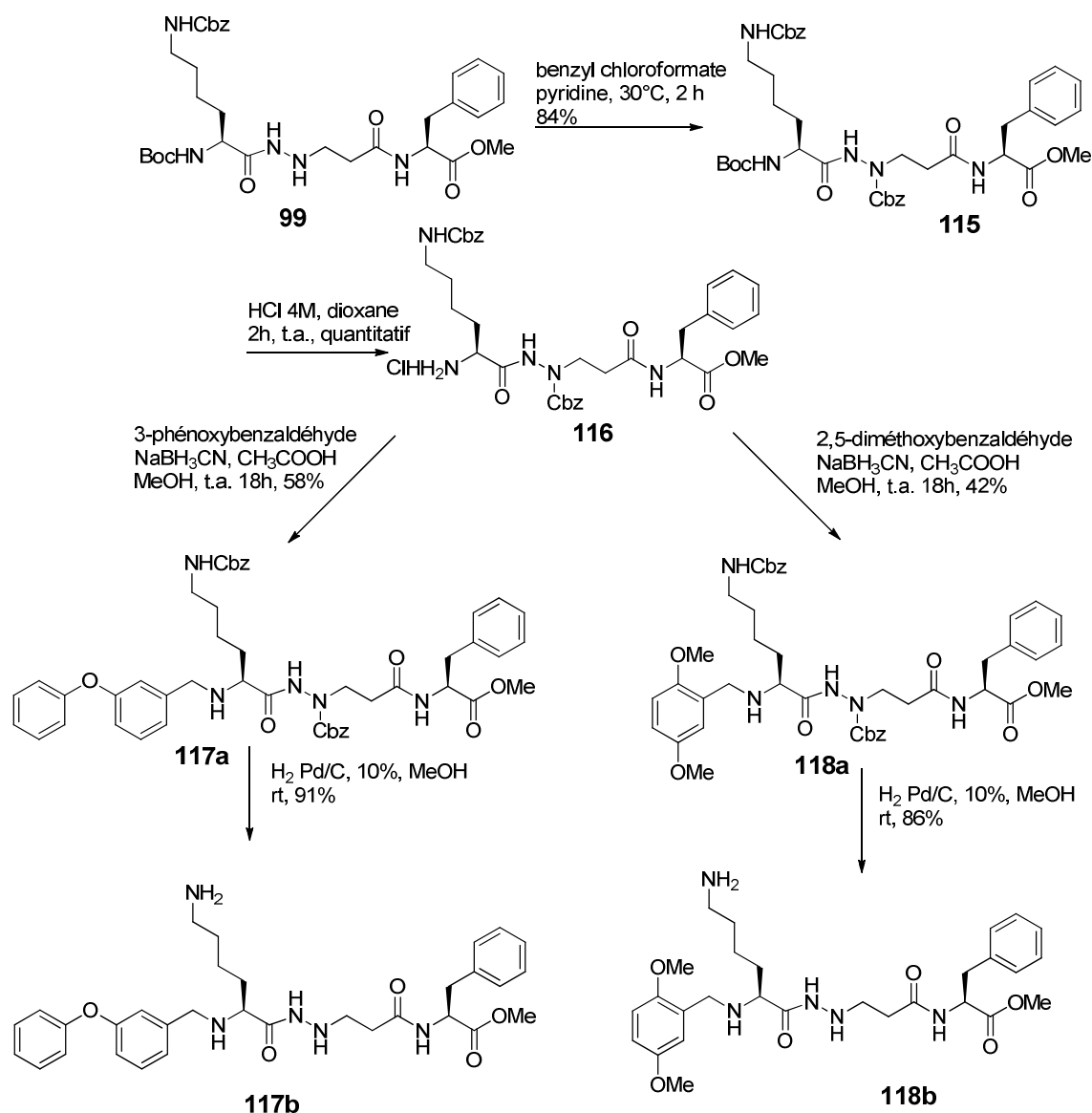


Schéma 10 : synthèse des composés **117b** et **118b**

II.3. Synthèse d'analogues α -hydrazino acides

II.3.a analogues α -hydrazinoacides avec la lysine sur la partie 2:

Comme décrit dans les objectifs (page 60), nous avons aussi envisagé de synthétiser des analogues plus courts de la partie 3 en remplaçant le motif β -hydrazino acide par l'analogue α -hydrazino acide. Cette synthèse commence par le couplage entre la Boc-Lys(Z)-OH et l'hydrochlorure d'hydrazinoacétate d'éthyle **119** commercial en utilisant HBTU et HOBt comme réactifs de couplage en présence de DIPEA dans la DMF pour donner le produit **120** avec un bon rendement de 76%. Après saponification de l'ester éthylique du composé **120**, l'acide **121** obtenu est couplé avec l'ester méthylique de la L-phénylalanine pour donner le composé **122**. La déprotection de l'amine en position α par clivage acide du groupement Boc a conduit à l'intermédiaire **123** (schéma 11).

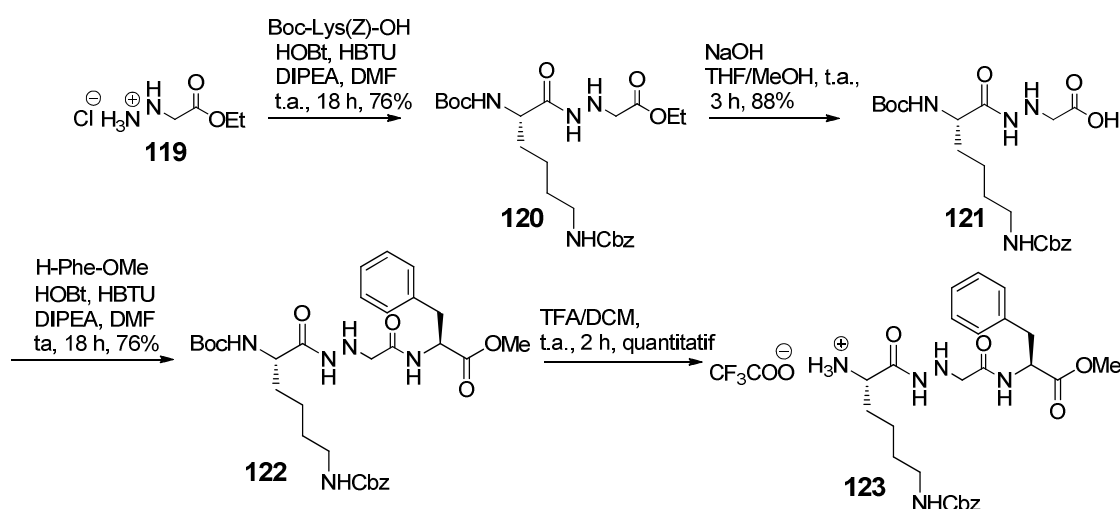


Schéma 11 : synthèse de l'intermédiaire **123**

L'intermédiaire **123** est divisé en deux pour effectuer deux couplages : un avec l'acide 2,5-méthoxyphénylacétique et l'autre avec l'acide 3-phénoxyphénylacétique pour donner respectivement les composés **124a** et **125a** avec des rendements moyens (55% et 48% respectivement). L'hydrogénolyse des groupements CBz des deux composés donne les composés finaux **124b** et **125b** avec d'excellents rendements (97% et 98% respectivement) (schéma 12).

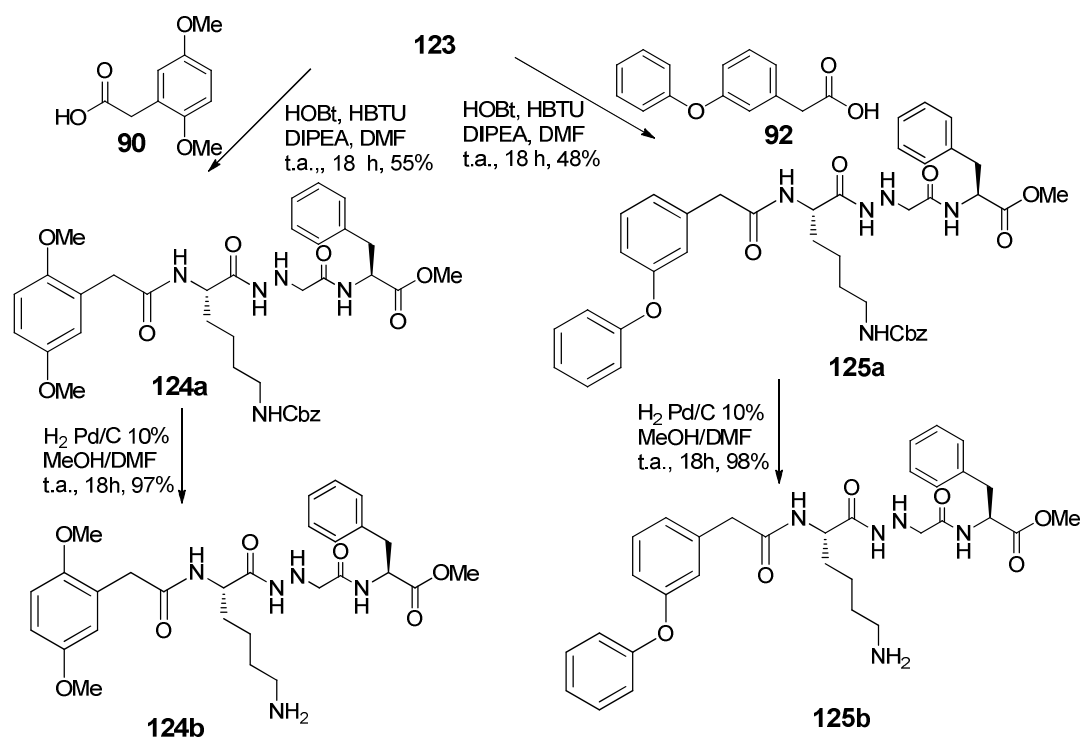


Schéma 12: synthèse des composés **124a** à **125b**

II.3.b. analogues α -hydrazinoacides avec le tryptophane sur la partie 2:

Comme évoqué dans l'introduction, un groupement encombrant tel que le tryptophane dans la partie 2 pourrait également permettre une bonne occupation de la poche S3. Nous avons dans un premier temps repris la stratégie de synthèse décrite précédemment avec les analogues α -hydrazino acides avec la lysine sur la partie 2. La synthèse du composé **134** a donc commencé par le couplage entre le Z-Trp-OH et l'hydrochlorure d'hydrazinoacétate d'éthyle **119** en utilisant HBTU et HOBt comme réactifs de couplage en présence de DIPEA dans la DMF pour donner le composé **126** avec un très bon rendement (84%) (schéma 13). Malheureusement l'étape de saponification de l'ester éthylique en présence de solution aqueuse de NaOH n'a pas conduit au produit attendu mais à un mélange de plusieurs produits. La réaction a été reproduite mais cette fois en utilisant une solution aqueuse de LiOH (base plus douce que NaOH), le produit **127** est obtenu mais avec un faible rendement de 30%. Nous avons jugé ce rendement trop faible pour une réaction de saponification surtout que, le produit obtenu n'était pas propre. Nous avons donc décidé de changer de stratégie.

Chapitre II: Synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs du protéasome dérivés de scaffolds α et β hydrazino acides

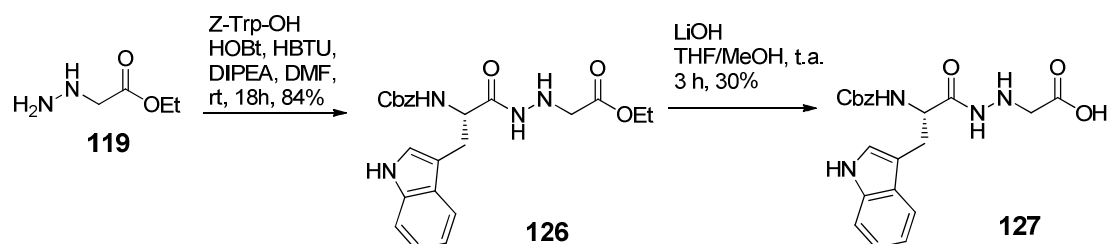


Schéma 13 : première voie envisagée pour la synthèse du **134**

Cette nouvelle stratégie débute par la protection de l'amine primaire de l'hydrazine **119** par le groupement protecteur Boc pour donner le composé **128** avec un bon rendement (70%). La fonction ester de **128** est ensuite saponifiée pour conduire à l'acide **129** avec un rendement moyen (51%). Le couplage peptidique entre l'acide **129** et la H-Phe-OMe en présence de HOBT, HBTU et DIPEA dans le DMF suivi du clivage acide du groupement Boc a conduit à l'amine **131**. Cette dernière est couplée avec la Z-Trp-OH dans les mêmes conditions que précédemment décrites pour conduire à **132** un rendement de moyen (53%). Le produit final **134** est obtenu avec un rendement de 48% par couplage entre l'amine issue de l'hydrogénolyse du groupement Cbz de **133** et l'acide 3-phénoxyphénylacétique (schéma 14).

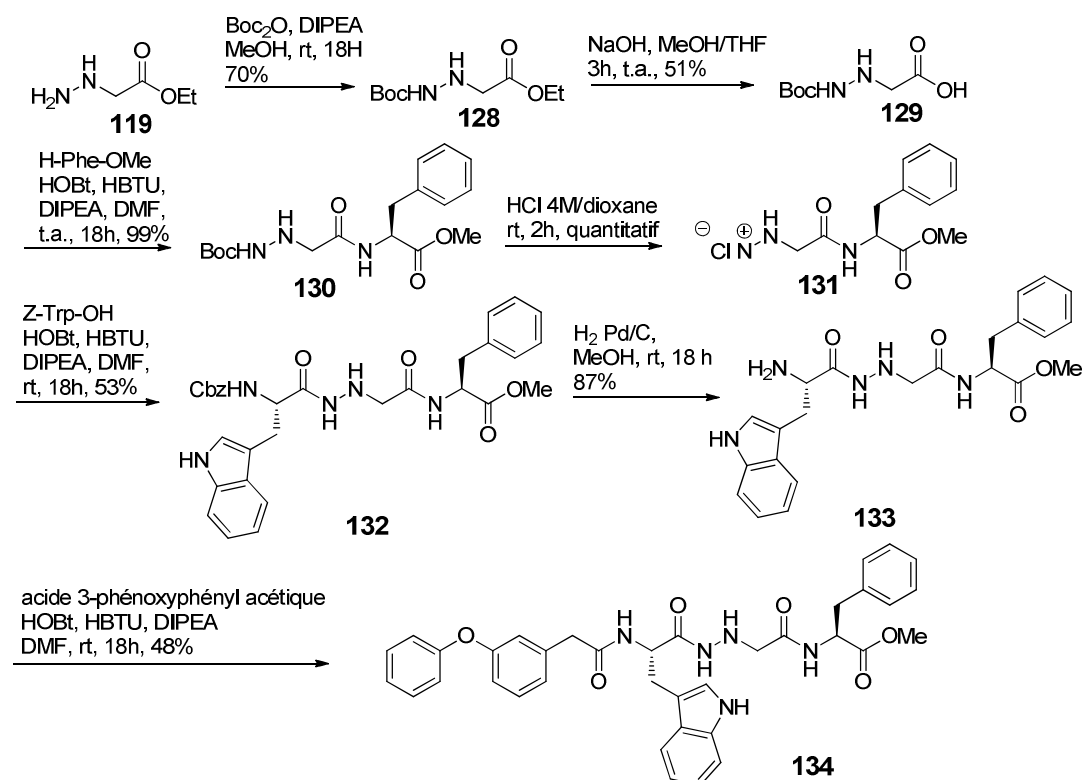


Schéma 14 : synthèse du produit final **134**

III. Résultats de l'évaluation biologique:

L'évaluation biologique des inhibiteurs potentiels est effectuée sur le protéasome 20S du lapin en collaboration avec l'équipe du Pr Reboud-Ravaux (laboratoire d'enzymologie moléculaire et fonctionnelle, UPMC). Pour réaliser ce test, trois substrats sont utilisés en fonction du site actif: Suc-LLVY-AMC (Suc= succinyl, AMC= aminoethylcoumaride) pour le site chymotrypsine (CT-L), Boc-LRR-AMC pour le site trypsine et Z-LLE- β -NA (Z= benzyloxycarbonyl, β -NA= β -naphthylamine) pour le site caspase ou post-acide (PA).^{112, 106} L'inhibiteur du protéasome MG132 (Z-LLL-H) est utilisé comme témoin pour les 3 sites.

Ces substrats ont la particularité d'émettre une fluorescence lorsqu'ils sont clivés par le protéasome, ce qui veut dire qu'ils se sont placés dans leur site actif respectif. Par conséquent, le test consiste à incuber le protéasome 20S du lapin avec ou sans (test contrôle) les molécules à tester pendant 15 min: c'est la préincubation, qui permet à l'inhibiteur de se fixer au protéasome s'il y a affinité. Les molécules à tester sont préalablement dilués dans le DMSO avec une quantité finale de DMSO à 3% v/v. Le substrat fluorescent correspondant au site actif dont on veut mesurer l'activité est ensuite rajouté. Le mélange est par la suite incubé à 37°C pendant 45 min. La fluorescence émise est mesurée par un appareil de fluorescence avec lecteur de microplaque à 96 puits. Les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission pour les substrats Succ-LLVY-AMC et Boc-LRR-AMC (spécifiques des sites CT-L et T-L respectivement) sont de 360 et 460 nm tandis que, celles du substrat Z-LLE- β -NA spécifique du site PA sont de 340 et 405 nm. Les tampons (pH 7,5) utilisés lors des tests sont 20 mM Tris, 1 mM DTT, 10% glycerol, 0.02% (w/v) SDS pour les sites CT-L et PA; 20 mM Tris, 1 mM DTT, 10% glycerol pour le site T-L. La concentration finale de DMSO est de 3% v/v et l'expérience témoin sans inhibiteur est réalisée avec la même quantité de DMSO.

L' IC_{50} (concentration donnant 50% d'inhibition) est déterminée en traçant la courbe du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'inhibiteur grâce à l'équation: % inhibition = $100[I]/(IC_{50}^{n_H} + [I]^{n_H})$, ou l'équation: % inhibition = $100[I]^{n_H} / (IC_{50}^{n_H} + [I]^{n_H})$ ou n_H est le « Hill number ». Les valeurs de la constante de Michaelis (K_m) des substrats fluorescents dans nos conditions sont: $30 \pm 5 \mu M$ (Suc-LLVY-AMC), $77 \pm 4 \mu M$ (Z-LLE- β -NA) et $26 \pm 6 \mu M$ (Boc-LRR-AMC). Un exemple de courbe obtenue avec un inhibiteur (18b) est donné sur la figure 65.

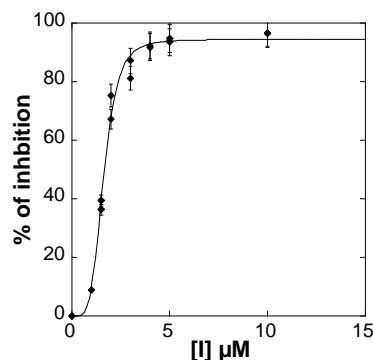


Figure 65 : Inhibition du site CT-L du protéasome 20S de lapin par le composé **42b** à pH 7,5 et à 37°C.

Les résultats de l'évaluation biologique de nos composés sur le protéasome 20S du lapin sont consignés dans les tableaux 8, 9 et 10. Dans un premier temps, les molécules ont été testées sur le site CT-L. Concernant les molécules dont *la partie 3* est occupée par le **motif β -hydrazino acide trifluorométhylé** (molécules **68a** à **93b**, table 8), les résultats montrent que :

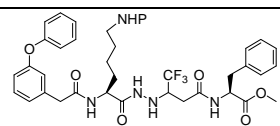
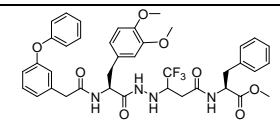
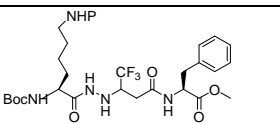
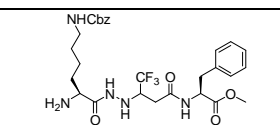
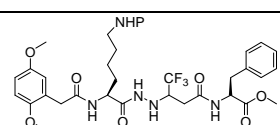
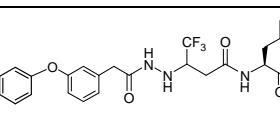
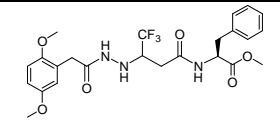
- i) Les composés ayant le groupement 3-phénoxyphénylacétyle sur *la partie 1* sont légèrement plus efficaces que ceux ayant les groupements 2,5-diméthoxyphénylacétyle ou *tert*-butyloxycarbonyle (molécule **68b** comparée à **70b** et **72b** et **93b** comparée à **91b**). On remarque aussi qu'une bonne activité inhibitrice est obtenue avec les composés dont la partie 1 est supprimée et dont l'amine en α de la lysine est libre et que celle en ϵ est protégée par le groupement Cbz (molécules **71** et **77b**).
- ii) Sur *la partie 2* du pseudoaminoacide, la lysine est plus favorable à l'activité l'inhibitrice que la 3,4-diméthoxyphénylalanine (molécules **68b** et **70b** comparées à **69**). La protection de l'amine en ϵ de la lysine entraîne une suppression ou une diminution de l'activité (molécule **68a**, **70a** et **72a** comparées **68b**, **70b**, et **72b**). Le remplacement de la lysine par l'asparagine est totalement délétère pour l'activité inhibitrice (molécules **75** et **76** comparées à **70b** et **72b**). Les résultats montrent aussi que le raccourcissement du pseudopeptide par suppression de la partie 2 en liant directement les groupements 3-phénoxyphénylacétyle et 2,5-

Chapitre II: Synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs du protéasome dérivés de scaffolds α et β hydrazino acides

diméthoxyphénylacétyle sur le motif β -hydrazino acide supprime toute activité inhibitrice (molécules **73** et **74**).

iii) Par ailleurs, l'inversion du sens du motif β -hydrazino acide et l'augmentation de la longueur de *la partie 3* par introduction d'un motif rétro CF₃- β -hydrazino acide entraînent une suppression totale de l'activité inhibitrice (molécules **79a**, **79b**, **80**, **81a** et **81b**), voir une augmentation de l'activité CT-L (x 3,6 pour **79a**).

iv) Enfin sur *la partie 4*, l'introduction de la 3,4,5-triméthoxybenzylamine à la place de la phénylalanine ne modifie pas ou peu l'activité inhibitrice des molécules. Il est donc possible de diminuer le caractère peptidique sans affecter le potentiel d'inhibition du site CT-L (molécules **93b**, **91b**, **77b** comparées à **69b**, **71**, **72b**).

molécules	Structure	CT-L
68a (P= CBz)		<i>ni</i>
68b (P=H) racemic		1.6 ± 0.1
68c (P=H) Dia 1 ^{a)}		8.5
68b (P=H) Dia 2 ^{a)}		5.6
69		85 ± 1.5
70a (P= CBz)		<i>ni</i>
70b (P=H)		35.3 ± 2.7
71		6.0 ± 0.5
72a (P= CBz)		30%
72b (P=H)		8.6 ± 0.3
73		x 2
74		<i>ni</i>

Chapitre II: Synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs du protéasome dérivés de scaffolds α et β hydrazino acides

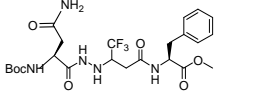
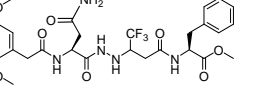
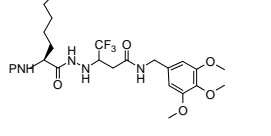
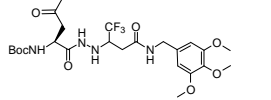
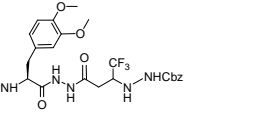
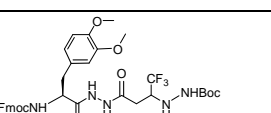
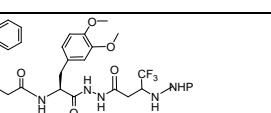
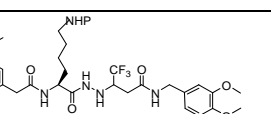
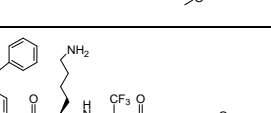
75		30%
76		ni
77a (P= Boc) 77b (P=H)		35% 10.1 ± 0.4
78		ni
79a (P= Fmoc) 79b (P=H)		x 3.6 ni
80		ni
81a (P= Cbz) 82b (P=Boc)		ni ni
91a (P= CBz) 91b (P=H)		ni 97 ± 3
93b		6.2

Tableau 8 : structure et activité inhibitrice des molécules contenant le motif β -hydrazino acide trifluorométhylé sur le site CT-L du protéasome de lapin.

ni : molécule non inhibitrice

% : % d'inhibition à 100 μ M

x 3,6 : activation de l'activité de 3,6 fois à une concentration de 100 μ M d'inhibiteur

En ce qui concerne les molécules avec le **motif β -hydrazino acide non fluoré** sur *la partie 3*, des relations structure-activité similaires à celles décrites précédemment sont observées (molécules **99** à **118b** table 9). Sur *la partie 1*, une légère augmentation de l'activité inhibitrice lorsqu'on a le groupement phénoxyphénylacétyle à la place des groupements 2,5-diméthoxyphénylacétyle, *tert*-butuloxycarbone et 9-fluorénylméthoxycarbone est observée (molécule **101a** comparée à **99** et **102a** et molécule **109a** comparée à **106** et **108a**). Dans le composé **100** où l'amine en α de la lysine est libre et celle en ϵ est protégée par le groupement Cbz, une bonne activité inhibitrice est observée. La même observation avait été faite dans la série des molécules fluorées (table 8). L'augmentation de la flexibilité par remplacement de la liaison amide par une liaison amine (molécules **117b** et **118b**) dans la *partie 1* n'a pas permis une nette amélioration d'activité mais on maintient une bonne IC₅₀. Comme la lysine sur *la partie 2* dans la série des pseudopeptides fluorés était bénéfique pour l'activité inhibitrice, nous l'avons gardé dans la série des non fluorées. En revanche, dans cette série, l'activité inhibitrice du site CT-L n'est pas affectée par la protection de l'amine ϵ par les groupements Boc ou Cbz (molécules **101a**, **102a**, **108a** et **109a** comparées à **101b**, **102b**, **108b** et **109b**).

De même que dans la série des molécules fluorées, l'inhibition n'est pas affectée par le remplacement de la phénylalanine par la 3,4,5-triméthoxybenzylamine (comparaison des molécules **101b** à **109b** et **102b** à **108b**) sur *la partie 4*.

Ces résultats montrent aussi que les molécules ayant le motif β -hydrazino acide sur la partie centrale ont des activités inhibitrices similaires à celles contenant le trifluorométhyle β -hydrazino acide (comparaison des molécules **68b** à **101b** à **109b**, **72b** à **102b**, **93b** à **109b** et **91b** à **108b**). Le groupement trifluorométhyle ne semble donc pas influencer l'activité inhibitrice des molécules portant un motif β -hydrazino acide. La faible influence du groupement trifluorométhyle a été confirmée par le fait que la configuration absolue du carbone le portant n'est pas impliquée dans l'activité inhibitrice. En effet les deux diastéréoisomères de **68b** séparés et testés séparément ont montré des activités inhibitrices similaires (table 8, **68c** et **68d**).

Chapitre II: Synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs du protéasome dérivés de scaffolds α et β hydrazino acides

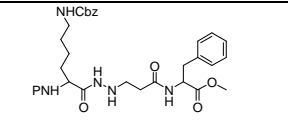
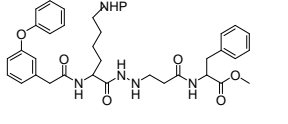
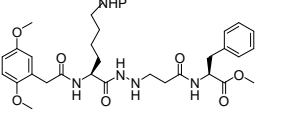
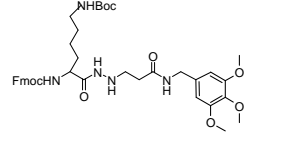
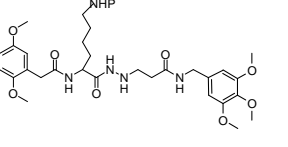
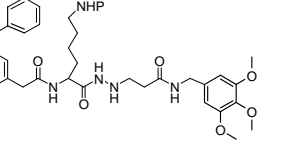
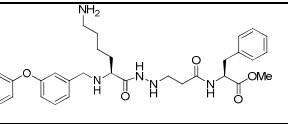
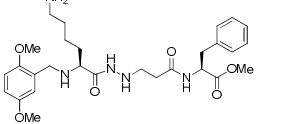
99 (P= Boc) 100(P=H)		48.5 ± 2.4 8.2 ± 0.4
101a (P= CBz) 101b (P=H)		2.8 ± 0.1 1.4 ± 0.1
102a (P= CBz) 102b (P=H)		3.6 ± 0.3 8.8 ± 0.3
106		6.0 ± 0.2
108a (P= Boc) 108b (P=H)		31.4 ± 0.7 11.8 ± 1
109a (P= Boc) 109b (P=H)		4.7 ± 0.5 3.3 ± 0.1
117b		2.8
118b		17 ± 1

Tableau 9 : structure et activité inhibitrice des molécules contenant le motif β -hydrazino acide non fluoré sur le site CT-L du protéasome 20S de lapin.

Les molécules raccourcies par l'introduction de l'homologue **α -hydrazino acide** dans *la partie 3* possèdent un pouvoir inhibiteur similaire ou légèrement plus élevé que leurs homologues supérieurs (table 10). Par exemple, la molécule **122** portant le groupement *tert*-butyloxycarbonyl est quatre fois plus efficace que son homologue supérieur **99**. Les molécules **125a** et **125b** avec le phénoxyphényle sur *la partie 1* ont une activité inhibitrice comparable à celle des molécules **101a** et **101b** avec une IC_{50} de l'ordre du submicromolaire pour **125b**. La molécule **124b** possédant le 2,5-diméthoxyphénylacétyle sur *la partie 1* est 8,8 fois plus

Chapitre II: Synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs du protéasome dérivés de scaffolds α et β hydrazino acides

efficace que **102b** tandis que **124a** et **102a** ont la même activité. Par ailleurs, comme observé avec la série des β -hydrazino acides, dans *la partie 2*, la protection de l'amine ϵ de la lysine par un groupement Cbz n'entraîne pas une détérioration de l'activité inhibitrice (molécules **122**, **124a** et **125a**). La molécule **134** contenant le tryptophane à la place de la lysine dans la *partie 2* garde une bonne activité inhibitrice. De même qu'observé dans les deux séries précédentes, les molécules contenant le groupement 3-phénoxyphénylacétyle sur la partie 1 sont légèrement plus efficaces que celles avec les groupements 2,5-diméthoxyphénylacétyle et *tert*-butyloxycarbonyle (molécules **122** et **124a** comparées à **125a**).

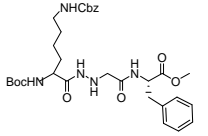
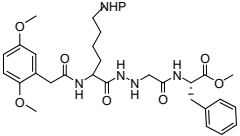
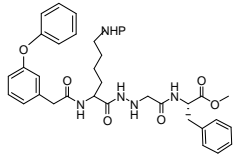
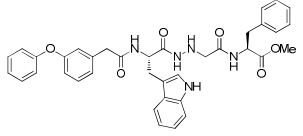
122		11.8 ± 1.1
124a (P= CBz) 124b (P=H)		7.1 ± 0.2 1.0 ± 0.03
125a (P= CBz) 125b (P=H)		1.1 ± 0.1 0.7 ± 0.03
134		6 ± 1

Tableau 10 : structure et activité inhibitrice des molécules contenant le motif α -hydrazino acide non fluoré sur le site CT-L du protéasome 20S de lapin.

Nous avons également évalué l'activité biologique de certains de nos molécules sur les deux autres sites actifs du protéasome : PA et T-L (tableau 11). Nous avons ainsi pu constater une différence de sélectivité de nos molécules selon le site actif du protéasome. En effet, le composé **69** possède une bonne activité inhibitrice sur les sites CT-L et PA (IC_{50} = 85 et 72 μ M respectivement), tandis qu'elle active quatre fois le site T-L à une concentration de 100 μ M. Les composés **72a** et **75** inhibent le site PA avec une IC_{50} de l'ordre du micromolaire, activent le site T-L par un facteur 2 et n'inhibent que 30% de l'activité du site CT-L à une

Chapitre II: Synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs du protéasome dérivés de scaffolds α et β hydrazino acides

concentration de 100 μ M. Enfin, la molécule **71** active le site T-L, inhibe le site CT-L et n'a aucun effet sur l'activité inhibitrice du site PA (table 11).

Molécules	IC ₅₀ (μ M)		
	CT-L	PA	T-L
68b	1,6 \pm 0,1	2,7 \pm 0,1	8,4 \pm 1,3
59	85 \pm 1,5	72 \pm 0,7	x 4
102a	3,6 \pm 0,3	10,3 \pm 0,8	< 25% (à 50 μ M)
67	30%	77 \pm 7	x 2,7
64a	30%	54 \pm 7	x 1,6
63	60 \pm 0,5	Ni	x 3

Tableau 11 : structure et activité inhibitrice sur les sites CT-L, PA et T-L du protéasome 20S de lapin.

En revanche l'inhibition n'est pas toujours maintenue sur les sites T-L et PA pour les autres molécules (tables 8, 9 et 10). En effet nous avons une réactivation du protéasome à des plus fortes concentrations (figure 66). A ce jour nous n'avons pas d'explication à ce phénomène mais, des études enzymologiques complémentaires doivent être envisagées dans l'équipe du Pr Reboud-Ravaux. Nous pouvons tout de même émettre deux hypothèses : soit ce phénomène est dû à un effet allostérique et les inhibiteurs à plus fortes concentrations se fixent sur un site allostérique qui va activer le protéasome, soit à plus forte concentration, les inhibiteurs ne sont plus solubles, précipitent et ne se fixent plus au protéasome.

Par ailleurs, certaines molécules (**68b**, **70b** et **71**) ont été évaluées pour les capacités à inhiber des enzymes protéolytiques structurellement proches telles que la calpaine I et la cathepsine B et, elles se sont montrées sélectives au protéasome.¹⁹⁴ De plus, la molécule **68 b** inhibe l'activité CT-L dans les cellules humaines HeLa (20% d'inhibition à 50 μ M).¹⁹⁴

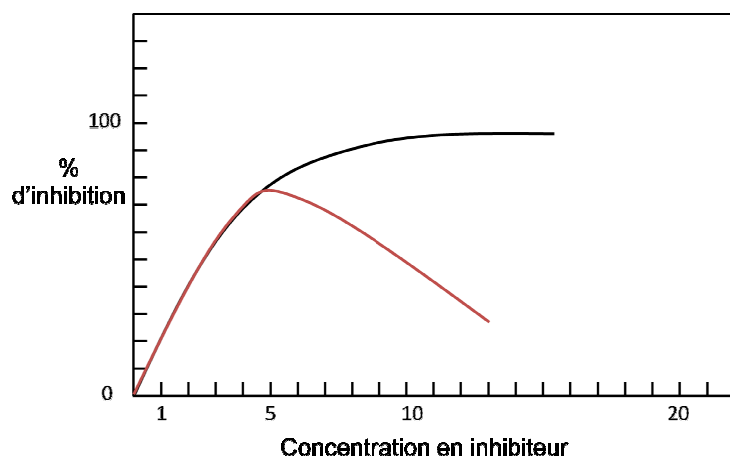


Figure 66 : courbe obtenue dans le cas où l'inhibition n'est pas maintenue : noir : courbe d'inhibition classique, rouge : courbe obtenue en cas de réactivation

En conclusion, ces résultats confirment que les scaffolds α et β -hydrazino acides fluorés et non fluorés peuvent mimer la structure secondaire des α -peptides natifs. Les molécules contenant ces motifs sont capables d'inhiber le site CT-L du protéasome avec des concentrations inhibitrices de l'ordre du micromolaire ou submicromolaires (0,7 μ M pour la molécule X). Afin de tenter de trouver une explication rationnelle pour les différentes activités des composés, nous avons mené des études de modélisation moléculaire par des calculs de docking.

IV. Modélisation moléculaire :

Au vu des différences d'activité inhibitrice observées entre nos molécules dans le site chymotrypsine nous avons décidé d'utiliser la modélisation moléculaire afin de trouver une explication plausible à ses résultats en employant la technique de l'amarrage moléculaire (*docking*).¹⁹⁷

A ce jour, plusieurs modèles théoriques décrivant le mode de liaison des différents inhibiteurs avec le protéasome 20S ont été rapportés dans la littérature.^{95,198-201} Si la plupart des *dockings* ont été effectués avec le protéasome 20S de levure, l'utilisation du protéasome 20S bovin reste marginale alors qu'il présente une identité de séquence quasi-totale avec le protéasome 20S humain, notamment au niveau des sites catalytiques.²⁰²⁻²⁰⁴ Cela est certainement dû au fait que le protéasome bovin n'a été cristallisé que récemment.¹¹ Par conséquent nous avons

décidé d'utiliser la structure cristallographique du protéasome bovin (code PDB 1IRU) pour réaliser notre *docking*. Le *docking* a été effectué avec le programme GOLD sur le site CT-L défini à l'interface des sous-unités $\beta 5$ et $\beta 6$.

IV.1. Validation de notre modèle:

Dans le but de valider notre procédure, nous avons effectué le *docking* d'un inhibiteur non covalent de structure pseudopeptidique développé par Furet *et al.*, dans le but de vérifier que nous retrouvions des résultats comparables à ceux décrits par ces auteurs, dans le site CT-L d'un modèle du protéasome humain, construit par homologie de séquence à partir du protéasome de la levure.¹⁰⁷

Pour chaque molécule, nous avons calculé plusieurs solutions. La pose capable de reproduire au mieux le mode de liaison communément admis des inhibiteurs non covalents (à savoir la formation de liaisons hydrogènes avec les acides aminés clé Thr1, Thr21, Gly23, Gly47, Ala49 et Asp125, l'occupation des poches S1, S3, AS1 et AS2) a été retenue.

Les premiers résultats de notre validation montrent que les conditions employées permettent de positionner le pseudopeptide **36** de manière analogue à celle décrite par l'équipe de Furet. On remarque en particulier la formation de liaisons hydrogènes entre le pseudopeptide **36** et les acides aminés clé Thr1, Thr21, Gly47, Ala49 et Asp125 ainsi que l'occupation des poches S3 et AS2. En revanche la poche S1 n'est pas occupée (figure 67), ce qui constitue un défaut important de ce modèle initial. Néanmoins, le même modèle avec le protéasome bovin a été publié parallèlement à notre travail par l'équipe de B. Villoutreix.²⁰² Leurs travaux ont démontré que des composés sulfonamides étaient capables d'inhiber le site CT-L du protéasome de façon non covalente sans occuper la poche S1. Nous avons donc décidé dans un premier temps d'effectuer le *docking* de toutes les molécules sur ce modèle. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à trouver une réelle explication pour les différences d'activité entre les composés β -hydrazino acides portant une lysine protégée (**68a** et **72a** par exemple) et leurs homologues déprotégés (**68b** et **72b**). Par ailleurs, le mode de liaison des molécules portant un motif plus long rétrohydrazino était également peu différent du mode de liaison des hydrazino acides trifluorométhylés alors que leurs efficacités sont très différentes.

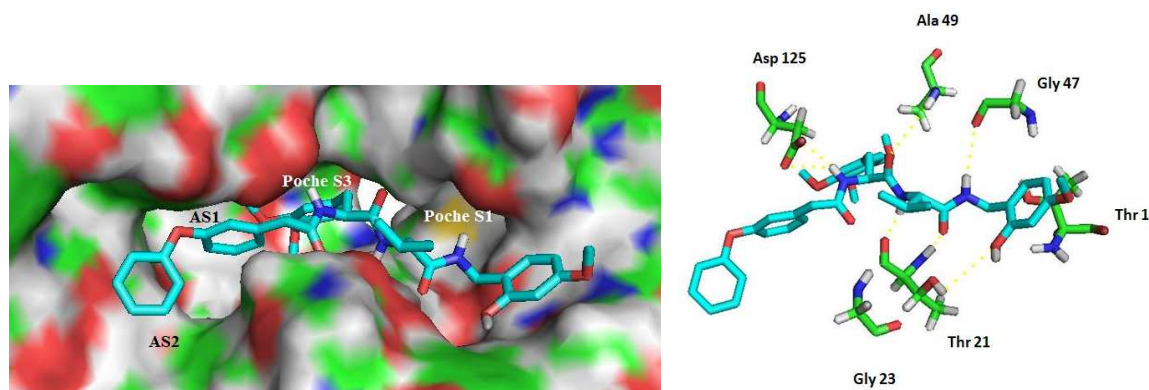


Figure 67 : à gauche : représentation d'une première hypothèse de mode de liaison de la molécule de Furet *et al.* dans le site CT-L avec la surface accessible au solvant de la protéine, à droite : liaisons hydrogènes contractées avec les résidus clés.

Nous avons donc essayé d'améliorer notre modèle en repartant au point de départ du docking avec le pseudopeptide **36** de Furet. Pour expliquer cette divergence avec les résultats obtenus par Furet en matière d'occupation de la poche S1, nous avons dans un premier temps émis l'hypothèse que cette poche pourrait être plus petite dans le protéasome bovin que dans le protéasome de la levure. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons commencé par superposer la structure du protéasome bovin cristallisé seul (sans ligand) avec celle du protéasome de la levure co-cristallisé avec un inhibiteur non covalent analogue linéaire du TMC 95.²⁰⁵ Nous avons ainsi pu remarquer que dans ces conditions la poche S1 du protéasome bovin était plus petite que celle du protéasome de la levure (figure 68).¹¹

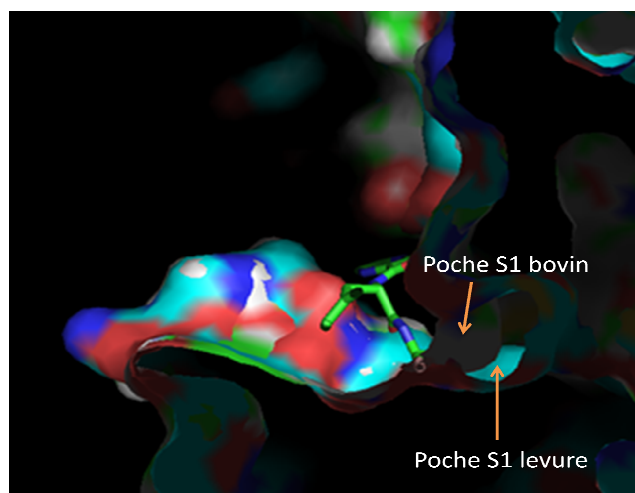


Figure 68: superposition des poches S1 dans le protéasome bovin et celui de la levure.

Chapitre II: Synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs du protéasome dérivés de scaffolds α et β hydrazino acides

En revanche, lorsque nous avons superposé les structures du protéasome bovin et du protéasome de la levure tous deux cristallisés seuls, nous avons constaté que les deux poches S1 avaient approximativement la même taille.

Au vu de ces résultats, nous avons révisé notre hypothèse initiale et attribué cette différence de volume apparent à un phénomène d'adaptation de la poche S1 induit par le substrat. Ne disposant pas de structure du protéasome bovin co-cristallisé avec un ligand, nous n'avons pas pu confirmer formellement cette hypothèse. Néanmoins, nous avons poursuivi cette étude avec le protéasome de la levure en étudiant la structure de différents cocristaux. Nous avons ainsi remarqué que la taille de la poche S1 variait en fonction du volume du groupement qui l'occupait. Par exemple, dans le cas d'un inhibiteur non covalent (dérivé linéaire du TMC 95), la poche accueille un groupement phényle et dans le cas du bortezomib elle est occupée par un groupement isopropyle, ce qui s'accompagne d'une légère diminution du volume de la poche. Enfin, lorsque l'on superpose la structure du protéasome de levure cristallisé seul à d'autres structures où le site CT-L est occupé par différents inhibiteurs non covalents ou le Bortezomib, on s'aperçoit que la poche S1 est encore plus fermée lorsqu'elle est vide.

Nous avons poursuivi l'étude de ce phénomène d'adaptation supposé de la poche S1 en essayant de comprendre s'il était dû à un changement conformationnel majeur de la sous-unité porteuse de cette poche. Nous avons alors observé que dans les structures dont nous disposions, les boucles à proximité de la poche S1 adoptaient des conformations similaires, sur le fond duquel se détachait un net mouvement de rotation de la chaîne latérale de la méthionine 45 (figure 69). L'effacement de cette chaîne latérale était à son tour rendu possible par l'existence concomitante de la chaîne latérale de l'isoleucine 35 sous forme d'un autre rotamère.

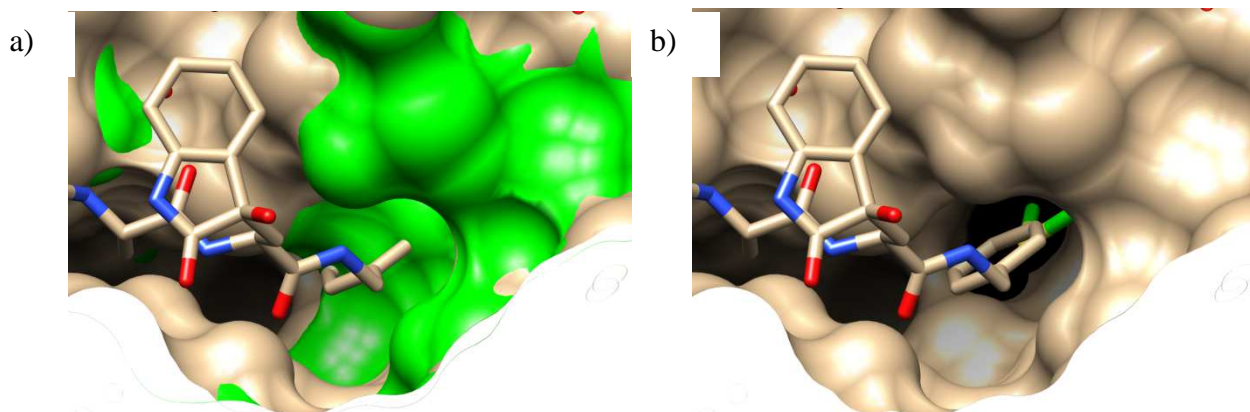


Figure 69 : a) Réduction du volume de la poche S1 illustrée par la superposition de la structure du protéasome de la levure co-cristallisé avec un inhibiteur non covalent (code PDB: 3NZW, brun clair) et de la structure du protéasome de la levure cristallisé seul (code PDB : 2F16, vert). b) même figure sans la figure accessible au solvant avec la chaîne latérale de la Met45 (vert) responsable de la diminution du volume.

Nous avons refait le *docking* en libérant la conformation de ces deux chaînes latérales et nous avons alors eu l'agréable surprise de voir apparaître parmi les résultats des solutions où la poche S1 était occupée par le groupement phényle terminal du pseudopeptide **36** (figure 70). Dans cette hypothèse de mode de liaison, le composé **36** est également engagé dans cinq liaisons hydrogènes (deux avec Thr21, une avec Asp125, Gly47 et Met45). Nous avons alors jugé ce modèle satisfaisant, et nous avons commencé à l'utiliser pour essayer d'expliquer les différences d'activité inhibitrice du site CT-L observées entre nos différentes molécules.

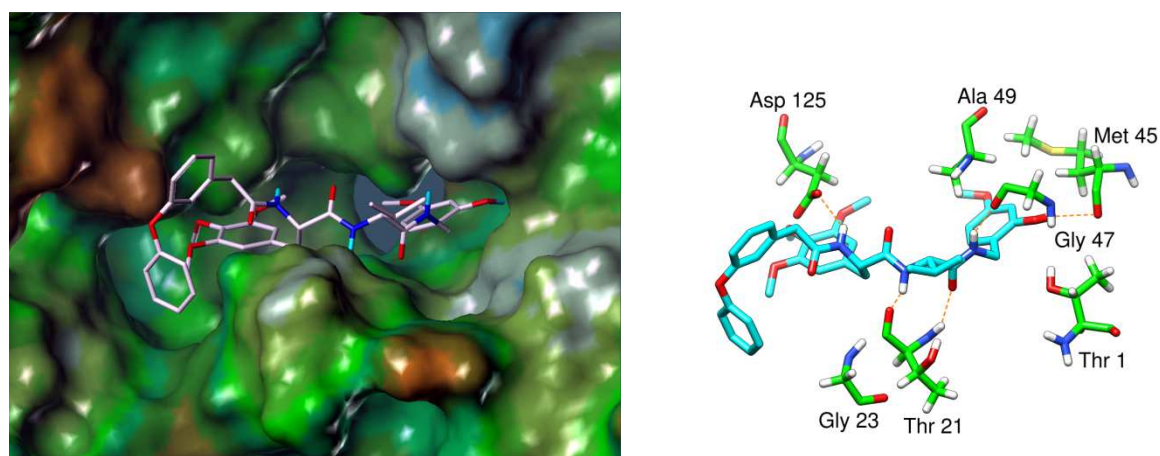


Figure 70 : Nouvelle hypothèse de mode de liaison calculée pour la molécule de Novartis en prenant en compte la flexibilité conformationnelle au voisinage de la poche S1.

IV.2. *Docking* de nos molécules:

Une des questions que nous voulions prioritairement traiter à l'aide de l'outil de modélisation moléculaire que nous avons développé était l'explication de la différence d'activité observée entre les pseudopeptides fluorés porteurs d'un groupement protecteur sur l'amine ϵ de la lysine et leurs homologues déprotégés (composés **68a**, **72a** comparés à **68b** et **72b**). Lorsque nous avons engagé les structures correspondantes dans des expériences de *docking* dans les conditions précédemment mises au point, nous avons trouvé pour le composé **68b** avec une fonction amine libre un positionnement analogue à celui du pseudopeptide de Furet (figure 71). En particulier, les poches S1, S3 et AS1 sont occupées, et des liaisons hydrogènes sont contractées avec Gly47, Asp125, Ser123 et Gln131. En revanche, avec le composé **68a**, aucune des solutions générées par le programme de *docking* ne montrait simultanément une occupation des poches S1 et S3 et la formation de liaisons hydrogènes avec les acides aminés clés. Dans les molécules **68a**, **72a**, les deux diastéréoisomères ont été dockés et les résultats sont tout à fait similaires. La stéréochimie du carbone portant le groupement trifluorométhyle n'a donc pas d'influence sur le mode de liaison dans le site CT-L. Ceci est cohérent avec les résultats de l'évaluation biologique concernant **68b** dont les deux diastéréoisomères ont montré la même efficacité d'inhibition du site CT-L.

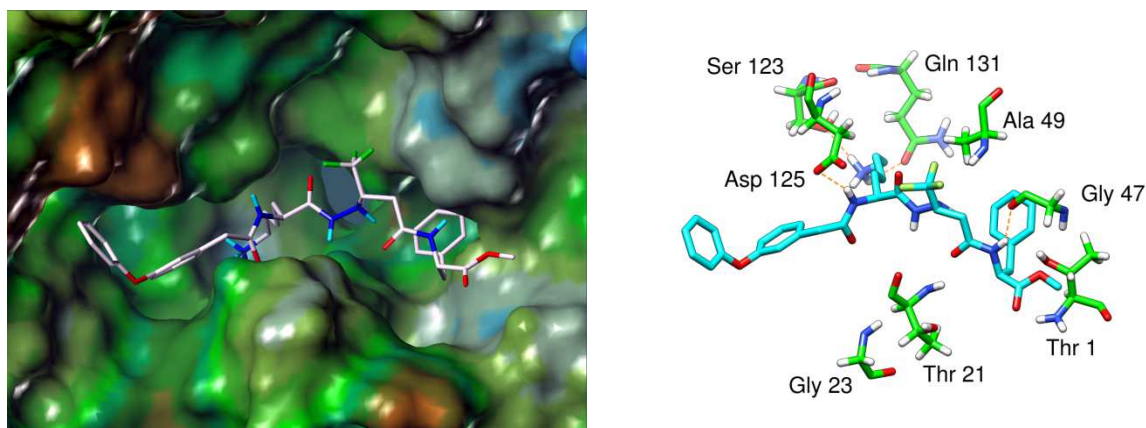


Figure 71 : Représentation du mode de liaison calculé pour le composé **68b** SSS dans le site actif CT-L du protéasome bovin.

Par ailleurs, le *docking* des pseudopeptides non fluorés portant ou non un groupement protecteur sur l'amine ϵ de la lysine a aussi été effectué. L'analyse de ces résultats montre que

le composé protégé **117a** se positionne de la même manière que le pseudopeptide de Furet *et al.* dans le site actif, occupe les poches S1, S3 et AS1 et forme deux liaisons hydrogènes avec Gly47 (figure 72). Une première liaison hydrogène est établie entre le carbonyle de la fonction ester du composé **117a** et l'atome d'hydrogène polaire du squelette peptidique de Gly47. La deuxième liaison est formée entre le groupement NH du résidu phénylalanine de **117a** et le groupement carbonyle du squelette peptidique de Gly47. A l'inverse des molécules de la série fluorée, son homologue déprotégé **117b** adopte un positionnement similaire avec occupation des poches S1 et S3 par le noyau aromatique du résidu phénylalanine et la chaîne latérale aminée de la lysine respectivement et formation de liaisons hydrogène avec les résidus Thr1, Ser123, Ser129 et Ser130 (figure 73). Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus en évaluation biologique (table 9) et suggèrent que les pseudopeptides non fluorés avec la lysine protégés ou libre sont susceptibles d'avoir les mêmes activités inhibitrices.

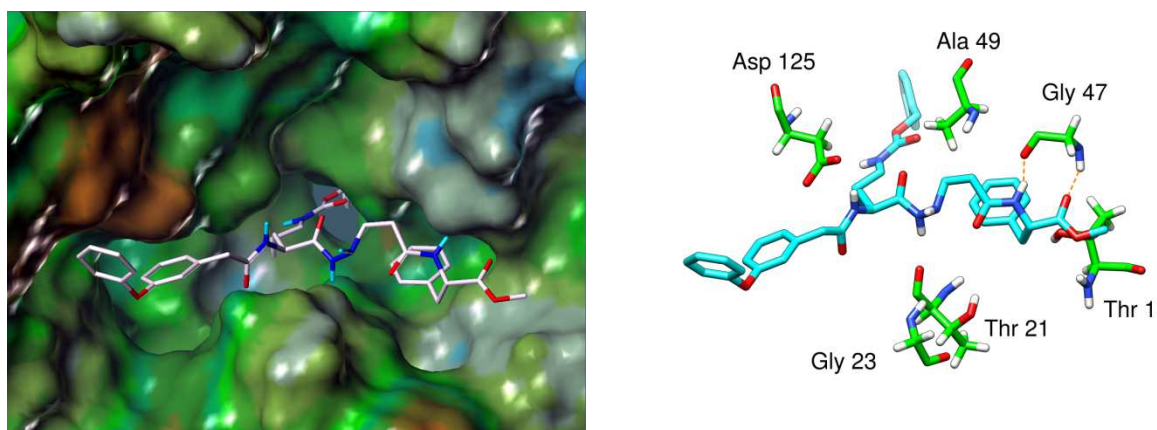


Figure 72: Représentation du mode de liaison calculé du composé **117a** dans le site CT-L.

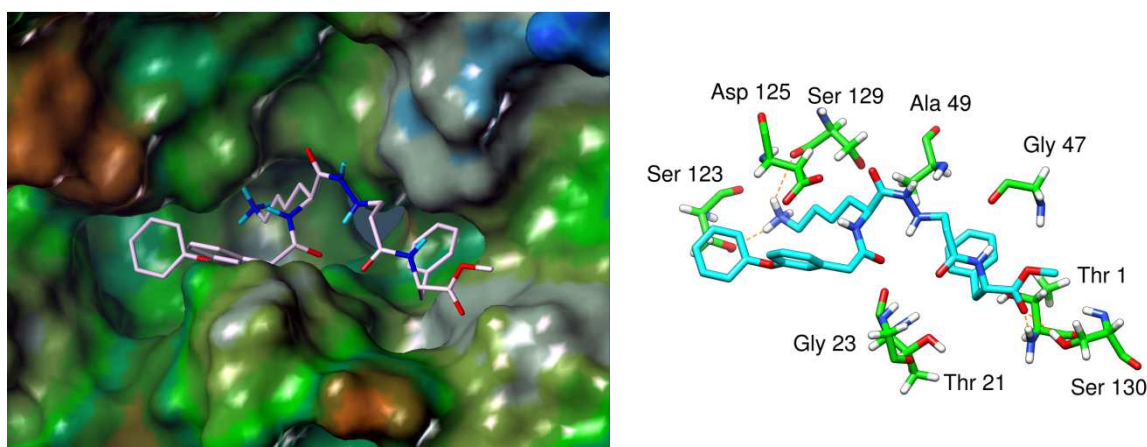


Figure 73: Représentation du mode de liaison calculé du composé **117b** dans le site CT-L.

Le docking des composés non actifs **82a** et **82b** a montré que ces molécules n'interagissent pas bien avec le site actif. En effet, avec le composé **82a** aucune solution n'occupe les poches S1, S3, AS1 et AS1 et avec le composé **82b** une seule pose se positionne à peu près correctement. On remarque que dans cette pose la poche S1 est occupée par le groupement CF_3 tandis que les poches S3, AS1 et AS2 ne sont pas occupées (figure 74). En revanche le composé **82b** contracte des liaisons hydrogènes avec les résidus clés tels que Thr21, Gly47, Asp125 et Ser129 (figure 74). Au vue de ces résultats on aurait pu s'attendre à une légère activité du composé **82b**.

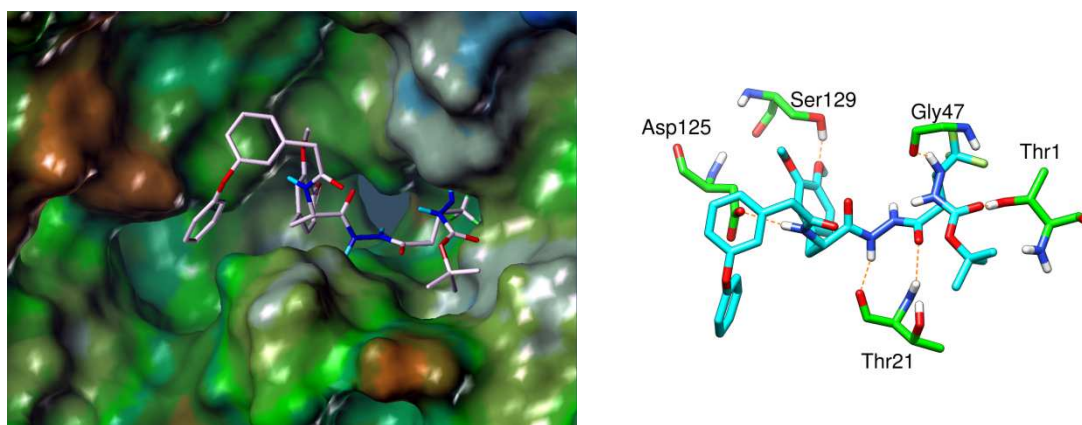


Figure 74 : représentation du mode de liaison calculé du composé **82b**_{SR} dans le site CT-L

L'analyse détaillée de ces résultats de *docking* nous a ainsi permis de nous rapprocher de l'explication des différences d'activité observées entre nos dérivés. Nous avons en particulier pu émettre l'hypothèse que les molécules actives sur le protéasome produisent leur effet en se fixant dans le site actif d'une manière satisfaisant les critères communs aux inhibiteurs du protéasome non covalents peptidomimétiques connus, à savoir la formation de liaisons hydrogène avec les résidus clé et l'occupation des poches S1 et S3. Encouragés par les résultats de la validation de ce modèle basé sur la technique du *docking*, nous l'avons utilisé en tant qu'outil prédictif pour orienter la suite de ce travail. En particulier, nous avons soumis à ce modèle la structure de plusieurs composés dont **159** et **160** qui contiennent une contrainte au niveau de sa partie centrale. Cette contrainte à pour but d'orienter les groupements encombrant vers une direction privilégiée qui dans notre cas sont les poches S1 et S3 (voir chapitre 3).

V. Evaluation biologique par RMN du ^{19}F :

La technique du FABS, utilisée pour déterminer l' IC_{50} des inhibiteurs de différentes classes thérapeutiques grâce à la RMN du fluor a été décrite dans le chapitre 1. Nous avons décidé de développer cette méthode pour l'évaluation biologique de nos inhibiteurs potentiels du protéasome dans le site chymotrypsine.

V.1. Principe de l'évaluation biologique par fluorescence:

Le substrat le plus utilisé pour réaliser le test d'inhibition sur le site CT-L du protéasome 20S de est le Suc-LLVY-AMC (Suc = succinyl, AMC = aminométhylcoumarine) **135**. La liaison de ce substrat au site catalytique entraîne un clivage après la tyrosine et libère le groupement fluorescent 7-amino-4-méthylcoumarine (AMC) (schéma 15).

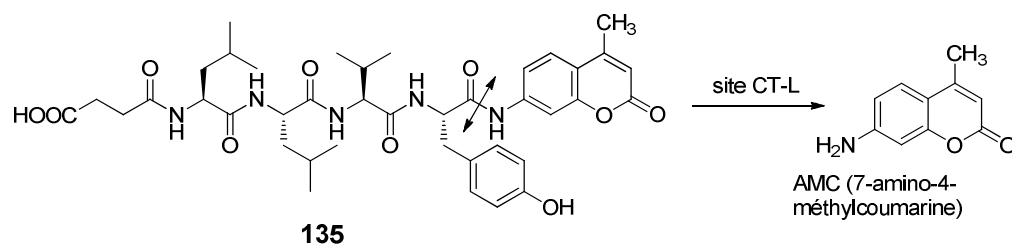


Schéma 15: réaction de clivage dans le site catalytique CT-L

Le dosage de la fluorescence émise par l'AMC en présence et en absence d'inhibiteurs potentiels permet de déterminer respectivement les vitesses initiales V_i et V_o de clivage du substrat par la protéasome et de calculer le pourcentage d'inhibition en utilisant l'équation 1. La représentation graphique du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration permet de déterminer l' IC_{50} (concentration donnant 50% d'inhibition)¹⁰⁶.

$$\% \text{ inhibition} = 100 \times \left(1 - \frac{V_i}{V_o}\right) \quad \text{Equation 4}$$

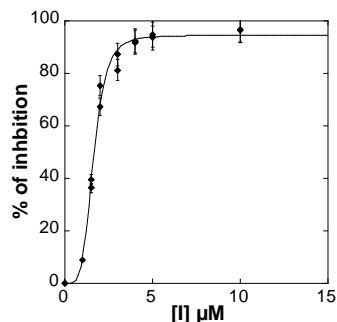


Figure 75 : exemple de courbe obtenue avec un inhibiteur sur le site CT-L du protéasome 20S de lapin à pH 7,5 et à 37°C.

V.2. Approche par RMN du fluor:

La détermination de l'IC₅₀ par RMN du fluor implique la quantification du produit formé par RMN du fluor. La technique que nous avons choisie (le FABS) nécessite l'utilisation d'un substrat fluoré. Ce substrat doit être sélectionné de façon à ce que le déplacement chimique de son groupement fluoré soit différent de celui du produit formé après clivage par le protéasome. Sachant que le clivage a eu lieu après la tyrosine du substrat Suc-LLVY-AMC, il nous a semblé judicieux i) de remplacer la totalité du groupement AMC par un groupement fluoré ou, ii) d'incorporer un groupement fluoré sur l'AMC. De ce fait, le groupement fluoré serait à proximité du site catalytique, ainsi les déplacements chimiques en RMN du ¹⁹F devraient être différents selon qu'il est lié au substrat ou libre après clivage (figure 76). De plus, la fluoration d'un substrat doit se faire de manière à ne pas influencer l'affinité du substrat pour son récepteur. Ce qui devrait être le cas car, la reconnaissance du substrat par le protéasome semble due à l'enchaînement de séquences d'acides aminés Suc-leucine-leucine-valine-tyrosine et non à la présence du groupement AMC.

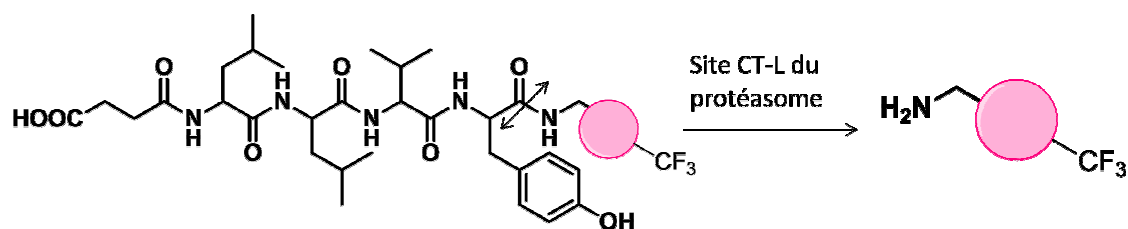


Figure 76 : représentation schématique du substrat fluoré envisagé et de son clivage dans le site CT-L du protéasome 20S.

Nous avons donc entrepris la synthèse de plusieurs analogues fluorés du substrat naturel Suc-LLVY-AMC.

V.2.a. Substrat fluoré 1:

La première fluoration du substrat Suc-LLVY-AMC envisagée a été le remplacement de l'AMC par le groupement trifluoroéthylamine (schéma 16). En effet, dans ce substrat fluoré, seulement un carbone sépare le groupement CF_3 du site catalytique. Par conséquent, après clivage, l'environnement des atomes de fluor du groupement trifluorométhyle serait significativement modifié, ce qui devrait induire une différence de déplacement chimique entre le substrat et le produit (amine libre) issu de son clivage par le protéasome.

Synthèse du substrat fluoré 1:

La synthèse de ce premier substrat fluoré est décrite dans le schéma 16. Elle débute par une réaction de couplage entre la trifluoroéthylamine **136** et la Boc-Tyr(Z)-OH en présence de l'hydrochlorure de *N*-(3-Diméthylaminopropyl)-*N'*-éthylcarbodiimide (EDCI) et d'HOBt comme réactifs de couplage, de DIPEA comme base, dans le DMF à température ambiante, pendant 16h pour conduire au produit **137** avec un excellent rendement de 94%. Une succession de clivages acide du groupement protecteur Boc suivi des couplages peptidique avec la Boc-Valine-OH, et deux fois avec la Boc-Leu-OH ont conduit aux produits **138**, **139** et **140**. Si les composés **138** et **140** sont obtenus avec de bons rendements (90% et 64% respectivement), ceci n'est pas le cas pour le composé **139** qui est obtenu avec un faible rendement (31%). Ce rendement est dû à la faible solubilité du composé **139** dans les solvants d'extraction et d'élution. La réaction entre l'anhydride succinique et l'amine issue du clivage acide du groupement Boc de **140** en présence de DIPEA dans le DMF a permis l'obtention du composé **141** avec un rendement de 85%. L'insolubilité du composé **141** dans le méthanol ou un mélange méthanol/DMF a rendu l'hydrogénation catalytique du groupement benzyle du composé **141** très difficile. Finalement, ce clivage a été effectué dans l'acide acétique glacial en présence 10% de Pd/C sous atmosphère d'hydrogène pour conduire au substrat final **142**.

Chapitre II: Synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs du protéasome dérivés de scaffolds α et β hydrazino acides

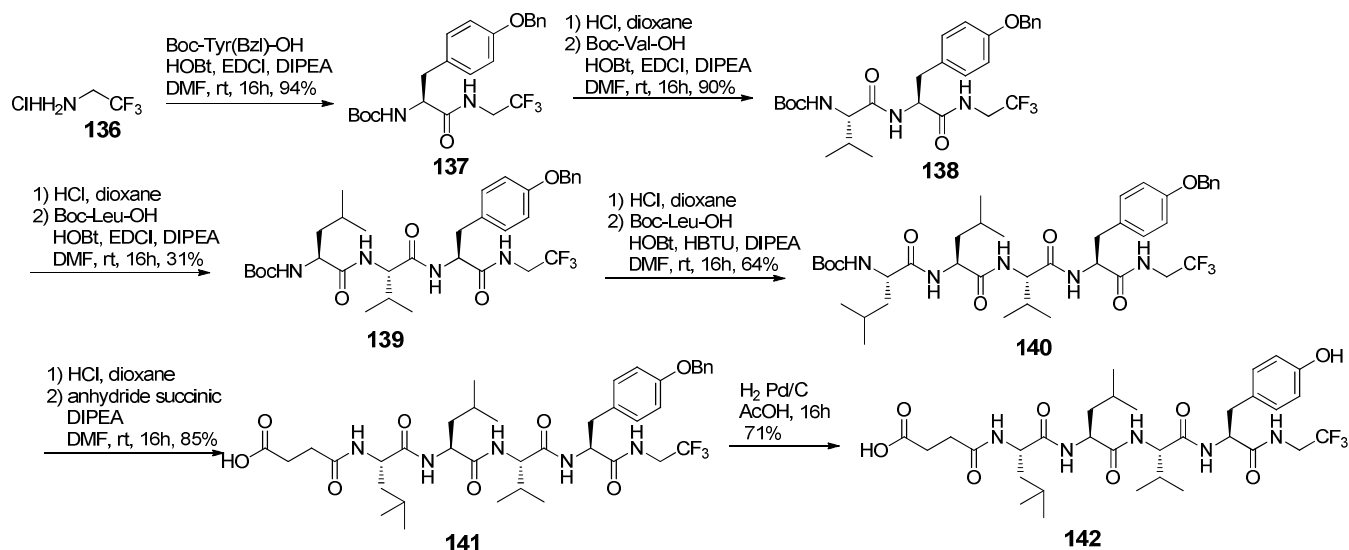


Schéma 16 : synthèse du substrat fluoré **142**

Test de chevauchement:

Après l'obtention du substrat fluoré, l'étape suivante dans la technique du FABS est de vérifier qu'il n'y a pas de chevauchement entre les signaux des substrats et ceux du produit après la réaction enzymatique. Le clivage ayant eu lieu après la tyrosine, le produit correspondant est la trifluoroéthylamine. Nous avons donc comparé le déplacement chimique de cette amine et celui du substrat fluoré **1**. Ce test a été réalisé dans un tampon 100 mM Tris avec un 5% v/v de DMSO final. Le spectre RMN du ^{19}F obtenu avec le mélange de substrat **1** et de la trifluoroéthylamine montre une différence de déplacement de 2,21 ppm (figure 77). Ce qui est tout à fait compatible pour déterminer l' IC_{50} de nos inhibiteurs potentiels à condition que ce substrat soit affiné pour le protéasome et qu'il soit correctement clivé pour libérer la trifluoroéthylamine.

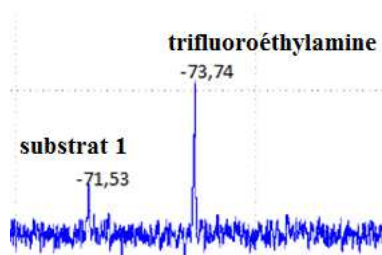


Figure 77 : résultats du test de chevauchement par RMN du ^{19}F des déplacements chimiques du substrat fluoré 1 et de la trifluoroéthylamine.

Test d'affinité avec le protéasome:

Pour vérifier que le substrat fluoré 1 est reconnu et clivé par le protéasome, ce dernier est incubé avec le protéasome 20S de lapin dans un tampon 100 mM Tris avec 5% v/v de DMSO final à 37°C. L'évolution de la réaction est suivie par RMN du ^{19}F . Deux ratios protéasome/substrat ont été testés : 1/2500 et 1/5000.

Le premier ratio testé avec ce substrat nous a été inspiré par l'équipe du Pr Groll.¹² En effet, pour réaliser leur test d'inhibition du protéasome, ils utilisent de 2500 fois plus de protéasome que de substrat. Nous avons effectué le test en gardant ce même ratio en faisant des acquisitions toutes les heures. Après une heure d'incubation, seul le pic correspondant à celui du substrat est observé (figure 78). Ce n'est qu'au bout de 5 heures que l'on observe la formation du signal correspondant à celui de l'amine issue du clivage du substrat. A 16 heures, les quantités d'amine libre et de substrat sont presque égales. Enfin, nous avons obtenu une conversion complète du substrat en amine libre au bout de 30 heures.

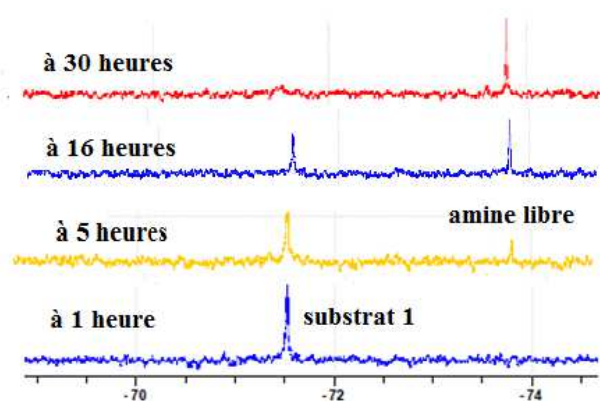


Figure 78 : évolution dans le temps du substrat 1 en présence du protéasome (ratio 1/2500).

Chapitre II: Synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs du protéasome dérivés de scaffolds α et β hydrazino acides

Pour vérifier que le pic formé au cours du temps est bien celui de l'amine et non celui d'un produit de dégradation, nous avons superposé le signal obtenu après clivage sur celui de la trifluoroéthylamine. Nous avons pu observer une superposition parfaite des deux pics et pour éliminer tout doute, nous avons ajouté de l'amine libre dans le tube après 30h et n'avons obtenu qu'un seul pic en RMN du ^{19}F .

Pour mettre en évidence le rôle du protéasome dans la formation de l'amine, le substrat a été incubé dans le même tampon avec la même quantité de DMSO sans ajouter le protéasome. Après une semaine d'incubation à 37°C , la RMN du ^{19}F a montré l'absence totale d'amine libre et seul le pic correspondant au substrat 1 était visible. Nous avons ainsi démontré par RMN du ^{19}F que le clivage est bien dû à l'action du protéasome et qu'il a eu lieu après la tyrosine.

Malgré ces résultats encourageants, cette expérience présente une limitation financière. En effet, le protéasome est onéreux et dans ces conditions, la préparation de chaque tube RMN revient à 24 euros. Sachant qu'il faut environ huit concentrations différentes et chacune en triplicate, le coût de la détermination d'une seule IC_{50} serait d'environ 576 euros. Ce montant étant trop élevé, nous avons donc envisagé d'autres ratios.

Le deuxième ratio testé est de un protéasome pour 5000 substrats dans le même tampon et avec la même quantité de DMSO que précédemment. Malheureusement, ce n'est qu'au bout de 47 heures que l'amine libre devient majoritaire par rapport au substrat et, après une semaine d'incubation on n'a pas obtenu un clivage total du substrat 1 (figure 79). Si l'on compare ces résultats avec ceux obtenus avec le ratio 1/2500, on remarque qu'en divisant par deux la quantité de protéasome, la réaction de clivage est trop lente et n'est pas complète au bout d'une semaine. L'hypothèse est que notre substrat fluoré n'est pas assez affiné pour le protéasome et que l'aromaticité du groupement AMC jouerait peut-être aussi un rôle dans la reconnaissance. Nous avons donc envisagé la synthèse d'un autre substrat fluoré en espérant qu'il serait plus affiné pour le protéasome.

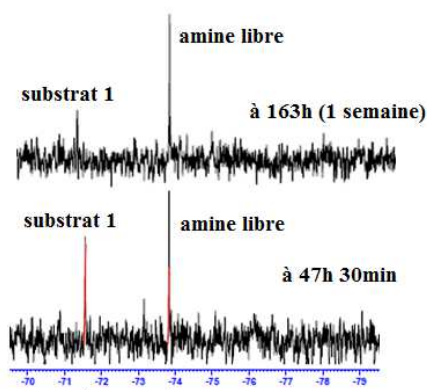
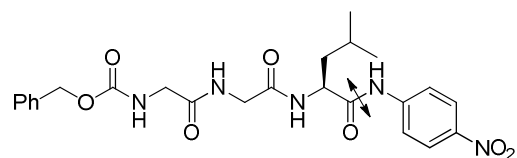


Figure 79 : évolution dans le temps du substrat 1 avec le ratio 1/5000.

V.2.b. Substrat fluoré 2 :

Un autre substrat utilisé pour sonder le site CT-L est la NCbz-Gly-Gly-Leu-*para*-nitroanilide **143**. Avec ce substrat, le clivage est effectué après la leucine ce qui libère la *para*-nitroaniline comme produit dosé par fluorescence. En s'inspirant de ce substrat, nous avons remplacé le groupement AMC du substrat Suc-LLVY-AMC par la *para*-trifluorométhylaniline. Ce nouveau substrat que nous appellerons substrat 2 (schéma 17) devrait être plus affiné du protéasome que le substrat 1.



143

Synthèse du substrat 2:

Le schéma de synthèse du substrat 2 **149** est presque identique à celui du premier avec une succession de clivage acide du groupement Boc suivi de couplage peptidique avec les acides aminés correspondants (schéma 17). En revanche, pour éviter l'étape de clivage du groupement benzyl qui nous avait posé des problèmes lors de la synthèse du substrat 1, la Boc-Tyr-OH a été utilisée à la place de la Boc-Tyr(Z)-OH. Les rendements globaux des différentes étapes sont bons et le substrat 2 est obtenu sans difficulté majeure.

Chapitre II: Synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs du protéasome dérivés de scaffolds α et β hydrazino acides

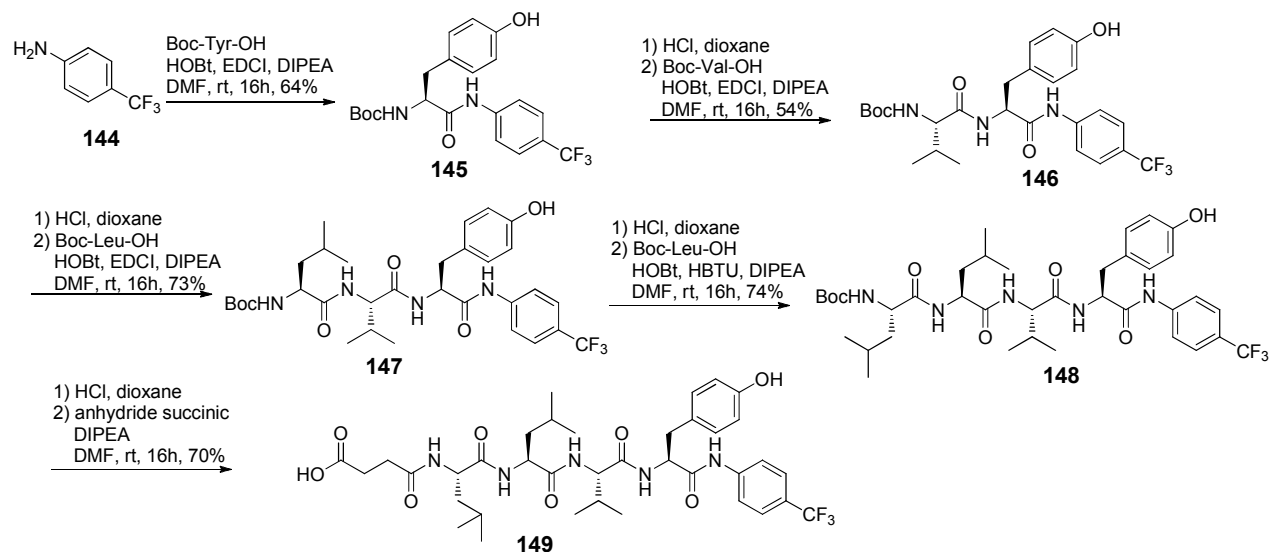


Schéma 17: synthèse du substrat 2

Test de chevauchement:

Nous avons réalisé ce test de chevauchement dans les mêmes conditions que précédemment à savoir dans un tampon 100 mM Tris avec un 5% v/v de DMSO. De même que précédemment, nous avons comparé les déplacements chimiques du substrat 2 avec celui de l'amine de départ correspondant: la *para*-trifluorométhylaniline (figure 80). Si entre le substrat 1 et son amine libre il y avait plus de 2 ppm d'écart, cet écart se réduit à 1,2 ppm entre le substrat 2 et la *para*-trifluorométhylaniline. Ceci est probablement dû au fait que dans le substrat 2, le groupement CF_3 est un peu plus loin du site de clivage, par conséquent, son environnement est moins perturbé. Mais cet écart reste suffisant pour les différencier et effectuer le test avec le protéasome.

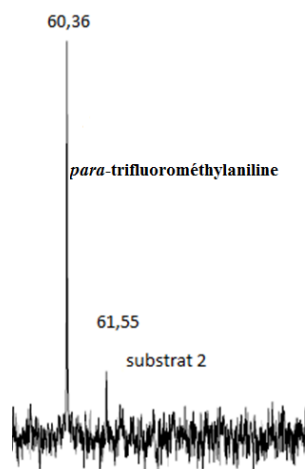


Figure 80: résultats du test de chevauchement par RMN du ^{19}F des déplacements chimiques du substrat 2 et de la para-trifluorométhylaniline

Test avec le protéasome :

L'affinité de ce deuxième substrat pour le protéasome 20S du lapin a été déterminée en les incubant dans un tampon 100 mM Tris avec 5% v/v de DMSO final à 37°C. Cette fois ci, nous avons commencé le test avec le ratio 1/5000 (protéasome/substrat) et suivi l'évolution de la réaction par RMN du ^{19}F au cours du temps (figure 81). Les résultats montrent que ce substrat est beaucoup plus affiné pour le protéasome que le substrat 1. En effet, nous observons une conversion presque complète du substrat 2 en amine libre au bout de seulement 2 heures contre une semaine avec le substrat 1. Après 3 heures d'incubation, le substrat est complètement transformé en amine libre. Comme dans le cas du substrat 1, nous avons ajouté de la para-trifluorométhylaniline dans le tube RMN contenant le produit de clivage du protéasome et nous n'avons observé qu'un seul pic par RMN du ^{19}F . Ce confirme que l'amine libérée est la para-trifluorométhylaniline. L'expérience contrôle sans le protéasome n'a pas montré la formation de l'amine libre. On peut donc déduire comme précédemment que le protéasome est responsable du clivage du substrat 2 après la tyrosine. Encouragé par cette grande sensibilité du fluor à son environnement, nous avons décidé de développer un troisième substrat plus proche de la structure de celui utilisé pour les tests de fluorescence mais dont le groupement fluoré serait plus loin du site de clivage.

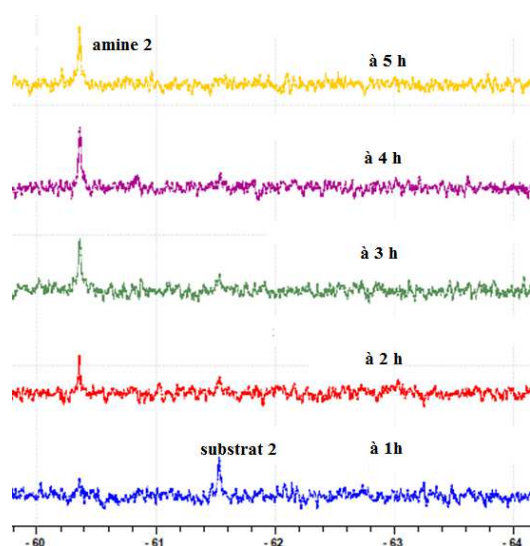


Figure 81: évolution dans le temps du substrat 1 avec le ratio 1/5000 de protéasome

V.2.c. Substrat fluoré 3 :

Nous avons observé avec le substrat 2 que le déplacement chimique du fluor est affecté même lorsque celui-ci est loin du site de clivage. Par conséquent, nous avons synthétisé un dernier substrat dont la seule différence avec le substrat naturel (Suc-LLVY-AMC) du protéasome est le remplacement du méthyle du groupement AMC par un groupement trifluorométhyle, appelé substrat 3.

Synthèse du substrat 3:

La synthèse du substrat fluoré 3 est décrite dans le schéma 18. Le composé **151** est formé avec un rendement moyen (46%) à partir de la 7-amino-4-(trifluorométhyl)coumarine **150** et la Boc-Tyr-OH dans la pyridine en présence de l'oxychlorure de phosphore à -15°C . La suite est identique à la synthèse des deux autres substrats avec des rendements compris entre 46 et 64%.

Chapitre II: Synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs du protéasome dérivés de scaffolds α et β hydrazino acides

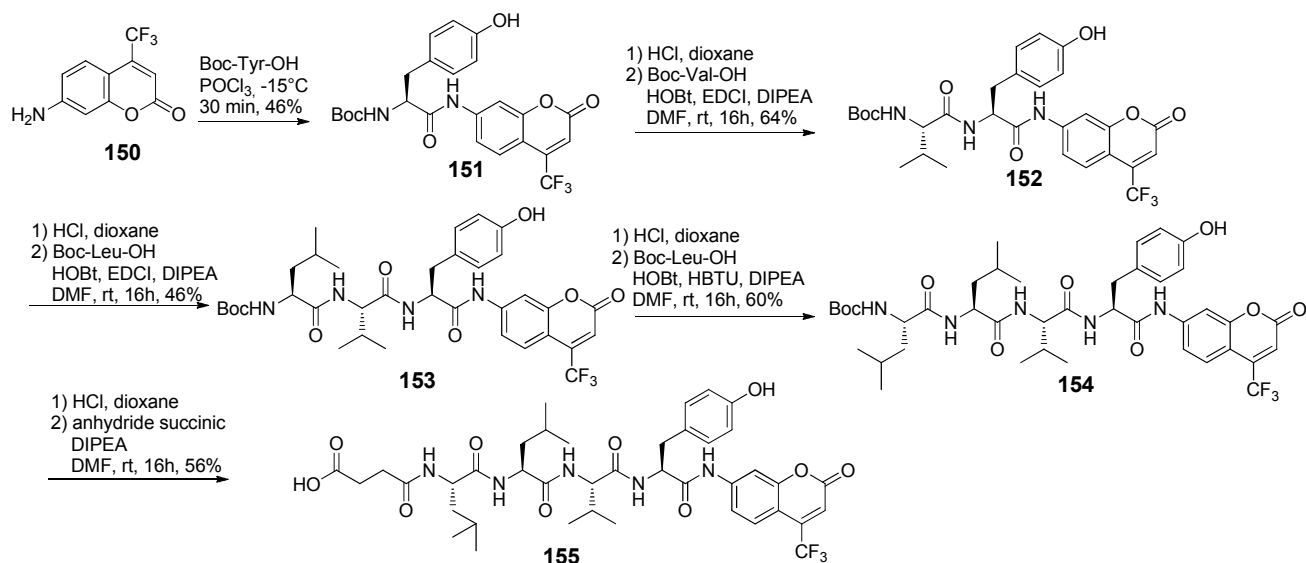


Schéma 18: synthèse du substrat fluoré 3

Test de chevauchement:

Ce test réalisé avec le substrat 3 et la 7-amino-4-(trifluorométhyl)coumarine a montré que malgré la distance importante entre le fluor et le site de clivage (10 atomes), le déplacement chimique de ce dernier est affecté (figure 82). En effet, nous avons obtenu une différence de déplacement chimique de 0,25 ppm, ce qui démontre la grande sensibilité du fluor à son environnement. La comparaison de cet écart avec ceux obtenus avec les deux précédents substrats montre que, logiquement, plus le fluor est loin du site de clivage, moins son déplacement chimique est affecté.

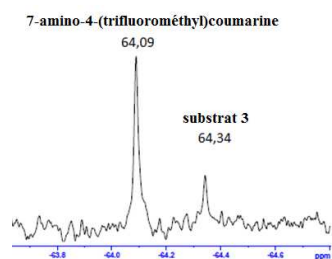


Figure 82: résultats du test de chevauchement par RMN du ¹⁹F des déplacements chimiques du substrat 3 et de la 7-amino-4-(trifluorométhyl)coumarine

Test d'affinité avec le protéasome:

Le même test d'incubation du substrat 3 avec le protéasome 20S de lapin a été réalisé dans un tampon Tris 100 mM à 37°C. Le premier ratio testé est un protéasome pour 5000 substrats. Après seulement une heure de réaction, la moitié du substrat 3 est transformée en amine libre. La conversion est totale au bout de 1h46 min (figure 83) contre 3 heures avec le substrat 2. Le substrat 3 a la plus grande affinité pour le protéasome. Ceci nous laisse penser que le groupement AMC joue un rôle dans la reconnaissance du site actif.

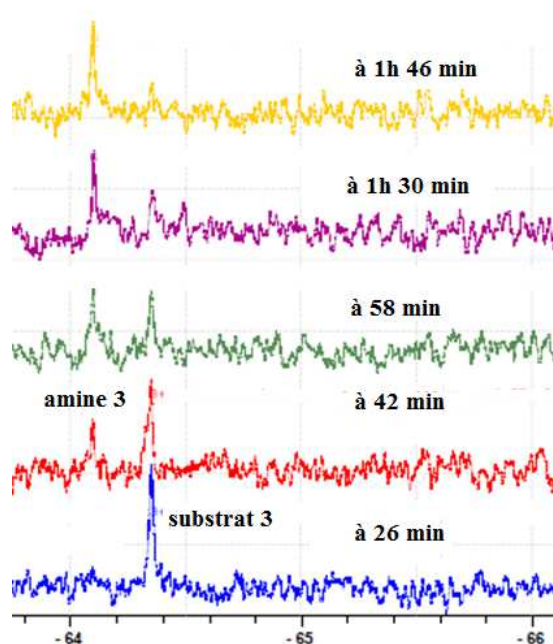


Figure 83: évolution dans le temps du substrat 3 avec le ratio 1/5000 de protéasome

Encouragé par ce résultat, nous avons testé d'autres ratios notamment celui utilisé par l'équipe du Pr Reboux¹⁰⁶ qui est d'environ un protéasome pour 166000 substrats. L'intérêt majeur d'utiliser ce ratio est que le prix de revient d'une manipulation s'en trouve grandement diminué (0,18 euro/tube). Le test est réalisé dans les mêmes conditions que précédemment et suivi par RMN du ¹⁹F. Au bout d'une heure, on observe l'apparition d'un pic qui ne correspond pas à celui de l'amine libre et dont l'intensité augmente avec le temps. Le signal correspondant à celui de l'amine libre n'est apparu qu'à partir de 19 heures et atteint son maximum au bout de 138 heures. L'expérience est arrêtée au bout de 138 heures sans

conversion complète du substrat en amine et avec toujours la présence du nouveau pic (figure 84).

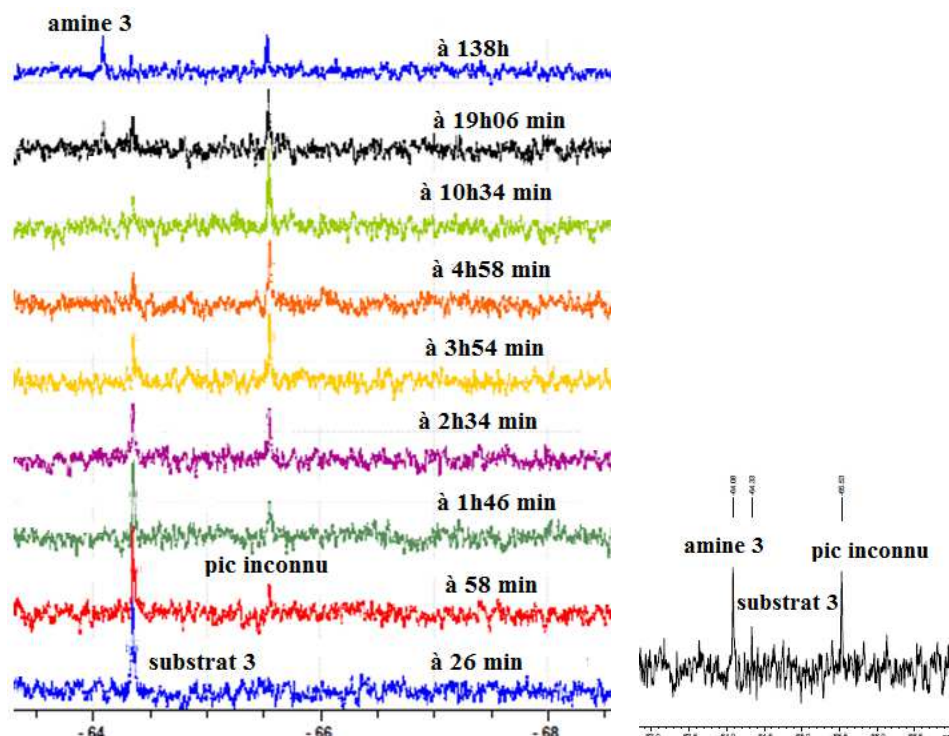


Figure 84: gauche) évolution dans le temps du substrat 3 avec le ratio 1/166000 de protéasome droite) agrandissement à 138 h

Différentes hypothèses ont été émises quant à l'origine du pic inconnu, l'une d'elles est que ce pic serait un conformère du substrat 3. La technique de choix pour vérifier la présence de conformères est de réaliser la RMN à différentes températures. On déplace ainsi l'équilibre dans la formation d'un conformère. Par conséquent, nous avons effectué la RMN du substrat 3 dans le tampon 100 mM Tris HCl sans protéasome à différentes températures. Lorsque le tube RMN est incubé à 37°C, au bout d'une heure, le pic inconnu est largement majoritaire par rapport à celui du substrat 3. Lorsque la température augmente et que l'on atteint les 47°C on voit le pic du substrat qui augmente. A 57°C les deux pics ont presque la même intensité et à 77°C seul le pic correspondant au substrat 3 est observé. En revenant à 37°C on observe la réapparition du pic inconnu (figure 85). Au vu de ces résultats, on peut conclure que le pic inconnu n'est qu'un conformère du substrat 3.

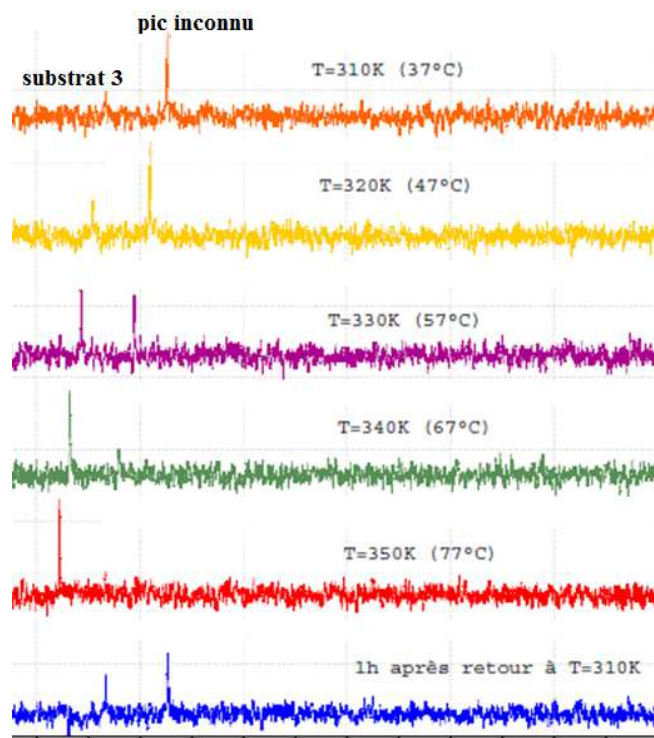


Figure 85 : Evolution du substrat 3 en fonction de la température

D'autres ratios tels que 1/10000 et 1/25000 protéasome/substrat ont aussi été testés. Si avec le ratio 1/25000 nous n'avons obtenu que 50% de conversion au bout de 23 heures, avec le ratio 1/10000 nous avons eu 90% de conversion en 20 heures.

Après ces tests sur les trois substrats fluorés synthétisés, nous avons décidé de travailler avec le substrat 3 pour la suite de nos expériences car sa structure est la plus proche du substrat utilisé classiquement dans les déterminations d' IC_{50} . De plus, le clivage du substrat 3 par le protéasome libérant un groupement fluorescent, ce substrat pourra donc aussi être utilisé pour déterminer et donc, confirmer les IC_{50} de nos molécules par fluorescence.

Pour la suite de nos expériences par RMN, nous avons aussi choisi d'utiliser le ratio 1/10000 car il permet une conversion presque totale du substrat et son coût de revient est raisonnable (environ 1 euro).

V.3. Application à la détermination des IC_{50} :

Disposant d'un substrat fluoré du protéasome, l'objectif est de l'utiliser pour déterminer l' IC_{50} de nos inhibiteurs par RMN du ^{19}F . Auparavant, il faut déterminer certains paramètres tels que la constance de Michaelis-Menten (K_m) ainsi que les vitesses initiales de la cinétique enzymatique de notre substrat 3 avec le ratio de un protéasome pour 10000 substrats. Grâce au substrat 3, nous pouvons déterminer ces paramètres par fluorescence puis par RMN du ^{19}F et ainsi comparer les deux méthodes.

V.3.a. Rappel sur la cinétique enzymatique:²⁰⁶

Lorsque l'on met en contact une enzyme (E) et son substrat (S), dans un premier temps, chaque molécule d'enzyme va se lier à une molécule de substrat pour former le complexe enzyme-substrat (ES). Ensuite, l'effet catalytique de l'enzyme transforme alors le complexe enzyme-substrat en produit (P) et libère l'enzyme pour d'autres réactions.



En mesurant la concentration du produit P en fonction du temps dans un milieu où il n'y a au temps t_0 que des molécules de l'enzyme et du substrat avec $[S] \gg \gg \gg [P]$, la réaction se déroule de façon non uniforme (figure 86):

- 1) On distingue une première phase très brève, au cours de laquelle la vitesse de la réaction est croissante. Durant cette phase, les molécules de substrat se lient avec l'enzyme : la concentration du complexe enzyme-substrat augmente. C'est la phase préstationnaire.
- 2) Lorsque toutes les molécules de l'enzyme sont occupées par des molécules du substrat, la vitesse de la réaction est maximum et reste constante tant que la concentration du substrat est grande et celle du produit petite. C'est la phase stationnaire, on l'appelle aussi vitesse initiale. Dans ces conditions, l'efficacité catalytique de l'enzyme est la plus grande, par conséquent la vitesse initiale est la plus grande de toutes les vitesses que l'on peut mesurer en fonction des phases de la

Chapitre II: Synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs du protéasome dérivés de scaffolds α et β hydrazino acides

réaction. Dans la suite des expériences, la vitesse étudiée sera toujours la vitesse initiale.

- 3) Lorsque la concentration du produit augmente, la réaction inverse commence à concurrencer celle que l'on mesurait : la vitesse diminue.
- 4) Enfin dans une dernière phase, tardive, la vitesse de la transformation inverse devient égale à celle de départ : les concentrations ne changent plus, on est à l'équilibre.

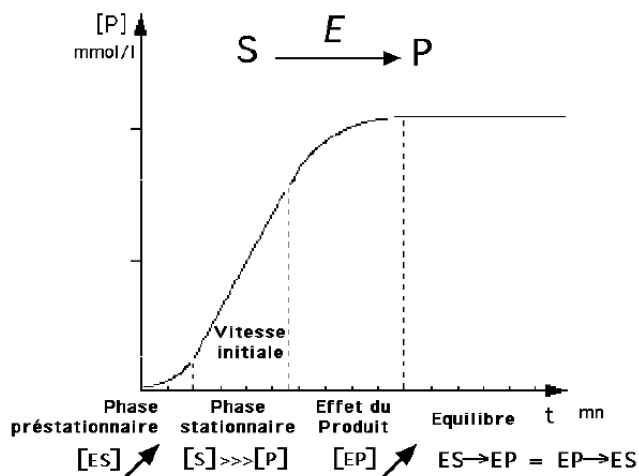


Figure 86: les différentes phases d'une réaction enzymatique

Maintenant, si on s'intéresse à l'évolution de la réaction lorsqu'on change cette fois-ci la concentration du substrat et que celle du protéasome reste fixe. Les mesures de la concentration du produit en fonction du temps sont différentes pour chacune des concentrations de substrat essayées. La vitesse initiale est proportionnelle à la concentration du substrat. Ainsi on peut déterminer une vitesse initiale pour chaque concentration de substrat.

La représentation graphique des vitesses initiales en fonction des concentrations du substrat montre que (figure 87):

- 1) Les vitesses mesurées croissent en fonction des concentrations du substrat. Mais cette relation n'est pas linéaire : le graphe de cette fonction est une hyperbole.
- 2) Lorsque la concentration du substrat est nulle, la vitesse est évidemment 0, donc l'hyperbole passe par l'origine du graphe. Lorsque la concentration du substrat tend vers l'infini, l'hyperbole se rapproche de son asymptote.

Chapitre II: Synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs du protéasome dérivés de scaffolds α et β hydrazino acides

La constante de Michaelis K_m correspond à la concentration de substrat pour laquelle on peut mesurer une vitesse initiale égale à la moitié de la vitesse maximum (V_{max}). K_m a la grandeur d'une concentration et représente l'affinité de l'enzyme pour son substrat. En comparant deux substrats possibles d'une enzyme, leurs K_m respectifs sont différents ($K_{m2} > K_{m1}$). Cela signifie que, pour atteindre V_{max2} , il faut une concentration en S2 supérieure à la concentration en S1 nécessaire pour atteindre V_{max1} par conséquent, S1 a plus d'affinité pour l'enzyme que S2.

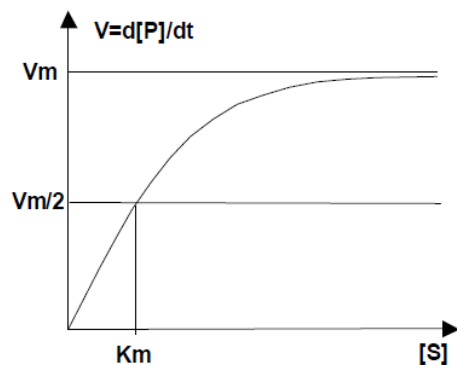


Figure 87 : courbe représentant les vitesses initiales en fonction des concentrations

Expérimentalement, il n'est pas possible de déterminer V_{max} , on ne connaît qu'une valeur approchée. En revanche on peut retrouver les deux valeurs importantes V_{max} et K_m grâce à différents traitements mathématiques:

a) Lineweaver et Burk:

C'est une méthode d'analyse qui implique la représentation en double inverse : $1/V = f(1/S)$ (figure 88). Le problème principal de cette méthode est la prépondérance accordée aux valeurs les plus faibles de S et de V, pour lesquelles l'incertitude est pourtant la plus grande. Elle peut conduire à des estimations fausses. Elle ne devient intéressante que pour des valeurs de $[S]$ élevées, donc dans des conditions « saturantes ».

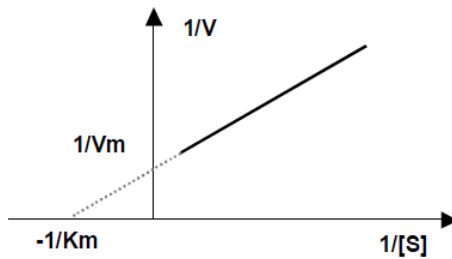


Figure 88: courbe obtenue après la linéarisation de Lineweaver et Burk

b) Hanes – Woolf

On utilise alors la relation : $\frac{[S]}{v} = \frac{1}{v_m} [S] + \frac{K_m}{v_m}$ La droite a une pente de $1/V_m$, dont l'extrapolation donne $-K_m$ à l'intersection avec l'axe des abscisses.

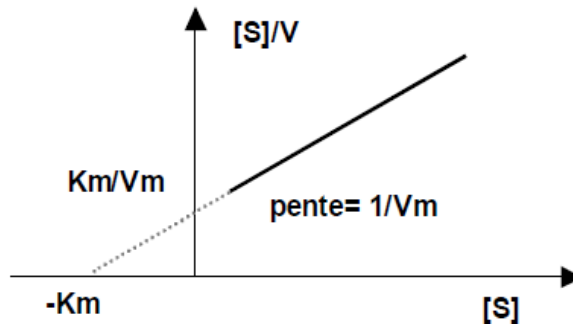


Figure 89: courbe obtenue après la linéarisation de Hanes – Woolf

c) Eadie – Hofstee:

La relation utilisée est l'inverse de la précédente. La pente est $-1/K_m$, les intersections avec les axes donnent $V_m/[S]$ et V_m .

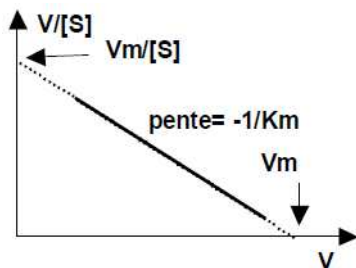


Figure 90: courbe obtenue après la linéarisation Eadie – Hofstee

d) La représentation de Schwarzenbach:

C'est une méthode purement graphique : on reporte sur l'axe des abscisses les valeurs de $-[S]$ et sur celui des ordonnées celles de V (pour des couples $S(i)/V(i)$ de résultats expérimentaux), et les droites se coupent en un point d'abscisse K_m et d'ordonnée V_m .

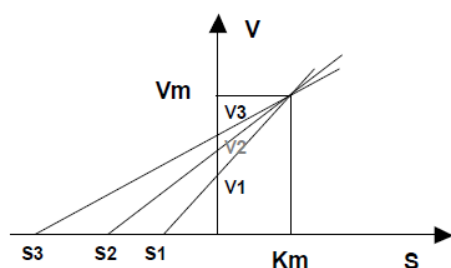


Figure 91: courbe obtenue après la linéarisation de Schwarzenbach

V.3.b. Détermination du K_m par fluorescence:

Détermination des λ_{exc} et λ_{em} de la 7-amino-4-trifluorométhylcoumarine (AFC)

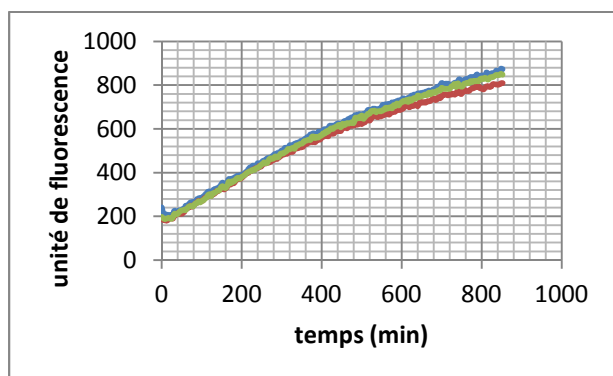
Le clivage du substrat fluoré 3 libère la 7-amino-4-trifluorométhylcoumarine (AFC) qui peut être dosée par fluorescence, ce qui nous permet de déterminer le K_m de notre substrat fluoré par fluorescence. Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de la 7-amino-4-trifluorométhylcoumarine (AFC) décrites dans la littérature (365 et 490 nm respectivement).^{207,208} Pour réaliser cette expérience, on est parti d'une solution de AFC à 0,1 μM dans le tampon 100 mM Tris HCl a été utilisée pour cette expérience. En fixant les longueurs d'excitations entre 350 et 370 nm, la longueur d'onde maximum d'émission obtenue est de 490 nm. La meilleure réponse est obtenue lorsque la longueur d'onde d'excitation est fixée à 360 nm. La longueur d'onde d'excitation obtenue est de 363 nm lorsque l'émission est fixée entre 440 et 490 nm avec un maximum de réponse à 490 nm. Par conséquent, les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de la 7-amino-4-trifluorométhylcoumarine sont 363 et 490 nm ce qui est cohérent avec les données de la littérature (365 et 490 nm). Pour des raisons pratiques, nous avons décidé d'utiliser en fluorescence des filtres ayant des λ_{exc} et λ_{em} à 360 et 480 nm respectivement. En effet, les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission du substrat non fluoré étant respectivement de 360 et 460 nm, nous pouvons ainsi utiliser les mêmes filtres en fluorescence quelque soit le substrat utilisé.

Détermination du K_m du substrat non fluoré :

Dans le but de valider notre protocole expérimental, nous avons essayé de retrouver le même K_m que celui décrit par l'équipe du Pr Reboud pour le substrat non fluoré Suc-LLVY-AMC. Cette expérience a été réalisée dans une microplaque 96 puits avec une concentration finale de protéasome 20S de lapin de 0,3 nM dans un tampon 20 mM Tris, 1 mM DTT, 10% glycerol, 0.02% (w/v) SDS. A cette solution de protéasome est ajouté le substrat Suc-LLVY-AMC préalablement dissout dans le DMSO. La quantité finale de DMSO dans les préparations est de 2% v/v dans un volume final de 200 μ l. Les concentrations de substrat ajoutées varient entre 10 et 90 μ M. La fluorescence émise est mesurée toutes les deux minutes avec un lecteur de plaque (Fluostar Optima, BMG Labtech) thermostaté à 37°C.

L'intensité de la fluorescence émise est proportionnelle à la quantité de produit formé. Ainsi, pour chaque concentration de substrat, la courbe représentant l'unité de fluorescence en fonction du temps permet de déterminer la vitesse initiale. Un exemple de courbe obtenue avec 20 μ M de substrat est donné figure 92. Par souci de reproductibilité, chaque expérience est effectuée en triplicate.

a)



b)

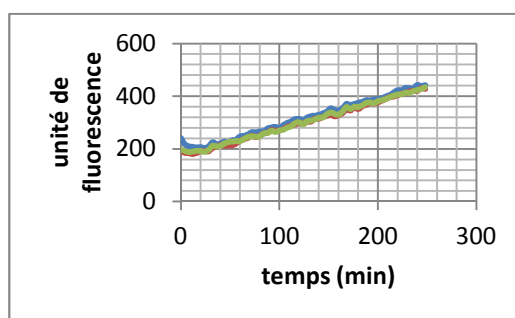


Figure 92 : a) courbe représentant l'intensité de fluorescence en fonction du temps pour une concentration de 20 μ M de substrat (Suc-LLVY-AMC) ($V_i = 1,06$ unité de fluorescence/min), b) agrandissement de 0 à 250 min

Enfin, pour déterminer la valeur de K_m nous avons utilisé la linéarisation de Lineweaver et Burk, ce qui nous a conduits à une valeur de **55 μ M**. Cette valeur est cohérente avec celle donnée par l'équipe du Pr Reboud comprise entre **50 et 60 μ M**, ce qui valide notre protocole expérimental.

Détermination du K_m du substrat fluoré 3:

Nous avons appliqué le même protocole décrit précédemment avec le substrat non fluoré pour déterminer le K_m du substrat fluoré 3. Cette fois la concentration finale de protéasome est fixée à 5 nM (pour être proche du ratio 1/10000 protéasome/substrat choisi pour la RMN), les concentrations de substrat fluoré 3 varient entre 10 et 90 μ M avec une quantité finale de DMSO à 2% v/v. Pour être dans les mêmes conditions que la RMN, nous avons utilisé le tampon Tris HCl 100 mM à la place du tampon 20 mM Tris, 1 mM DTT, 10% glycérol, 0.02% (w/v) SDS. Nous avons obtenu une valeur de K_m comprise entre **40 et 45 μ M**.

V.3.c. Détermination du K_m par RMN du fluor:

Après avoir déterminé la valeur de K_m de notre substrat fluoré par fluorescence, l'étape suivante est de vérifier si on retrouve la même valeur en RMN du ^{19}F . Cette expérience a été réalisée dans un tube RMN avec une concentration finale de protéasome à 5 nM dans un volume final de 400 μ L d'un tampon 100 mM Tris HCl. A cette solution de protéasome est ajoutée une quantité de substrat 3 préalablement dissout dans le DMSO de façon à avoir une quantité finale de DMSO de 5% v/v. Les concentrations de substrat testées varient entre 30 et 90 μ M. Les expériences de RMN sont effectuées à 37°C à l'aide d'un appareil Bruker Avance 400 MHz dont la fréquence en RMN du ^{19}F est de 376 MHz avec un nombre de scan de 256. Les acquisitions sont effectuées toutes les 21 min et les spectres analysés avec le logiciel TOPSPIN 2.1 (Bruker).

Ainsi pour chaque concentration, la courbe représentant l'intensité du pic du produit en fonction du temps permet de déterminer la vitesse initiale. Un exemple de courbe obtenue avec une concentration de 90 μ M de substrat 3 est reporté sur la figure 93.

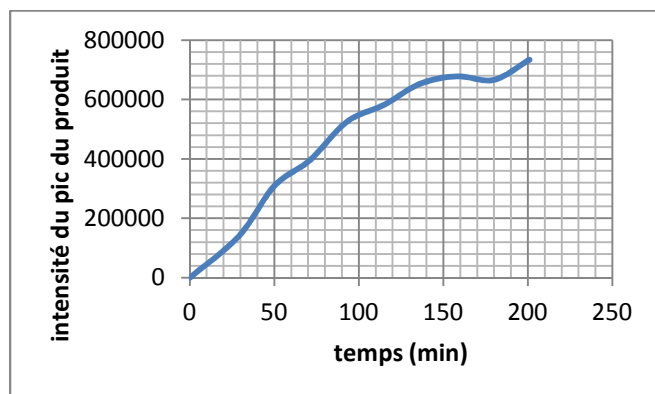


Figure 93 : courbe représentant l'intensité du pic du produit en fonction du temps avec une concentration de 90 μM de substrat 3.

Comme on peut le remarquer, cette courbe n'est pas aussi linéaire que celle obtenue en fluorescence. Ceci est dû à la grande sensibilité de la fluorescence et à sa rapidité de mesure (2 min contre 21 min en RMN du ^{19}F). Une autre limitation de la RMN est que les vitesses initiales des concentrations inférieures à 30 μM ne sont pas déterminées. En effet, dans nos conditions expérimentales, la limite de quantification est de 30 μM . Pour des concentrations plus faibles il faudrait un appareil beaucoup plus performant. Néanmoins, nous avons pu déterminer le K_m en utilisant la linéarisation de Lineweaver (l'inverse des vitesses initiales en fonction de l'inverse de la concentration). On a ainsi obtenu une valeur de K_m comprise entre **30 et 35 μM** .

V.4. Détermination de l' IC_{50} :

V.4.a. Par fluorescence:

Dans un premier temps, nous avons décidé de déterminer l' IC_{50} de nos molécules par fluorescence en suivant le protocole décrit par l'équipe du Pr Reboud (ratio 1/166000 de protéasome/substrat dans le tampon le tampon 20 mM Tris, 1 mM DTT, 10% glycerol, 0.02% (w/v) SDS). Nous avons choisi le composé **125a** dont l' IC_{50} est connue dans le but de valider de notre protocole. Dans une microplaque de 96 puits, le protéasome 20S du lapin (0,3 nM) est incubé avec différentes concentrations (de 0,1 μM à 100 μM) du composé **125a** pendant 15 min à 37°C. Un test contrôle sans composé **125a** est réalisé parallèlement. Le substrat non

Chapitre II: Synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs du protéasome dérivés de scaffolds α et β hydrazino acides

fluoré Suc-LLVY-AMC est ensuite ajouté de manière à avoir une concentration finale de 50 μM . Pour chaque concentration d'inhibiteur **125a**, la fluorescence émise est mesurée en fonction du temps ce qui permet de déterminer la vitesse initiale. Le pourcentage d'inhibition pour chaque concentration d'inhibiteur est obtenu grâce à l'équation suivante :

$$\% \text{ inhibition} = 100 \times \left(1 - \frac{V_i}{V_o}\right)$$

Avec V_i et V_o représentant les vitesses initiales avec et sans inhibiteur.

La représentation graphique du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration a permis de trouver la valeur de l' IC_{50} qui est de 5 μM (figure 94). Cette valeur est proche de celle obtenue par l'équipe du Pr Reboud qui est de 1,1 μM , ce qui valide notre protocole expérimental.

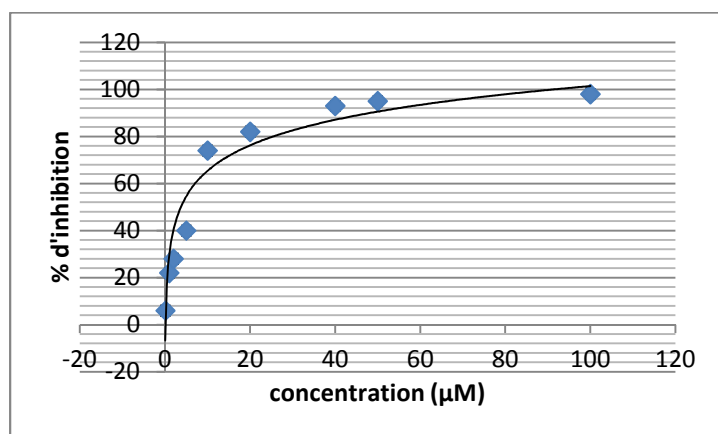


Figure 94: pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de la molécule **125a**.

Nous avons ensuite utilisé ce protocole en remplaçant le substrat Suc-LLVY-AMC par le substrat fluoré 3 en gardant exactement les mêmes concentrations que précédemment. Malheureusement, cette expérience n'a pas marché. En effet dans ces conditions nous n'avons pas obtenu de pente en fluorescence permettant la détermination de la vitesse initiale (figure 95).

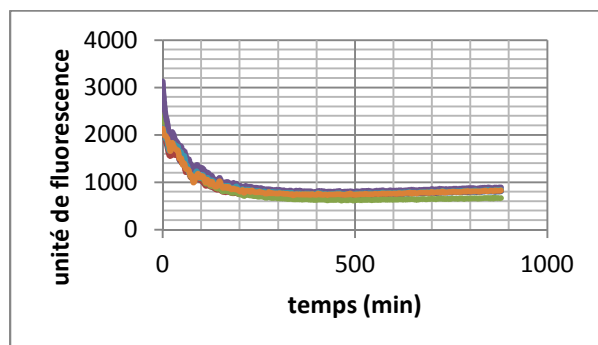


Figure 95: courbe obtenue avec le substrat fluoré 3 ($50\mu\text{M}$) en présence de protéasome (0.3 nM) dans le tampon 20 mM Tris , 1 mM DTT , 10% glycérol, 0.02% (w/v) SDS.

Nous avons émis deux hypothèses : le premier étant que le substrat fluoré 3 serait moins affiné du protéasome que le substrat non fluoré Suc-LLVY-AMC, et le deuxième serait que le clivage du substrat fluoré est plus lent dans le tampon 20 mM Tris , 1 mM DTT , 10% glycérol, 0.02% (w/v) SDS. Pour vérifier la première hypothèse, nous avons augmenté la quantité de protéasome (ratio $1/10000$ protéasome/substrat 3 condition de la RMN à la place de $1/166000$) et refait l'expérience dans le même tampon à savoir 20 mM Tris , 1 mM DTT , 10% glycérol, 0.02% (w/v) SDS. Cette fois-ci nous avons obtenu un IC_{50} compris entre **4 et 6 μM** (même valeur que celle obtenue précédemment). La deuxième hypothèse a été vérifiée en effectuant l'expérience de fluorescence dans les conditions du Pr Reboud ($1/166000$ protéasome/substrat) mais cette fois-ci dans le tampon 100 mM Tris à la place du tampon le tampon 20 mM Tris , 1 mM DTT , 10% glycérol, 0.02% (w/v) SDS. En comparant la courbe obtenue dans ce tampon (figure 96) à celle obtenue dans le tampon 20 mM Tris , 1 mM DTT , 10% glycérol, 0.02% (w/v) (figure 96), on remarque que le clivage est plus efficace dans ce tampon. En effet, dans cette nouvelle condition, on obtient une pente en fluorescence permettant le calcul de la vitesse initiale.

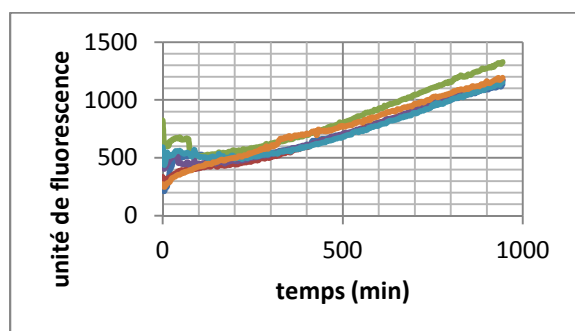


Figure 96: courbe obtenue avec le substrat fluoré 3 ($50\mu\text{M}$) en présence de protéasome (0.3 nM) dans le tampon 100 mM Tris.

Cette dernière hypothèse a aussi été vérifiée par RMN du fluor, en effet, avec le même ratio ($1/10000$) la quantité de produit formée dans le tampon 100 mM Tris HCl est beaucoup plus élevée que celle dans le tampon 20 mM Tris, 1 mM DTT, 10% glycérol, 0.02% (w/v) SDS au même moment (figure 97). En effet si on regarde la figure 97, à 2 heures on voit l'apparition de l'amine dans le tampon 100 mM Tris HCl et rien dans le tampon 20 mM Tris, 1 mM DTT, 10% glycérol, 0.02% (w/v) SDS. A 6 heures d'incubation, l'amine est majoritaire dans le tampon Tris 100 mM et la conversion est totale à 18 heures. Dans le tampon 20 mM Tris, 1 mM DTT, 10% glycérol, 0.02% (w/v) SDS le substrat reste majoritaire même après 18 heures d'incubation. Ces observations mettent en évidence l'influence du tampon dans l'activité du protéasome.

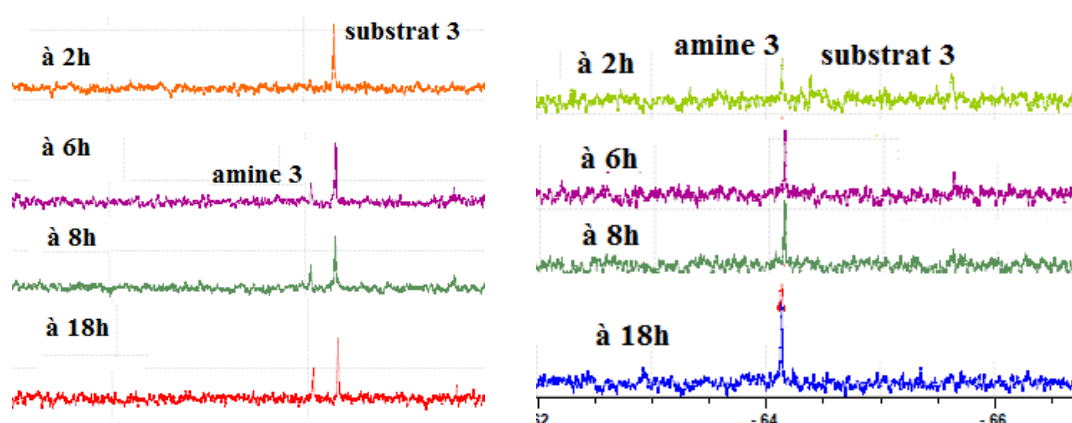


Figure 97: gauche) évolution du substrat 3 dans le tampon 20 mM Tris, 1 mM DTT, 10% glycérol, 0.02% (w/v) SDS avec un ratio $1/10000$. Droite) substrat 3 dans le tampon 100 mM Tris HCl.

Au vue de ces résultats, on peut donc déduire que le substrat fluoré est moins affiné du protéasome que le substrat Suc-LLVY-AMC, mais aussi que le clivage est plus rapide dans le tampon 100 mM Tris que dans le tampon 20 mM Tris, 1 mM DTT, 10% glycérol, 0.02% (w/v) SDS.

V.4.b. Par RMN du ^{19}F :

Comme nous avons pu constater précédemment qu'avec un ratio de 1 protéasome pour 10000 substrats dans le tampon 20 mM Tris, 1 mM DTT, 10% glycerol, 0.02% (w/v) SDS le clivage est trop lent car l'amine formée n'est quantifiable qu'au bout de 8 h. Et, sachant que dans les mêmes conditions, le clivage est plus rapide dans le tampon 100 mM Tris HCl, nous avons décidé d'utiliser ce tampon pour la détermination des IC_{50} .

Malheureusement, dans ces conditions nous avons obtenu seulement 60% d'inhibition avec une concentration d'inhibiteur à 100 μM . Notre hypothèse est que le tampon 100 mM Tris HCl combiné à la concentration élevée de protéasome entraîne un clivage trop rapide du substrat.

Ce résultat est confirmé par la fluorescence ; en effet les pentes obtenues avec le ratio 1/10000 dans le tampon 100 mM Tris HCl sont trop raides et ne permettent pas d'avoir une différence de vitesse initiale en présence ou en absence d'inhibiteurs.

V.5. Conclusion et perspectives:

Nous avons développé de nouveaux substrats fluorés du site chymotrypsine du protéasome 20S. Nous avons validé par RMN du fluor que ces substrats sont reconnus et clivés par le protéasome. Nous avons déterminé la valeur du K_m de notre substrat fluoré par RMN et comparé avec celle obtenue en fluorescence et, nous avons obtenu des valeurs similaires (40-45 μM en fluorescence et 30-35 μM en RMN du ^{19}F). Les premiers essais de détermination de l' IC_{50} de nos molécules n'ont pas marché car le clivage est trop rapide dans le tampon 100 mM Tris HCl. Nous allons essayer d'autres ratios avec moins de protéasome pour ralentir le clivage.

VI. Conclusion du chapitre II :

A notre connaissance, les scaffolds α -hydrazino acide ont été très peu utilisés en chimie médicinale et presque pas dans les inhibiteurs de protéase. Quant au motif β -hydrazino acide, pratiquement aucun exemple ne mentionne leur incorporation dans les peptidomimétiques. Au laboratoire, nous avons confirmé que les structures comportant les motifs α et β -hydrazino acides peuvent mimer les structures secondaires des α -peptides natifs. Pour preuve, ces motifs ont été introduits dans une librairie de 50 molécules dont les potentiels inhibiteurs du protéasome ont été testés. Nous avons mis au point une synthèse facile et efficace de pseudopeptides possédant les motifs α et β -hydrazino acides. Ces molécules inhibent de manière efficace le site CT-L du protéasome 20S du lapin avec une IC_{50} de l'ordre du submicromolaire pour le composé **125b**. Nous avons ainsi démontré que l'activité biologique n'est pas modifiée par l'incorporation de scaffolds α et β -hydrazino acides.

La pharmacomodulation effectuée autour de ces motifs nous a permis d'établir des relations structure-activité. Nous pouvons conclure que: i) les composés possédant le groupement phénoxyphényl sur la partie 1 sont légèrement plus efficaces comme prédit par Furet *et al.*¹⁰⁷ ii) la présence de la lysine sur la partie 2 augmente considérablement l'activité inhibitrice iii) la presque totale suppression du caractère peptidique par l'introduction du groupement 3,4,5-triméthoxybenzylamine à la place de la phénylalanine n'est pas délétère pour l'activité inhibitrice.

Nous avons aussi mis au point un modèle de docking assez fiable qui va nous permettre de prédire le potentiel inhibiteur de nos futures molécules.

Enfin, la détermination de l' IC_{50} de nos molécules en utilisant la technique du FABS en RMN du ^{19}F a été tentée sans succès pour le moment. Cette technique est en cours d'optimisation.

I. Objectifs :

Nous allons décrire dans ce chapitre la synthèse des motifs aminoacide cyclopropane trifluorométhylés, et de N-aminoaziridine fluorés. Nous nous sommes intéressés à ces motifs pour quatre raisons :

- 1) Les *amino acides cyclopropane* non fluorés ont été synthétisés et décrits dans la littérature. En effet, le motif cyclopropane est largement présent dans les produits naturels et les composés bioactifs.^{209,210,211,212} Par ailleurs, grâce à leur petite taille et leur structure contrainte, l'incorporation de ce motif dans des molécules bioactives rigidifie ces dernières, à l'instar des peptidomimétiques. L'intérêt de ces amino acides cyclopropane sera décrit dans le paragraphe 2 de ce chapitre.
- 2) Les profonds changements qu'apportent l'incorporation de groupement fluoré dans les molécules bioactives a déjà été bien détaillée dans le chapitre 1. Par conséquent, les *cyclopropanes trifluorométhylés* ont été très utilisés comme building blocks en chimie médicinale. Ils ont d'ailleurs montré leur intérêt dans les récepteurs antagonistes de cannabinoïdes CB₁²¹³, les antagonistes de l'intégrine VLA-4²¹⁴, les inhibiteurs de la polymérase HCV NS5B²¹⁵, les analgésiques non opoïdiens²¹⁶ et les activateurs du canal potassique.²¹⁷ D'une manière générale, nous avons vu dans le chapitre I que les peptidomimétiques contraints fluorés sont très peu développés. A notre connaissance, les *amino acides cyclopropane trifluorométhylés* n'ont été que très peu décrits dans la littérature. Pour résumer, il n'existe principalement que trois régioisomères de cyclopropane trifluorométhyle amino acide décrits dans la littérature (figure 98) :
 - Les analogues cyclopropanes fluorés de la proline **156a** et **156b** utilisés comme marqueur fluoré pour l'étude de la pénétration cellulaire de peptides riches en proline.²¹⁸
 - L'acide *cis* ou *trans* trifluoronorcoronamique **157**.²¹⁹
 - Un analogue de l'acide gamma amino butyrique **158**.²²⁰

Ces trois scaffolds sont généralement synthétisés par une réaction d'addition des composés diazo trifluorométhylés sur des alcènes catalysée par un métal. Une autre méthode de synthèse de l'acide trifluoronorcoronamique B à partir d'un époxyde

trifluorométhyle a été décrite.²²¹ Ces scaffolds n'ont pas été introduits dans des structures peptidiques.

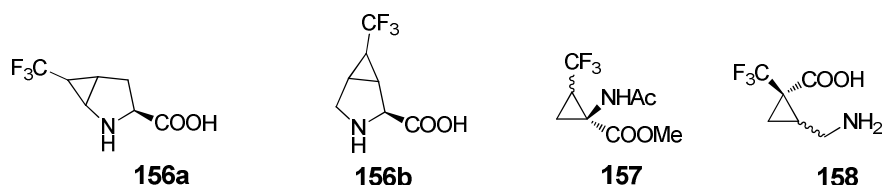


Figure 98: acide 3-trifluorométhyl 2-aminocyclopropanecarboxylique

- 3) A notre connaissance les *N*-aminoaziridines non fluorés et fluorés n'ont pas été exploités en chimie médicinale.
- 4) Au vue de nos résultats de modélisation moléculaire, l'incorporation de ces deux motifs contraints cyclopropaniques et *N*-aminoaziridine dans nos inhibiteurs du protéasome devrait permettre une meilleure orientation des groupements encombrants vers les poches S1 et S3. Par ailleurs, l'incorporation d'unités cyclopropaniques dans des structures peptidomimétiques peut permettre une structuration en brin β (voir paragraphe 2). Cette particularité nous intéresse car comme nous l'avons vu dans le chapitre I, les inhibiteurs du protéasome se lient aux sites actifs en adoptant dans leur partie centrale une structure en brin β pour former un feuillet β avec les résidus 21 à 23 d'un côté et les résidus 47 à 49 de l'autre côté.

En partant de la molécule **68b** synthétisée au laboratoire et ayant une bonne activité inhibitrice du protéasome, nous avons pensé remplacer le motif β -hydrazino acide par une structure contrainte fluorée tels que les cyclopropanes et *N*-aminoaziridines fluorés (figure 99)

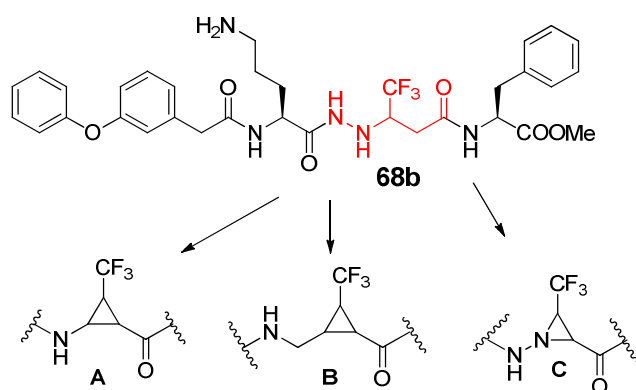


Figure 99: structure de la molécule **68b** et de ses analogues cyclopropaniques et *N*-aminoaziridine

Nous avons donc envisagé la synthèse des molécules **159**, et **160**. Ces molécules contiennent soit les motifs cyclopropane trifluorométhylés, soit le *N*-aminoaziridine trifluorométhyle dans la partie centrale, le groupement phénoxyphényle dans la partie 1, la lysine dans la partie 2 et enfin la phénylalanine sur la partie 4. Les résultats du docking de la molécule **159** ont montré que deux diastéréoisomères sur quatre avaient une bonne interaction avec le site chymotrypsine. En effet, le diastéréoisomère **159_SSSSS** contracte des liaisons hydrogènes avec des résidus clés tels que la Thr21, le Trp107, la Ser129 et Asp 125. De plus, le cyclopropane contraint le groupement trifluorométhyle à occuper la poche S1, la poche S3 est occupée par la lysine et enfin, les poches AS1 et AS2 sont occupées par le phénoxyphényle (figure 100). Quant au diastéréoisomère **159_SRRRS**, il effectue des liaisons hydrogènes avec Thr1, Thr21, Lys33 et Asp125. Cette fois ci c'est le groupement phényle qui occupe la poche S1 tandis que les poches S3, AS1 et AS2 sont toujours occupés par la lysine, et le groupement phénoxyphényle (figure 101).

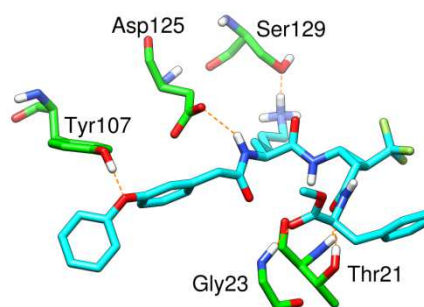
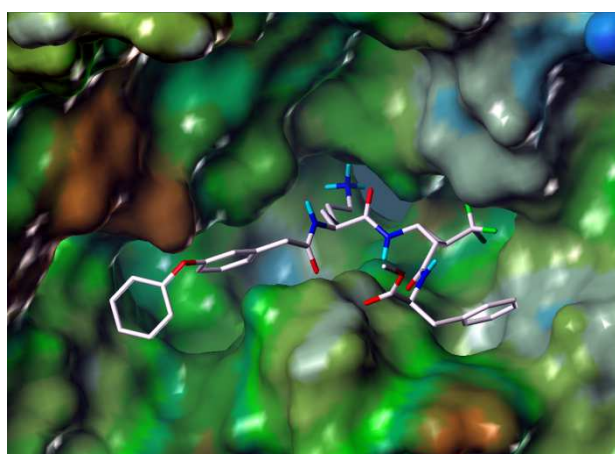
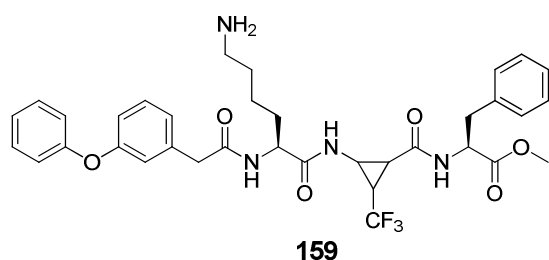


Figure 100: image de docking du peptidomimétique contraint **159_SSSSS**

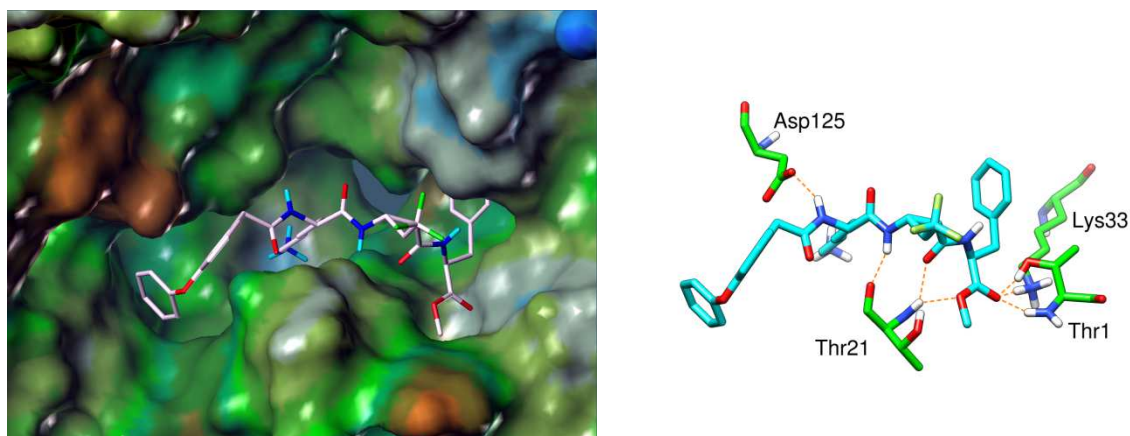


Figure 101: image de docking du peptidomimétique contraint **159_SRRRS**

Le docking avec le composé contenant le motif cyclopropane trifluorométhylé **B** n'a pas encore été réalisé. Par ailleurs, les études de modélisation moléculaire de la molécule **160** comportant le motif *trans* *N*-aminoaziridine trifluorométhylé ont montré que ce composé se positionne bien dans le site actif en contractant des liaisons hydrogènes avec quatre des acides aminés clés (Thr21, Gly47, Asp125). Les poches S1, S3, AS1 et AS2 sont occupées par le phényle, la lysine et le phénoxyphényle (figure 102).

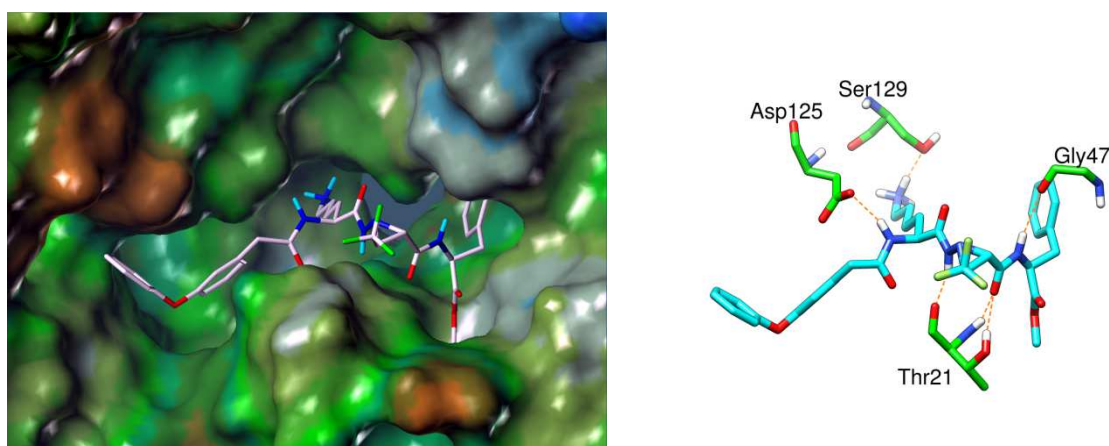
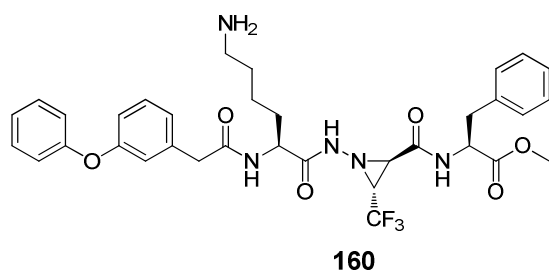


Figure 102: exemple de molécule cible *N*-aminoaziridine et résultats du « docking »

II. Rappels sur les structures peptidiques contenant un motif cyclopropane non fluoré :

II.1. Les peptidomimétiques contraints :

La détermination de la structure du complexe ligand-récepteur dans les peptides bioactifs est fondamentale dans la conception de nouveaux médicaments. Cependant, cette étude rencontre un obstacle majeur dû à la grande flexibilité des peptides naturels. Par conséquent, le développement de peptidomimétiques contraints dans le but de déterminer la conformation bioactive d'une molécule a connu un grand essor ces dernières années.^{164,222-225} Les acides aminés cycliques permettent également de maintenir le caractère hydrophobe des chaînes alkyles linéaires.²²⁶ Par ailleurs, les peptidomimétiques contraints sont aussi utilisés pour promouvoir la formation de structures secondaires (hélice α , feuillet β et coudes).^{227,228,229,230} Diverses approches ont été utilisées pour développer les peptidomimétiques contraints. Parmi lesquels on peut citer l'utilisation de proline et ses dérivés connus pour prévenir la formation d'hélice α et promouvoir la formation de coudes β dans les structures peptidiques.^{231,232} Les peptidomimétiques contraints sont également obtenus par le remplacement de la liaison peptidique par des isostères contraints tels que des alcènes¹⁷⁰ ou un groupement triazole^{233,234}. En effet le groupement triazole est facilement introduit dans une structure peptidomimétique par une réaction de chimie click entre un azide et une fonction alcyne. Ainsi il a été démontré par étude cristallographique que la fonction triazole de l'analogue **161** de l'amprénavir (un inhibiteur de la protéase du VIH-1) occupe la même position que la fonction amide de l'amprénavir (figure 103).²³⁵

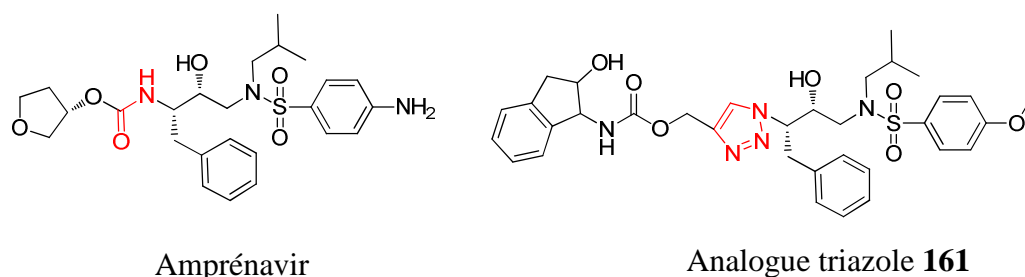
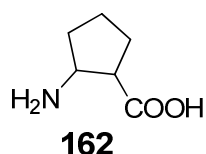
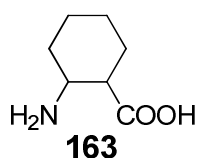


Figure 103: structure de l'amprénavir et son analogue triazole.

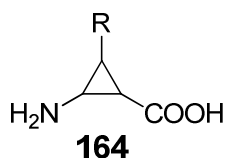
L'utilisation de β amino acides contraints tels que **162**, **163**, **164** et **165** lors de la synthèse peptidique permet d'obtenir des peptidomimétiques contraints (figure 104). Ainsi les contraintes induites par ces amino acides favorisent la formation de foldamères en hélice α .^{236-238,239} Gellman et Seebach²⁴⁰ ont démontré que les structures en hélices α adoptées par les β peptides sont plus stable que celles adoptées par les α peptides.



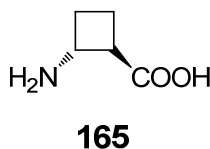
Acide aminocyclopentanecarboxylique



Acide aminocyclohexanecarboxylique



Acide aminocyclopropanecarboxylique



Acide aminocyclobutanecarboxylique

Figure 104: structure de différents β amino acides.

Nous nous sommes particulièrement intéressés aux peptidomimétiques contenant le motif cyclopropane. En effet, de par leur petite taille et leur structure rigide, les cyclopropanes sont des motifs très intéressants pour induire une restriction conformationnelle qui pourrait améliorer l'activité des molécules bioactives.²¹¹

II.2. Voie d'accès aux peptidomimétiques cyclopropaniques :

Depuis son isolation dans les jus de pommes et de poires par Burroughs²⁴¹ et, son identification comme intermédiaire biosynthétique de l'éthylène²⁴², l'acide 1-amino-1-cyclopropane carboxylique (ACC) également appelé le 2,3-méthano amino acide et ses dérivés sont utilisés pour concevoir des structures peptidomimétiques.^{243,244} La synthèse énantiosélective de ce motif a été réalisée en utilisant des auxiliaires chiraux tels que le Bislactim éther de Schölkopf²⁴⁵, la 1,3-oxazolidine de Husson²⁴⁶ et les auxiliaires dicetopiperazine²⁴⁷. Au même moment plusieurs dérivés ayant des chaînes latérales fonctionnalisées, obtenus à partir de lactones ou de mannitol énantio-purs, ont aussi été décrits.²⁴⁸ Quelques exemples de dérivés de l'ACC sont résumés dans la figure 105.

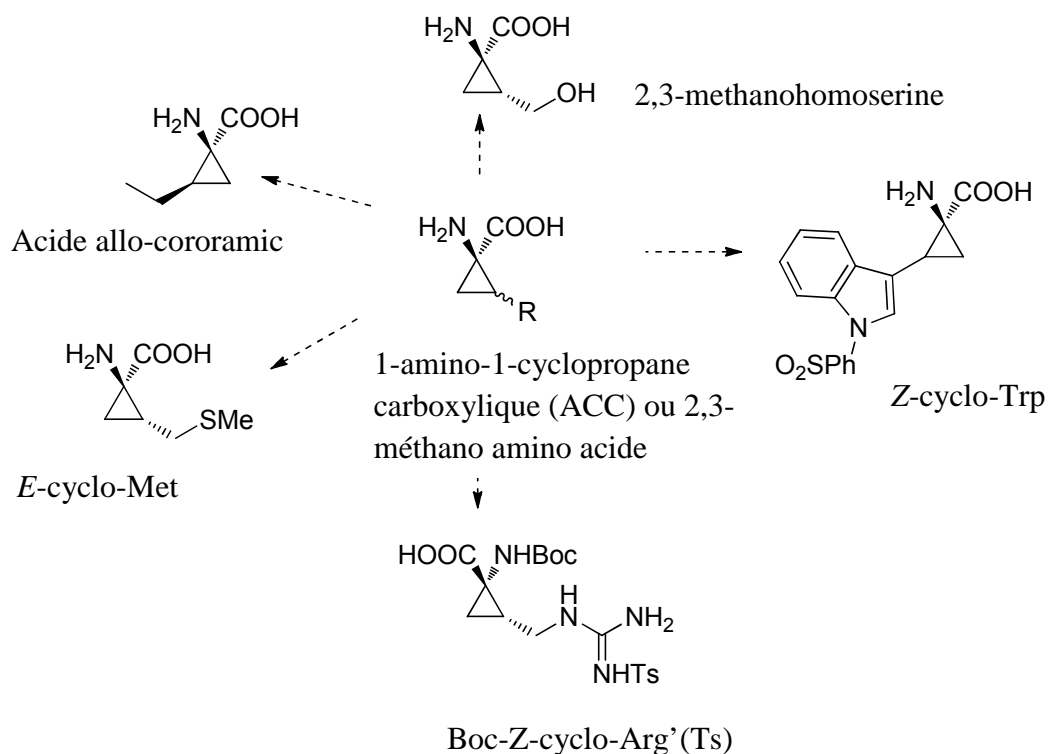


Figure 105: structures de l'acide 1-amino-1-cyclopropane carboxylique (ACC) acide et de quelques dérivés

L'ACC a ainsi servi de produit de départ pour la synthèse du 1-cyclopropylquinolone contraint **166** ainsi que pour celle de ses analogues **167** et **168** (figure 106). Ces molécules possèdent une activité inhibitrice de l'ADN gyrase et sont des potentiels antibactériens *in vivo*. Cependant leurs activités restent inférieures à celles des analogues ne possédant pas de structure cyclopropanique (Ciprofloxacine et Ofloxacine) (figure 106).²⁴⁹

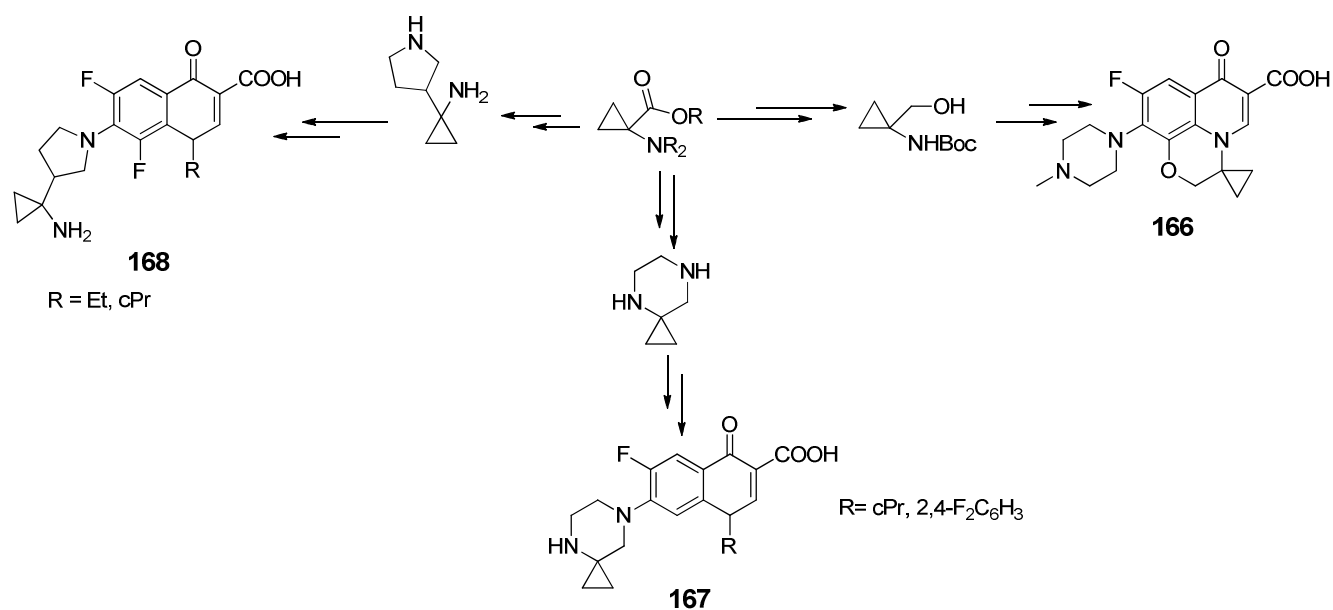


Figure 106 : utilisation de l'ACC comme produit de départ dans la synthèse de composés bioactifs (analogue de la Ciprofloxacin et de Ofloxacin).

L'analogue β de l'ACC : l'acide β -aminocyclopropane (β -ACC) a également été utilisé dans des peptidomimétiques contraints (figure 107). En effet, la stabilisation conformationnelle de la partie C terminale est importante pour une bonne activité biologique des substances neuropeptides. Ainsi, la rigidification de cette partie par l'incorporation de cyclopropane β amino acide a permis d'augmenter la sélectivité et l'affinité pour le récepteur du neuropeptide Y₁ ($K_i = 29$ nM pour Y₁, 118 nM pour Y₅ et pas d'activité pour les autres récepteurs NPY).²⁵⁰

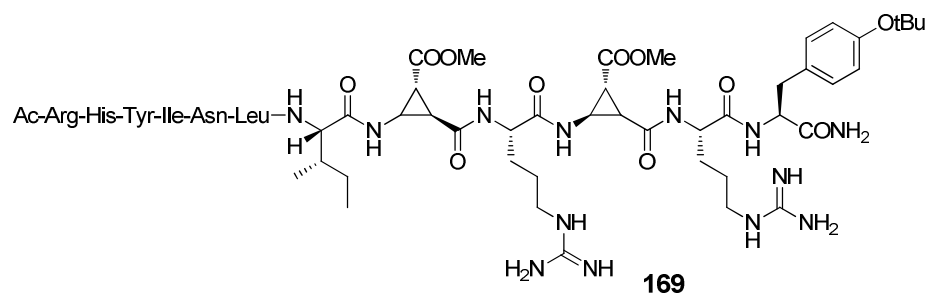


Figure 107 : structure de la partie C-terminale d'un analogue du neuropeptide Y₁

II.3. Les cyclopropanes comme isostères de dipeptides :

Les cyclopropanes peuvent également servir de mimes de dipeptides.²⁵¹ En effet, leur structure contrainte oriente la chaîne latérale dans une direction spécifique tout en contraignant la chaîne principale dans une conformation bien définie.

Le premier type d'isostère est obtenu par la substitution de l'azote de la fonction amide par un carbone, et la formation de liaison entre ce carbone et le carbone β de la chaîne latérale d'un acide aminé conduisant aux isostères **170** et **171** (figure 108).²⁵² Dans le cas de l'isostère **170**, l'acide aminé en position *N*-terminale et le groupement R sont cis, par conséquent ils occupent à peu près la même région dans l'espace. Dans ce cas, l'isostère **170** mime le conformère gauche (-) ainsi l'angle χ_1 est de -60° . De même, dans l'isostère **171** le groupement R est cis avec l'acide aminé en position C-terminale ce qui en fait un mime de conformère gauche (+) avec un angle χ_1 de $+60^\circ$ (figure 108).²⁵²

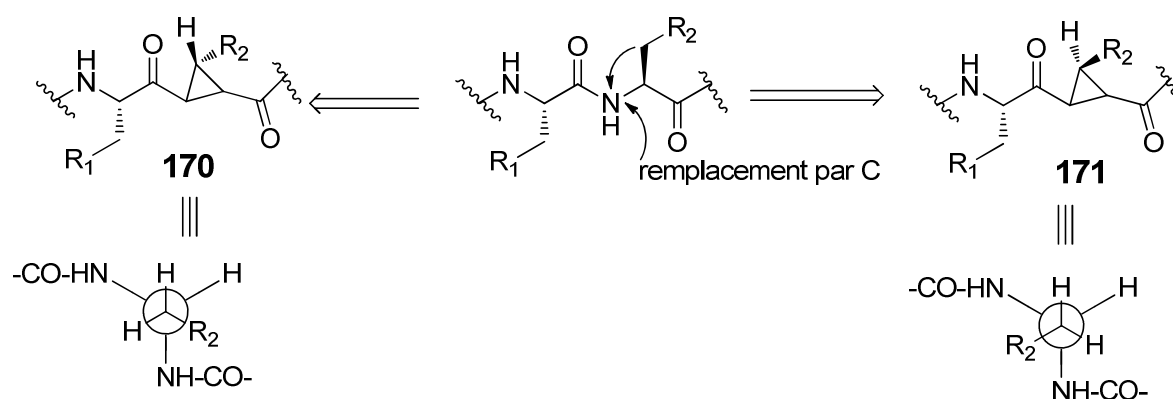


Figure 108 : isostère par substitution de l'amine de la fonction amide par un carbone

Le second type d'isostère provient de la formation d'une liaison entre le carbone β et le carbone du carbonyle du côté C-terminal et la transformation de ce dernier en carbone tétraédrique.²⁵³ Cette contrainte entraîne le positionnement du résidu de la chaîne latérale en anti par rapport à la chaîne principale avec un angle de $\pm 180^\circ$ (figure 109).

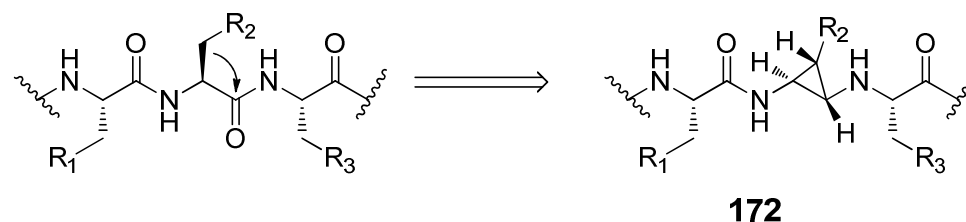
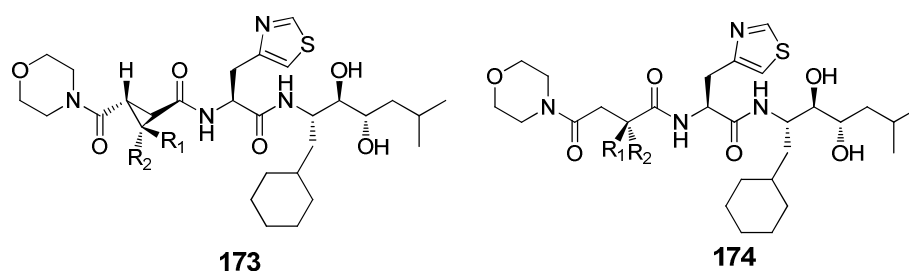


Figure 109: isostère par substitution de la fonction carbonyle

Cette stratégie a été appliquée par Martin *et al.*²⁵³ pour concevoir des inhibiteurs contraints de la rénine. En effet, le pseudopeptide contenant le motif cyclopropane **173** possède une meilleure activité inhibitrice que son analogue linéaire **174** (figure 110). Cette amélioration de l'activité s'est également accompagnée d'une meilleure stabilité de **173** face aux protéases.²⁵³



Molécule	IC ₅₀ (nM)
173	25
174	150

Figure 110: structure et IC₅₀ d'un inhibiteur de la rénine et son analogue contraint

II.4. Les cyclopropanes et les structures secondaires:

Dans la nature, les structures secondaires jouent un rôle très important dans les processus de reconnaissance biologique.^{237,238,254,255} Grâce à cette fonctionnalité, beaucoup d'efforts ont été dédiés à la conception de mimes peptidiques de ces structures secondaires. L'introduction de motifs cyclopropanes dans des parties spécifiques de peptidomimétique peut permettre de favoriser la formation d'hélice α , de feuillet β ou de coude.

II.4.a. Hélice α :

L'hélice α est une structure périodique très fréquente dans le repliement des protéines et des peptides. Elle se caractérise par la formation de liaisons hydrogènes entre le groupement carbonyle -CO d'un résidu i et le groupement amide -NH d'un résidu $i+4$. Un tour d'hélice α moyen contient 3,6 résidus et mesure 0.54 nm, soit une translation de 0.15 nm par résidu (figure 111).

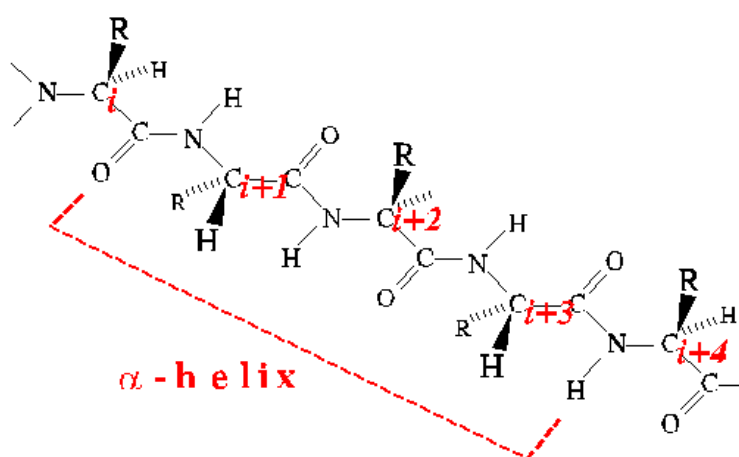


Figure 111: structure d'une hélice α

Yang *et al.* ont introduit un motif cyclopropane pour la construction de l'acide α -aminé [1-(aminoxy)cyclopropanecarboxylique, OAcc] disubstitué et achiral comme building block dans la formation d'hélice α N-O (figure 112). Ils ont ainsi pu démontrer après des analyses de dichroïsme circulaire et de cristallographie que l'introduction du résidu contraint OACC dans les structures peptidiques permettait la formation d'hélice α .²⁵⁶

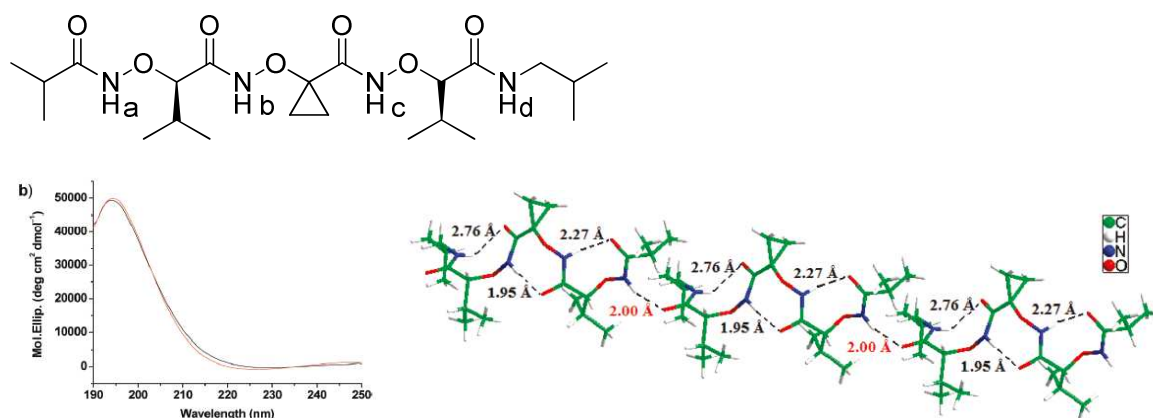


Figure 112: tripeptide contenant OAcc : cristal et spectre de dichroïsme circulaire

Reiser *et al.*²⁵⁷ ont également développé des peptidomimétiques contenant cette fois-ci le motif acide *cis*- β -aminocyclopropane carboxylique. Ils ont démontré que cet oligopeptide adopte une conformation en hélice α et que la stabilité de cette hélice est proportionnelle à la longueur de la chaîne peptidique. En effet ils ont obtenu des structures plus stables avec une meilleure définition avec l'heptapeptide ($n = 2$) et le nonapeptide ($n = 3$) qu'avec le pentapeptide ($n = 1$) (figure 113).

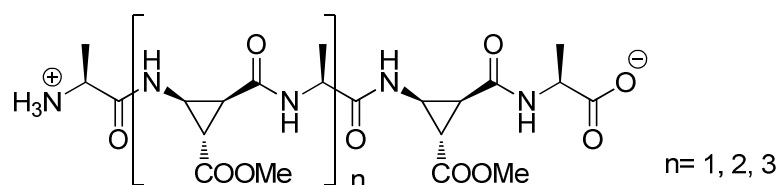


Figure 113: structure d'oligopeptide contenant le motif β cyclopropane amino acide.

II.4.b. Coude β :

Les coudes ne sont pas des structures périodiques. Il s'agit plutôt d'un repliement particulier du squelette carboné localisé à trois ou quatre résidus consécutifs. Les coudes permettent bien souvent de relier deux structures secondaires périodiques (hélices et/ou brins). Les isostères cyclopropane de dipeptides sont capables d'induire des structures en coude β . Ainsi Martin *et al.* les ont incorporés dans des analogues de l'enképhaline et des inhibiteurs de Ras farnesyltransferase. Si l'incorporation de motifs cyclopropane a permis la formation de coudes, elle n'a pas permis un gain d'activité inhibitrice.²⁵¹ Sur la figure 114 est montrée une structure classique de coude β dans une structure et l'analogue cyclopropane conçu pour le mimer.²⁵⁸

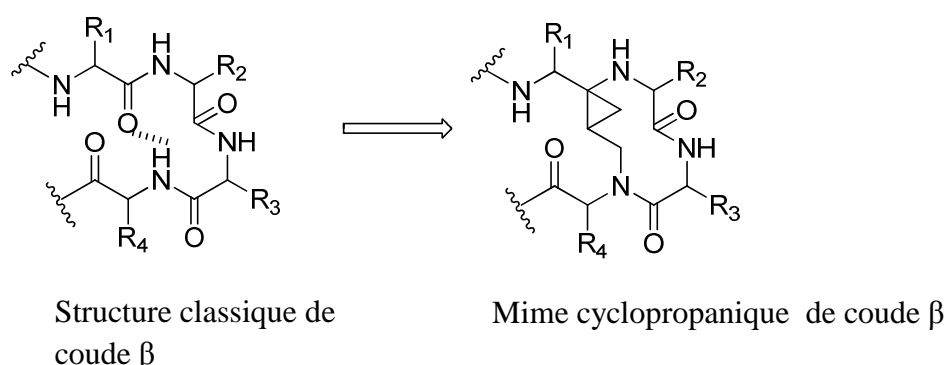


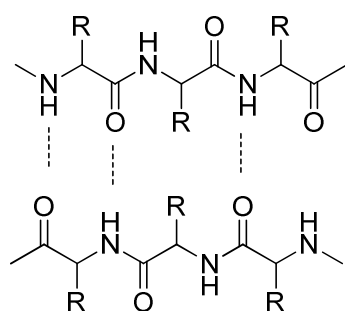
Figure 114: conception de mime cyclopropanique de coude β

II.4.c. Brin β :

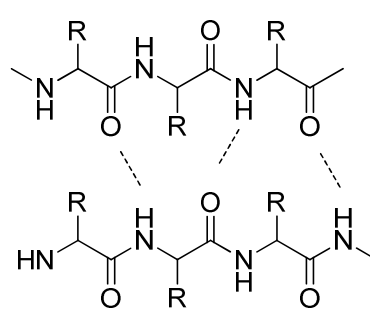
Le brin β est une structure périodique étendue. Les liaisons hydrogènes qui le stabilisent se font entre résidus distants plutôt qu'entre résidus consécutifs, comme dans le cas de l'hélice α . En fait, un brin β seul n'est pas stable, il a besoin de former des liaisons hydrogènes avec d'autres brins β pour se stabiliser : on parle alors de feuillet β . Un brin β est une structure de période 2, dont les chaînes latérales sont situées alternativement au dessus et en dessous du plan du feuillet. Il existe deux types de feuillet β (figure 115) :

- *Les feuillets β anti-parallèles*: dans ce cas, les brins β s'organisent de manière tête-bêche. Les groupements -NH et -CO d'un résidu i d'un brin A forment des liaisons hydrogènes avec les groupements -CO et -NH d'un résidu j d'un brin B. Typiquement, deux brins β consécutifs reliés par un coude forment un feuillet β anti-parallèle. On a ainsi une alternance de cycles à 14 et 10 atomes ce qui rend ces feuillets très stables.

- *Les feuillets β parallèles* : Lorsque les brins β sont tous orientés dans le même sens, ils s'organisent en un feuillet β parallèle. Les groupements -NH et -CO d'un résidu i d'un brin A forment des liaisons hydrogènes avec les groupements -CO et -NH d'un résidu $j+2$ appartenant à un brin β . On a la formation de cycles à 12 atomes ce qui rend les feuillets β parallèles moins stables que les feuillets β anti-parallèles.



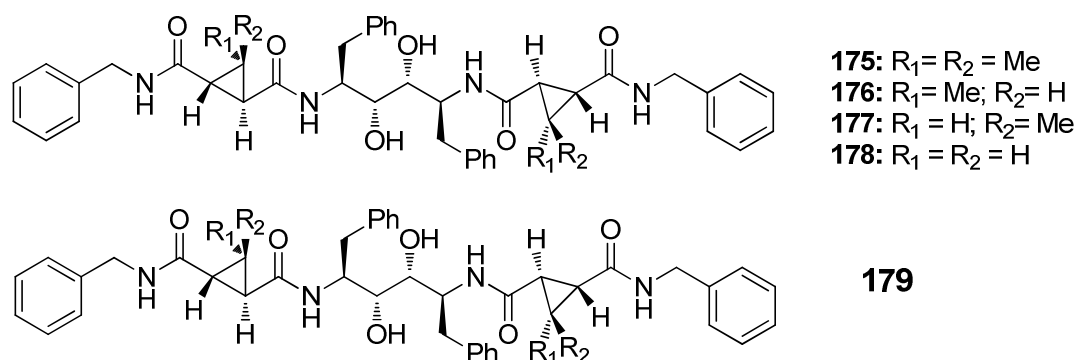
Feuillet β anti-parallèle



Feuillet β parallèle

Figure 115: structure des différents feuillets β

Martin et *al.* ont montré par modélisation que les isostères cyclopropanes de dipeptides peuvent servir à renforcer des brins β .²⁵⁹ Pour vérifier cette hypothèse, ils ont introduit ces isostères dans des inhibiteurs de protéase de VIH. En effet, il est connu que les inhibiteurs de la protéase du VIH adoptent une conformation en brin β pour se fixer au site catalytique.²⁵⁹ Ils ont donc synthétisé des inhibiteurs contraints de la protéase et l'évaluation biologique a montré que ces composés et leurs analogues linéaires ont environ la même efficacité et certains dérivés contraints sont légèrement plus efficaces (figure 116).²⁵⁹



Produits	Ki
175	0,31
176	0,16
177	0,47
178	0,17
179	0,22

Figure 116: structures et activité d'inhibiteurs contraints de la protéase du VIH.

II.5. Peptidomimétiques cyclopropaniques et fluorés :

Bien que, la synthèse de cyclopropanes trifluorométhylés ont suscité beaucoup d'intérêt dans le domaine de la chimie organique,²⁶⁰ les amino acides cyclopropane trifluorométhylés ont été très peu développés. En effet, il n'existe principalement que trois régioisomères de cyclopropane trifluorométhyle amino acides décrits dans la littérature : l'analogie cyclopropane fluoré de la proline A²¹⁸, l'acide *cis* ou *trans* trifluoronorcoronamique B²⁶¹, un analogue de l'acide gamma amino-butyrique C²²⁰ (figure 98). Par ailleurs, à notre connaissance ils n'ont pas été incorporés dans des structures peptidiques d'intérêt biologique et, leur influence sur une potentielle structuration des peptidomimétiques n'a pas été étudiée.

III. Rappels bibliographiques sur le mode d'accès des cyclopropanes trifluorométhylés

Les différentes approches de synthèse de cyclopropanes trifluorométhylés décrites dans la littérature sont résumées sur la figure 117. Ces cyclopropanes sont obtenus selon quatre voies principales : 1) à partir d'alcènes trifluorométhylés, 2) à partir de carbènes trifluorométhylés, 3) par cyclisation intramoléculaire de composés contenant le trifluorométhyle 1,3-bifonctionnalisé, 4) par la fluoronation directe d'acide cyclopropane carboxylique.²⁶⁰

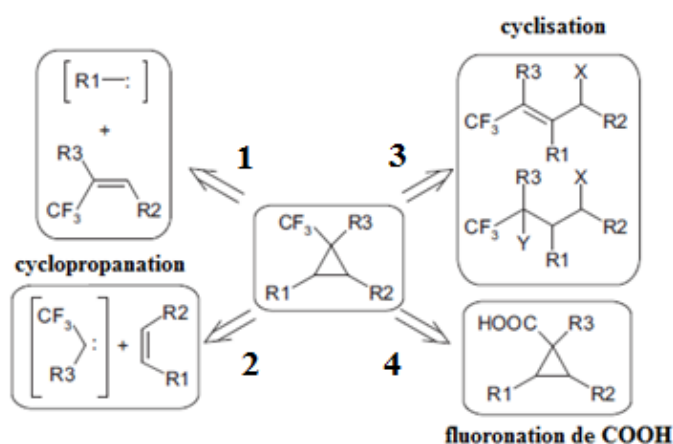


Figure 117: rétrosynthèse de formation de cyclopropanes trifluorométhylés.

Ici nous allons focaliser nos recherches bibliographiques sur les réactions de cyclopropanations (voies 1 et 2) et celles de cyclisation (voie 3), en particulier sur celles conduisant à des acides cyclopropane trifluorométhylés.

III.1. Cyclopropanation par des carbènes trifluorométhyles (voie 2):

La cycloaddition [2+1] entre un alcène et un composé diazotrifluoroéthane est l'une des méthodes directes d'accès aux cyclopropanes trifluorométhylés. Le carbène trifluorométhyle **180** a été décrit pour la première fois en 1960.²⁶² Il est généré par photolyse du 2,2,2-trifluoroéthyl diazométhane **136**^{262,263,264,265}, lui-même obtenu par diazotation de la 2,2,2-trifluoroéthylamine (schéma 19)²⁶³. Ainsi, en 1995, Dolbier *et al* ont utilisé cette méthode pour réaliser la synthèse du 2-(trifluorométhyl)-1-vinylcyclopropane **181a** et **181b**.²⁶⁶

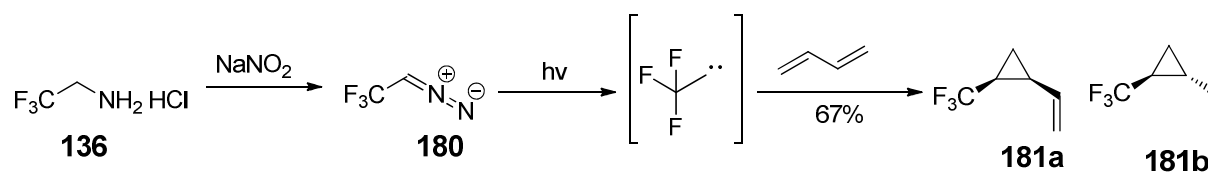


Schéma 19: réaction de cyclopropanation à partir de diazotrifluoroéthane

Ce n'est qu'en 2006 que la première réaction de cyclopropanation entre le carbène **180** et un alcène catalysée par un métal a été décrite.²⁶⁷ Dans ce travail, l'addition asymétrique du carbène **180** sur le styrène a été effectuée en présence de métalloporphyrine comme catalyseur (schéma 20). Le cyclopropane trifluorométhylé a été obtenu avec une excellente diastéréosélectivité (96-98%) et une énantiosélectivité moyenne allant de 30 à 79% en fonction du ligand utilisé.

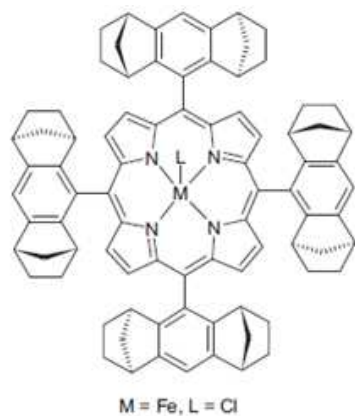
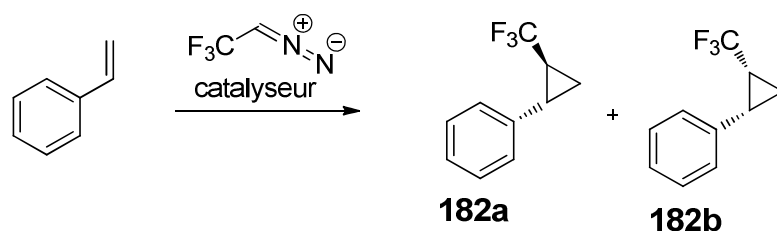


Schéma 20: première réaction de cyclopropanation catalysée par un métal

Après cette découverte, plusieurs métaux ont été utilisés pour réaliser cette réaction, notamment le palladium acétate $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ ²⁶⁸ (utilisé pour la cyclopropanation d'acide vinylboronique), le rhodium ou le cuivre.²⁶⁰ Cette méthode a été appliquée à la synthèse de

cyclopropanes trifluorométhylés amino acides tels que les dérivés de cyclopropane fluoré de la proline **156** et **157**²¹⁸ ou l'acide trifluoronorcoronamique **157**²¹⁹.

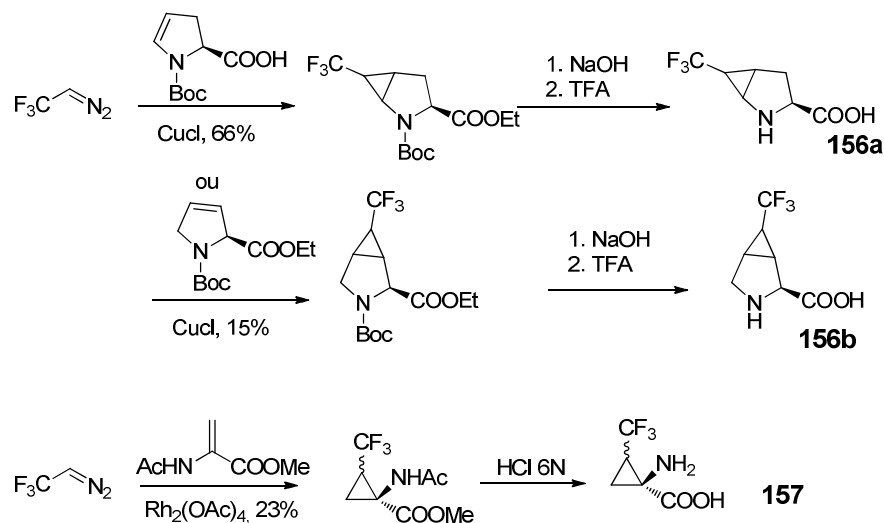


Schéma 21 : exemples de réactions de cyclopropanations catalysées par des métaux

Afin d'éviter l'isolement du 2,2,2-trifluoroéthyl diazométhane qui pourrait être toxique ou explosif, une autre procédure permettant sa formation *in situ* à partir de la 2,2,2-trifluoroéthylamine en présence de nitrite de sodium a été mise au point.²⁶⁹ Récemment, cette méthode a été appliquée à la synthèse diastéréosélective de cyclopropanes en présence d'un catalyseur au fer complexé à la porphyrine (schéma 22).²⁷⁰

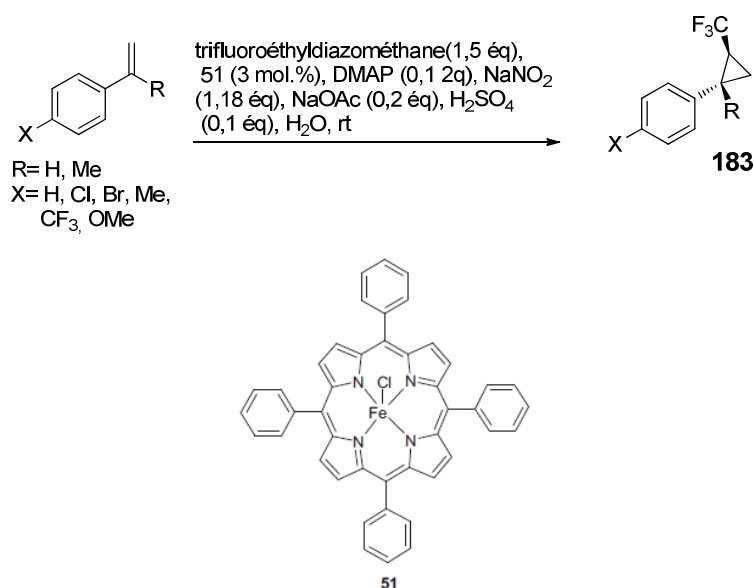


schéma 22: exemple de réaction de cyclopropanation utilisant la formation *in situ* du 2,2,2-trifluoroéthyl diazométhane

Les carbènes trifluorométhyles substitués peuvent être obtenus à partir de cétoester²⁷¹ ou par nitration directe^{272, 273} donnant ainsi accès à des diazoesters et diazonitro fluorés (schéma 23).

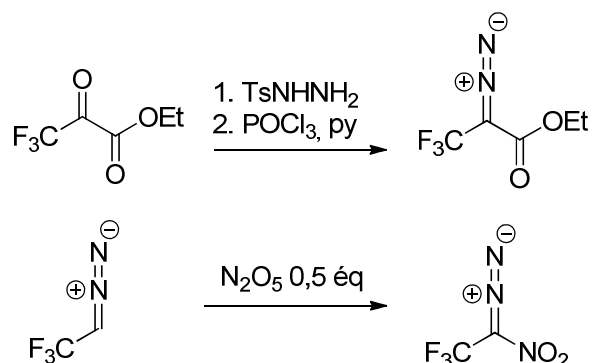


Schéma 23: exemples de diazo trifluorométhylés substitués

Ainsi, la réaction entre le 3,3,3-trifluorodiazopropionate d'éthyle et l'allylamine silylé en présence de $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ dans l'éther à reflux a conduit aux analogues de l'acide gamma amino butyrique (GABA) **184a** et **184b** avec un rendement de 34% (schéma 24).²²⁰

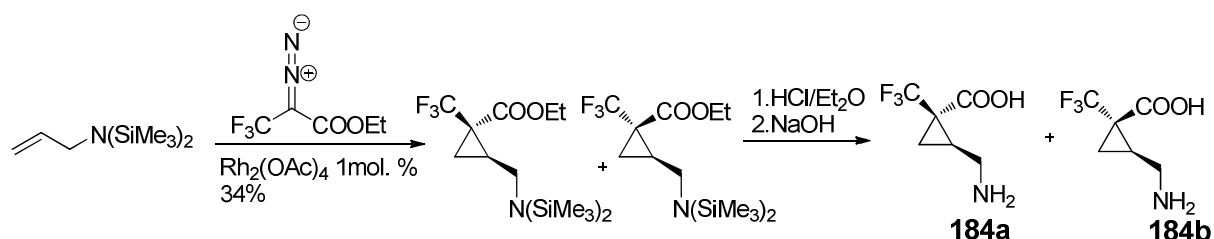


Schéma 24: synthèse d'analogue du GABA

III.2. Cyclopropanation par réaction de Michael Tandem addition nucléophile-cyclisation (voie 1 et 3):

Dans le précédent paragraphe, nous avons vu comment former des cyclopropanes à partir d'alcène et de carbène trifluorométhylé. Une autre méthode d'obtention de cyclopropanes trifluorométhylés est l'utilisation d'alcènes trifluorométhylés et de carbènes (voie 1). Ces alcènes fluorés peuvent être obtenus par déshydratation d'un alcool au pied du CF_3 ou par une réaction de Wittig (schéma 25).²⁶⁰

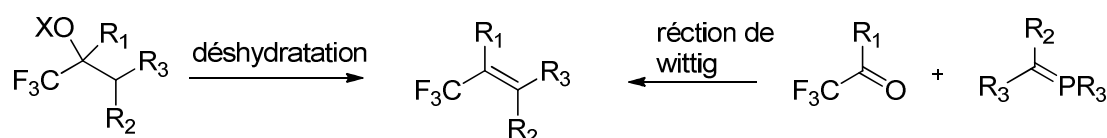


Schéma 25: les différentes voies d'obtention d'alcènes trifluorométhylés

Cette méthode a été utilisée pour la synthèse du dérivé d'acide trifluoronorcoronamique **187**. En effet, l'intermédiaire **185** obtenu en quatre étapes à partir du chloroacétate d'éthyle réagit avec le diazométhane pour donner le composé instable **186**. La décomposition photochimique de ce dernier à -18°C conduit au cyclopropane **187** avec un rendement de 48% (schéma 26).²⁷⁴

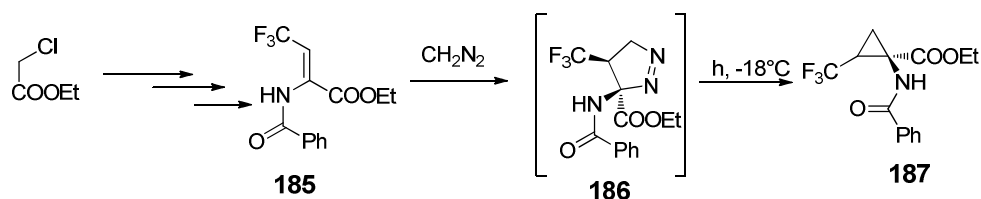


Schéma 26: synthèse de dérivé d'acide trifluoronorcoronamique

L'inconvénient majeur à l'utilisation des composés diazo est le risque d'explosion, posant ainsi une limitation à leur utilisation à grande échelle. Par conséquent, les ylures, en particulier ceux du soufre, sont largement utilisés pour les réactions de cyclopropanation sur des alcènes pauvres en électron. Ainsi, la réaction entre le trifluorocrotonate d'éthyle et l'ylure de soufre généré *in situ* par le système triméthylsulfoxonium d'iode-NaH permet d'accéder au cyclopropane **189** (schéma 27).²⁷⁵

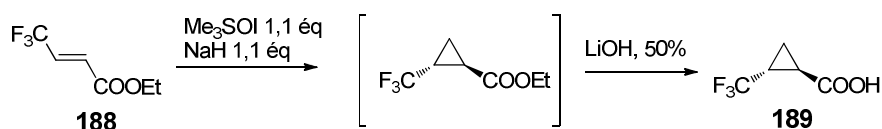


Schéma 27: réaction d'ylure de soufre avec le trifluorocrotonate d'éthyle

La même méthodologie a été utilisée pour la synthèse du monotrifluorométhyle pyrethroïde **192** trisubstitué par les fonctions nitrile, ester et trifluorométhyle. L'alcène **191** obtenu par réaction de Wittig entre le composé **190** et le trifluoroacétate de méthyle est mis en réaction avec l'ylure de soufre pour donner le composé **192** (schéma 28). Ce synthon est très intéressant car il permet l'obtention facile de cyclopropane amino acide avec une bonne stéréosélectivité (75%).²⁶⁰

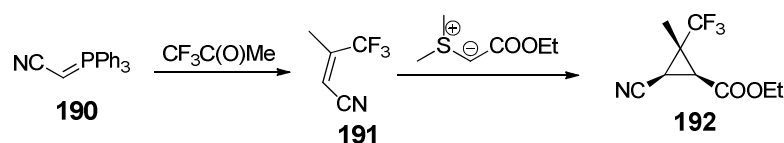


Schéma 28: cyclopropanation utilisant des ylures de soufre

La réaction de l'anion, obtenu à partir du composé méthylène, avec le (Z)-2-bromo-3,3,3-trifluoro-2-benzoate de méthyle conduit aux cyclopropanes **193** à **198** avec des bons rendements de manière stéréosélective (schéma 29).²⁷⁶

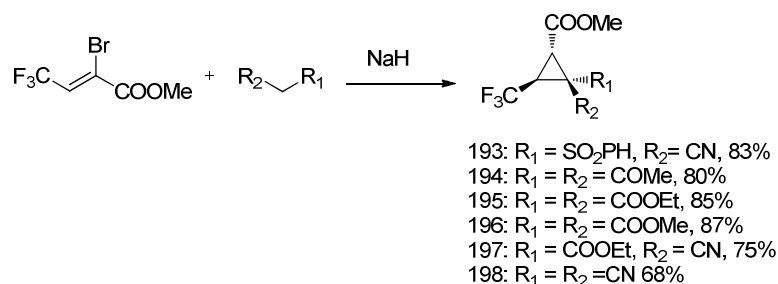


Schéma 29: réaction de cyclopropanation en utilisant des composés méthylènes

Les énolates de lithium et les ylures d'arséniques ont aussi été utilisés comme nucléophile dans cette réaction tandem d'addition de Michael suivit de cyclisation par départ d'un nucléofuge sur le trifluorocrotonate d'éthyle, aboutissant à la formation de cyclopropanes fluorés (schéma 30).^{277, 278}

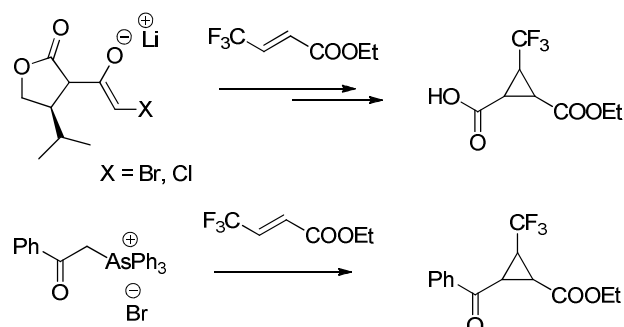


Schéma 30: réaction de cyclopropanation utilisant des énolates de lithiums et les ylures d'arséniques

Récemment Lin *et al* ont utilisé les sels de β-(Trifluorométhyl)vinyl sulfonium comme accepteur de Michael dans la réaction tandem en présence de composés méthényle pour obtenir des cyclopropanes trifluorométhylés (schéma 31).²⁷⁹

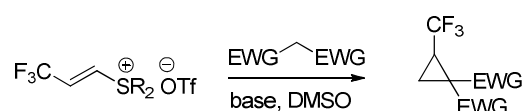


Schéma 31: réaction de cyclopropanation utilisant des sels de sulfonium fluorés

IV. Synthèse de cyclopropanes trifluorométhyles:

Comme évoqué précédemment (partie I, chapitre III) dans les objectifs nous souhaitons synthétiser la molécule **159** contenant le motif cyclopropane dans la partie centrale. Le β -amino acide cyclopropane trifluorométhylé est un intermédiaire clé dans la synthèse de ce composé (schéma 32). Ce synthon n'étant pas décrit dans la littérature, ceci nous a incités à développer une méthodologie de synthèse. Nous avons envisagé sa synthèse par réduction du nitrocyclopropane **199**.

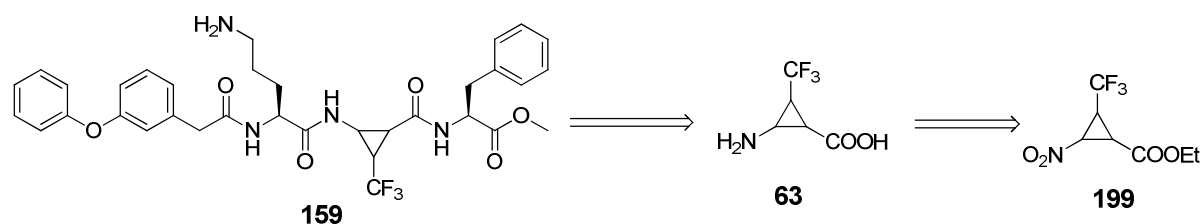


Schéma 32: schéma rétrosynthétique du composé **159**

Pour effectuer la synthèse du scaffold **199** nous avons appliqué la méthode la plus utilisée dans la littérature à savoir la cyclopropanation à partir de composés diazotrifluoroéthylés sur des alcènes, catalysée par un métal $[(\text{Rh}(\text{OAc})_2)_2]$. Malheureusement, nos différentes tentatives (variation de solvant) sur cette réaction n'ont pas eu de succès et le produit de départ a systématiquement été retrouvé.

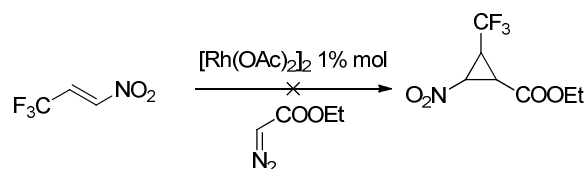


Schéma 33: essai de réaction de cyclopropanation utilisant le diazoacétate d'éthyle et catalysée par le Rhodium

Nous nous sommes donc tournés vers la deuxième approche de formation de cyclopropanes impliquant une addition de Michael suivie d'une cyclisation par départ de groupement partant

(schéma 34). Notre choix s'est porté sur le trifluorocrotonate d'éthyle comme accepteur de Michael et le bromonitrométhane comme nucléophile. En effet, la réaction entre ces deux composés conduirait à cyclopropane trifluorométhylé substitué de part et d'autre par une fonction nitro et une fonction ester, précurseurs d'amine et d'acide. Le bromonitrométhane a beaucoup été utilisé comme nucléophile dans les réactions de nitrocyclopropanations.²⁸⁰⁻²⁸³ Cependant, à notre connaissance, il n'existe pas d'exemples dans la littérature utilisant le bromonitrométhane dans la synthèse de cyclopropanes trifluorométhylés.

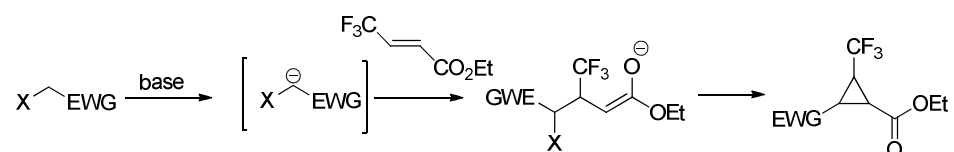


Schéma 34: réaction de cyclopropanation impliquant une addition de Michael suivie d'une cyclisation.

Pour la préparation du synthon cyclopropane trifluorométhylé disubstitué par les fonctions nitro et ester, nous avons choisi une méthode décrite par Ballini *et al.*²⁸¹ En effet, ces auteurs utilisent le bromonitrométhane et un alcène disubstitué par des groupements électroattracteurs pour obtenir des nitrocyclopropanes avec K_2CO_3 comme base dans l'acétonitrile. Ces cyclopropanes sont obtenus avec de bons rendements (75 à 96%) (schéma 35).

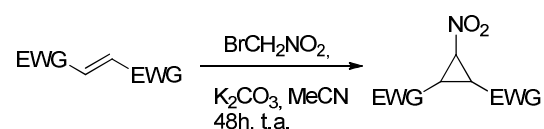


Schéma 35: réaction de nitrocyclopropanation

En utilisant les mêmes conditions avec le trifluorocrotonate d'éthyle comme alcène disubstitué nous n'avons obtenu que 10% de conversion. Afin d'améliorer ce taux de conversion, un screening de solvants et de bases a été effectué. L'utilisation des solvants tels que le dichlorométhane, le toluène ou le THF avec le Na_2CO_3 ou le K_2CO_3 n'ont pas permis une augmentation du taux de conversion (5 à 12%). En revanche, nous avons obtenu une conversion complète après six heures dans le DMF avec 2,5 équivalents de K_2CO_3 et 2 équivalents de bromonitrométhane. Cette augmentation du taux de conversion est probablement due à la grande solubilité de K_2CO_3 dans le DMF par rapport aux autres solvants. Le cyclopropane **199** est obtenu avec un rendement de 78%. Nous avons été

agréablement surpris d'observer la formation de seulement deux diastéréoisomères parmi les quatre attendus avec un rapport 9:1 (schéma 36).

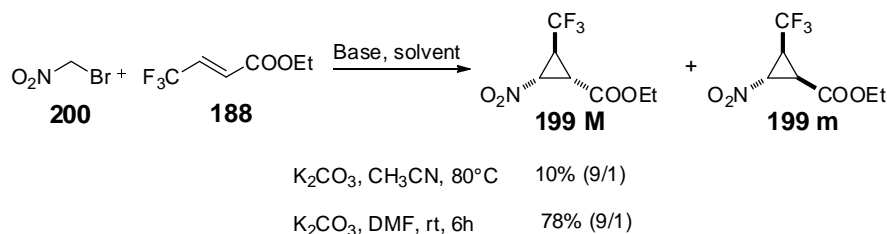
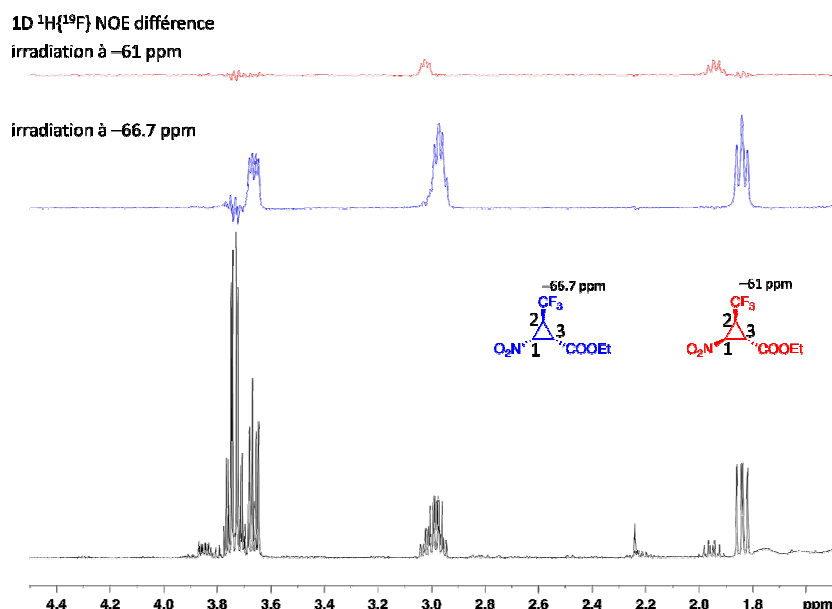
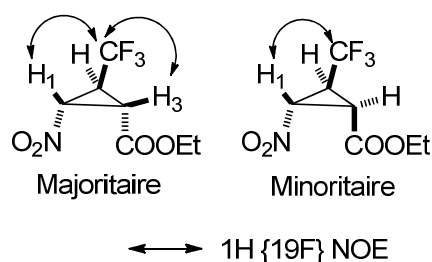


Schéma 36: réaction de cyclopropanation entre le trifluorocrotonate d'éthyle et le bromonitrométhane.

Les configurations relatives des deux diastéréoisomères ont été déterminées par RMN. Les valeurs des constantes de couplage vicinales étant proche ($^3J = 7-9$ Hz), des expériences supplémentaires en NOE ont été nécessaires pour déterminer sans ambiguïté la stéréochimie des deux diastéréoisomères. En effet, dans le produit majoritaire (en bleu) on observe un effet NOE entre le trifluorométhyle et les deux protons H₁ et H₃. Ceci implique que le groupement CF₃ et ces deux protons sont du même côté sur le cyclopropane. En revanche, dans le diastéréoisomère minoritaire, le groupement CF₃ n'observe un effet NOE qu'avec le proton H₃. Par conséquent, il est du même côté que ce dernier et opposé au proton H₁ (figure 118).




 Figure 118: détermination de la stéréochimie de **199** par H, F hétéro NOE

En se basant sur la configuration relative du cyclopropane trifluorométhyle, nous proposons le mécanisme suivant (schéma 37). L'addition de Michael entre l'anion généré en α du bromonitrométhane et le trifluorocrotonate d'éthyle conduit à l'intermédiaire majoritaire dont les groupements CF_3 et nitro sont *trans*. Dans le cas du diastéréoisomère minoritaire, les groupements CF_3 et nitro sont du même côté. Dans les deux cas le groupement ester est en *trans* par rapport au groupement CF_3 , ce qui signifie que le groupement ester est plus volumineux que le groupement NO_2 . Par ailleurs, pour les deux autres diastéréoisomères non obtenus, on peut supposer que les états intermédiaires **201** et **202** présentaient un encombrement trop important.

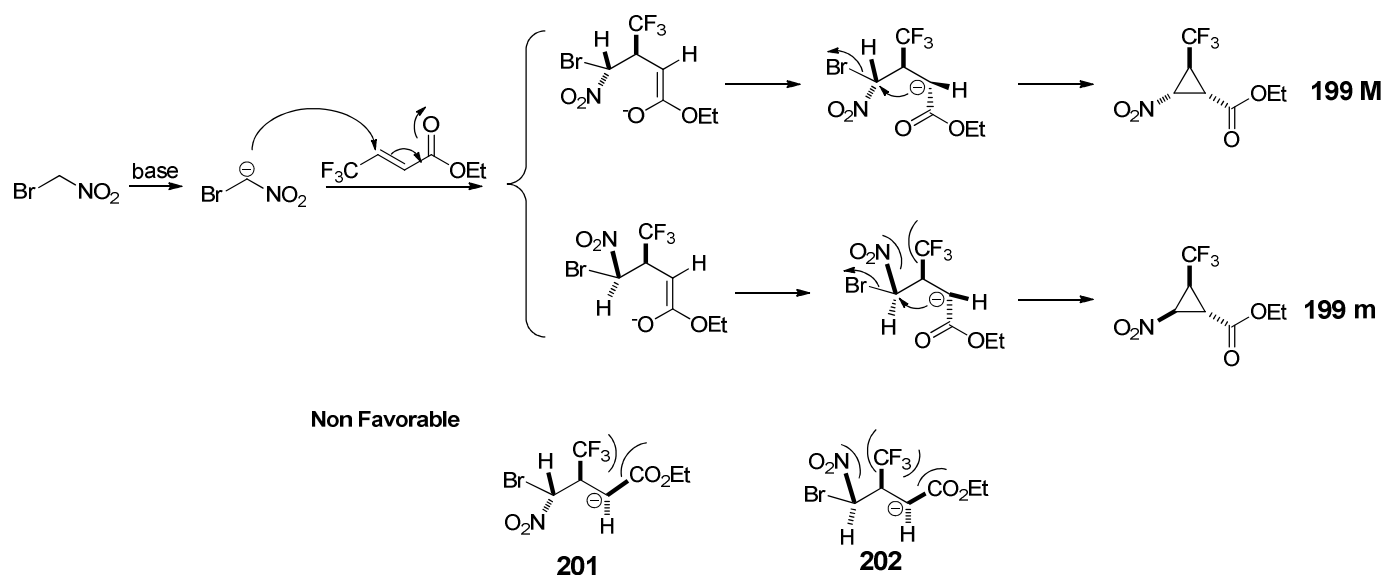
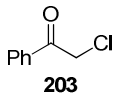
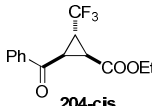
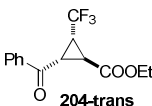
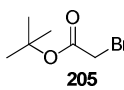
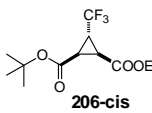
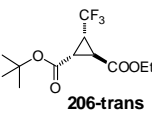
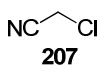
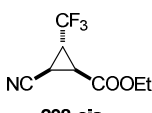
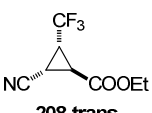


Schéma 37: mécanisme de cyclopropanation

Encouragé par ces résultats et dans le but d'obtenir d'autres produits contenant ce motif cyclopropane trifluorométhylé, nous avons testé d'autres nucléophiles. Les résultats obtenus avec les meilleurs nucléophiles sont reportés dans le tableau 12.

entrée	nucléophile	Conditions	produit	rdt	ed	
1	 203	K ₂ CO ₃ , DMF, 80°C, 16 h	 204-cis	 204-trans	68%	7:3
2	 205	K ₂ CO ₃ , DMF, 80°C, 16 h	 206-cis	 206-trans	20% ^a	7:3
3	 207	K ₂ CO ₃ , DMF, 80°C 5 h	 208-cis	 208-trans	50%	5:5

a : 20% de conversion par RMN du ¹⁹F

Tableau 12: Cyclopropanation par addition de Michael sur le trifluorocrotonate d'éthyle 1

Les produits sont obtenus dans le DMF avec K₂CO₃ comme base à 80°C pendant 5 ou 16 heures. Avec le chlorure de phenylacétyle, nous avons obtenu le cyclopropane **204** avec un bon rendement de 68% (tableau 12, entrée 1). Au contraire, le *tert*-butyl de bromoacetate utilisé comme nucléophile a conduit au produit **206** avec un faible rendement de 20%. Dans les deux cas, nous avons une perte de diastéréosélectivité (7:3) par rapport au bromonitrométhane (9 :1). Le dernier nucléophile testé est le chloroacétonitrile qui a donné le cyclopropane **208** avec un rendement moyen (50%) sans aucune diastéréosélectivité. Afin d'améliorer le rendement avec les composés **205** et **207**, nous avons utilisé d'autres solvants et bases et malheureusement les rendements n'ont pas été améliorés. La stéréochimie des différents isomères est déterminée par RMN en mesurant la constante de couplage des protons du cyclopropane (³J_{HH} = 7,5 Hz pour les protons *Cis*). Le groupement CF₃ est en position *trans* par rapport aux autres groupements, de ce fait on peut déduire que la formation de ces composés passe par le même intermédiaire que celui du nitrocyclopropane **199**.

Fonctionnalisation des cyclopropanes :

Ayant obtenu divers cyclopropanes, l'étape suivante a consisté à les fonctionnaliser en amino acide afin de pouvoir les intégrer dans des structures peptidomimétiques. Nous avons commencé cette investigation par le cyclopropane **199**. La première réaction effectuée sur ce composé est la réduction du nitro en amine. Malheureusement, dans les conditions classiques de réduction de nitro (H_2 Pd/C en milieu acide, Zn/HCl, Zn/AcOH, H_2 Pt/C) nous avons obtenu un produit d'ouverture du cycle. Ce produit est issu d'une réaction de push pull conduisant à l'imine **209** (schéma 38). Cette réaction de push pull a déjà été observée dans des cyclopropanes non fluorés.^{284, 285, 286}

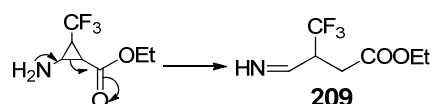


Schéma 38: Mécanisme d'ouverture du cyclopropane

Afin de contourner cet obstacle, nous avons développé une autre voie décrite dans le schéma 39. Le but étant de supprimer le caractère électroattracteur de l'ester responsable de la réaction de push pull, celui-ci est réduit pour donner l'alcool **210** sans aucune épimérisation. Ensuite la fonction nitro est facilement réduite en amine en présence Pd/C sous atmosphère d'hydrogène, l'amine obtenue est protégée *in situ* par le groupement Boc pour donner le composé **211**. La stéréochimie du composé **211** a été établie sans ambiguïté par RMN en se basant sur le NOE homonucléaire 1H - 1H mesuré à partir du spectre 2D et le NOE hétéronucléaire 1H { ^{19}F }. L'oxydation directe de l'alcool en acide avec des oxydants tels que H_2O_2 en présence de NaOCl a entraîné une ouverture du cyclopropane. Nous sommes une fois de plus face à un problème d'ouverture dû à la présence de part et d'autre d'une fonction amine nucléophile et d'une fonction acide pauvre en électron. Pour palier à ce problème, nous avons décidé de diprotéger l'azote avec le groupement Boc, ce qui élimine tout son caractère nucléophile. Malheureusement dans les conditions de diprotection de l'azote, la fonction hydroxyle réagit avec le Boc_2O pour donner une fonction carbamate. Pour éviter cette réaction secondaire, la réaction de diprotection de l'azote est précédée de la protection de l'alcool par une fonction tétrahydropyrane. L'oxydation directe de **212** en aldéhyde a été effectuée par le chlorochromate de pyridinium (PCC) dans le toluène.²⁸⁷ L'aldéhyde est

ensuite oxydé *in situ* en acide **213** avec un faible rendement de 15% à partir de **212** (schéma 39).

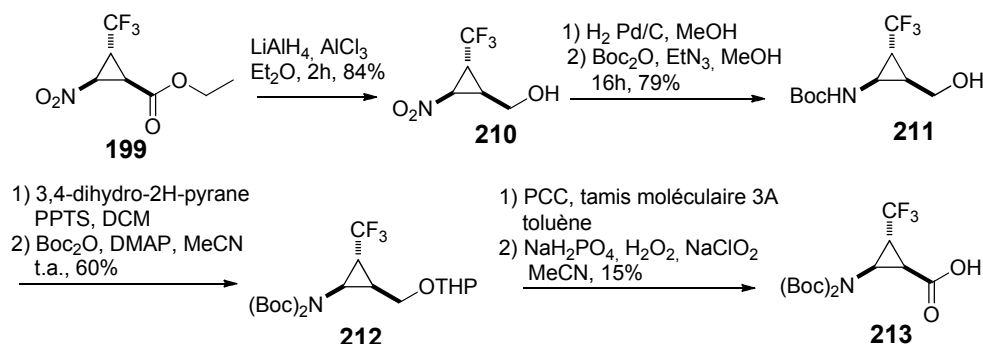


Schéma 39: synthèse du composé **213**

Cette première fonctionnalisation a mise en évidence un synthon intéressant : l'alcool **210** qui pourrait être utilisé pour développer d'autres cyclopropanes trifluorométhylés. En effet, la transformation de la fonction hydroxyle en un meilleur groupement partant tel que l'iode conduit au composé **214** avec un bon rendement (82%).²⁸⁸ Ce dernier est ensuite substitué par l'azoture de sodium pour conduire au produit **215** avec un très bon rendement (90%). La réduction sélective de la fonction azoture par la réaction de Staudinger suivi du couplage peptidique avec l'acide aminé Boc-Valine-OH a fourni le produit **216**. La fonction nitro est ensuite réduite pour donner l'amine **217** avec un rendement moyen (65%) (Schéma 40). Les composés **216** et **217** sont obtenus sous forme de mélange de diastéréoisomères avec un ratio 50/50. On peut envisager une séparation des deux diastéréoisomères par HPLC.

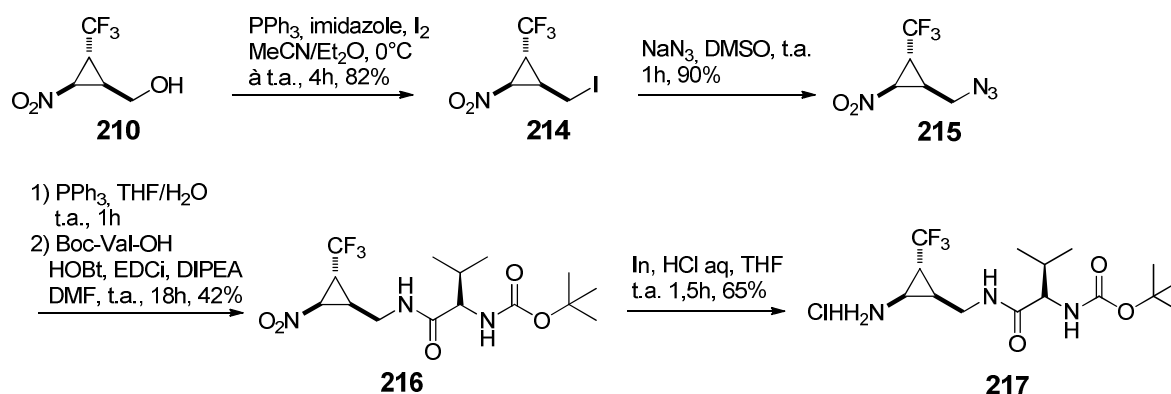


Schéma 40: synthèse du composé **217**

Une réaction d'amination réductrice en présence de la benzylamine et de NaBH_3CN sur la fonction cétone a été envisagée pour fonctionnaliser le composé **203**. Malheureusement, la réaction n'a pas marché et nous avons récupéré le produit de départ. Nous avons donc envisagé une autre voie dont la première étape est la réduction de la cétone en alcool en présence de NaBH_4 dans l'éthanol. Nous avons obtenu un mélange de bicyclic **218** et d'alcool **219** (schéma 41). Cette réaction nous a permis de confirmer la stéréochimie du cyclopropane majoritaire **203M** dont les fonctions cétone et ester sont tous deux en position *trans* par rapport au CF_3 .

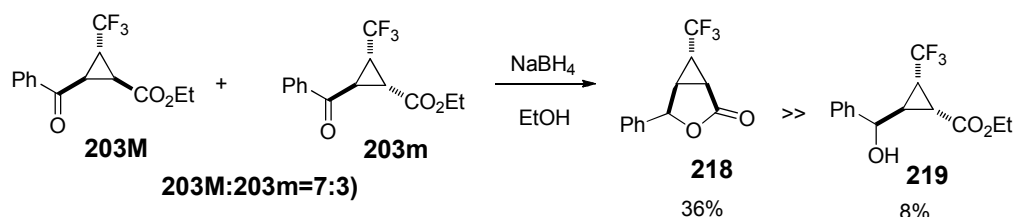


Schéma 41: réduction de la cétone

En effectuant la réaction dans les conditions de Luche²⁸⁹, nous avons évité la formation de ce produit bicyclique, et obtenu ainsi les alcools **220** et **221**. Étonnamment, nous n'avons obtenu qu'un seul diastéréoisomère (par RMN du ^{19}F) pour chaque isomères (*cis* et *trans*), ce qui met en évidence la diastéréosélectivité de la réduction. Cette diastéréosélectivité est due à l'attaque préférentielle sur le côté le moins encombré du carbonyle des cétones cyclopropaniques (schéma 42).²⁹⁰

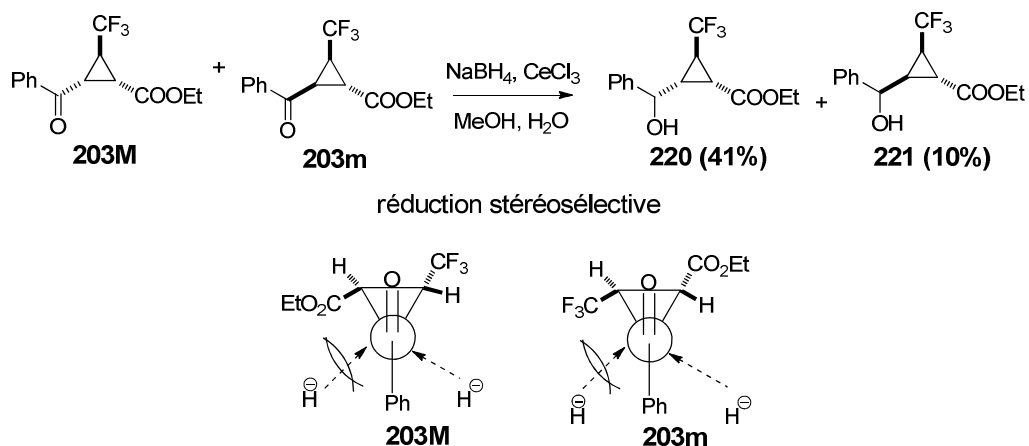


Schéma 42: réduction dans les conditions de Luche

L'introduction du chlore à la place de la fonction hydroxyle et la substitution de ce dernier par l'azoture de sodium conduit au produit **223**. L'hydrogénation catalytique de l'azoture donne le

composé **224** qui peut être utilisé dans d'autres réactions, par exemple de type couplage peptidique.

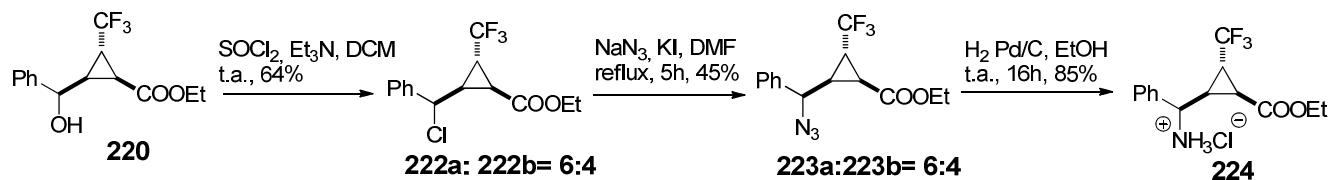


Schéma 43: synthèse du composé **224**

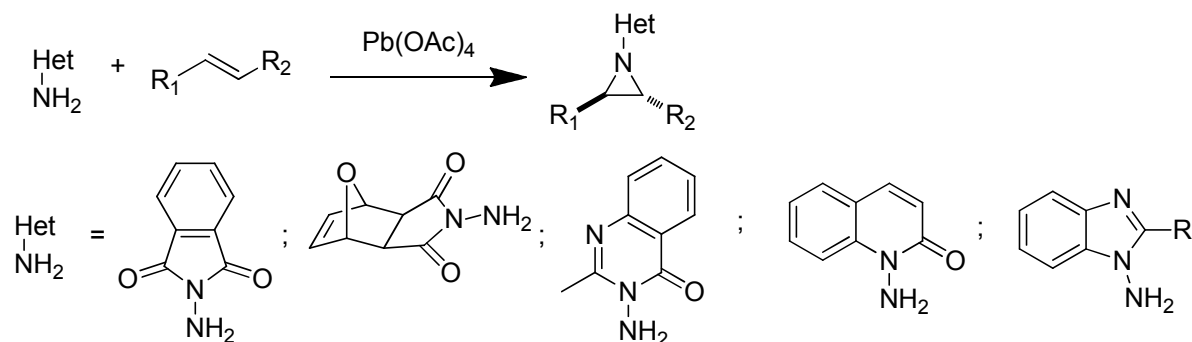
V. Les *N*-aminoaziridines :

V.1. Généralités sur les *N*-aminoaziridines

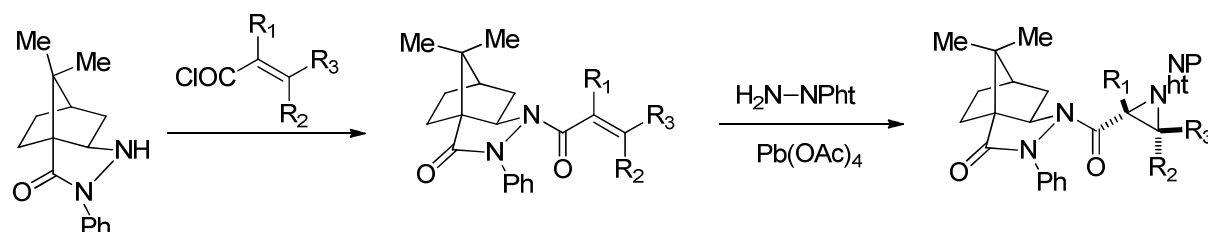
Dans la suite de notre projet d'insertion de contrainte dans la partie centrale de nos inhibiteurs du protéasome, nous nous sommes intéressés aux *N*-aminoaziridines (en collaboration avec un stagiaire de Master 2, Bertrand Schweitzer-Chaput). En effet, ces composés sont des précurseurs d' α -hydrazinoacides, rencontrés naturellement dans des peptides à propriétés antibiotiques.²⁹¹ Elles peuvent aussi être utilisées comme mimes peptidiques à potentiel antiviral stables métaboliquement.²⁹¹ Il existe peu de méthodes de synthèse de *N*-aminoaziridines, la principale étant l'addition de *N*-aminohétérocycles sur des alcènes. Cette réaction d'oxydation a été effectuée en présence de tétraacétate de plomb²⁹²⁻²⁹⁹, d'iodobenzène diacétate (PhI(OAc)₂)^{300, 301} ou d'autres oxydants tels que *m*CPBA³⁰² ou KO₂³⁰³.

V.1.a. Synthèse en présence de tétraacétate de Plomb

L'oxydation par le Plomb de *N*-aminohétérocycles en présence d'alcènes conduit à la formation d'aziridine. Rees *et al* ont appliqué cette méthode à la synthèse d'une série de *N*-aminohétérocycles, ils ont ainsi obtenu les *N*-aminoaziridines avec de bons rendements (schéma 44).^{293, 292} Il est à noter que la stéréochimie *Z* ou *E* de l'alcène de départ est conservée lors de l'aziridination. Ainsi, une oléfine *E* donnera une aziridine *trans* et une oléfine *Z* une aziridine *cis*. Cette méthode permet en outre d'obtenir des aziridines à partir d'alcènes riches en électrons (styrène, butadiène et *trans*-but-2-ène) et d'alcènes présentant des groupements électroattracteurs (acrylate de méthyle et méthyl-vinyl cétone).²⁹³


 Schéma 44 : réaction de *N*-aminoaziridination utilisant le tétraacétate de plomb.

La mise au point de synthèse énantiosélective des *N*-aminoaziridines à partir de *N*-aminohétérocycles a été effectuée par plusieurs équipes. Cette stéréosélectivité peut être obtenue par l'utilisation de copules chirales à base de menthol²⁹⁶, de ligands chiraux²⁹⁴, d'aminohétérocycles chiraux²⁹⁷ ou d'auxiliaires chiraux de types camphor-pyrazolidinone greffés aux alcènes²⁹⁵. Cette dernière méthode décrite par Chen *et al* permet l'aziridination par le *N*-aminophtalimide d'un panel d'alcènes diversement substitués (Schéma 45).


 Schéma 45: exemple de réaction de *N*-aminoaziridination énantiosélective.

Ces auxiliaires permettent d'obtenir une bonne diastéréosélectivité (dr jusqu'à 95/5) avec d'excellents rendements (86-95%). La stéréosélectivité est très bonne pour des groupements $R_3 = \text{Me/Et}$, et des di-substituants $\beta\text{-}\beta$ $R_2 = R_3 = \text{Me}$ ($A/B > 95:5$) elle est plus faible pour le *N*-cynamoylpyrazolidinone riche en électrons ($R_3 = \text{Ph}$; A/B 61:39). On note qu'un substituant en α fait fortement diminuer la stéréosélectivité ($R_1 = \text{Me}$; A/B 20:80), mais celle-ci remonte avec la présence d'un autre substituant en β et s'inverse dans le cas étudié par les auteurs ($R_1 = R_3 = \text{Me}$; $A/B < 5:95$). En outre, les 2-carboxyl aziridines sont facilement obtenues dans le méthanol en présence de DMAP avec de bons rendements (80%) et permettent de régénérer l'auxiliaire chiral avec un excellent rendement de 94%. La stéréosélectivité a été rationalisée

par les auteurs et s'explique par la configuration préférentielle prise par les *N*-enoylpyrazolidinones (schéma 46). Les composés ne possédant pas de substituant R_1 en α prendront une configuration plane *s-cis* tandis qu'un substituant R_1 orientera la molécule vers une configuration plane *s-trans* pour limiter les interactions stériques avec la partie pontée du camphre. L'attaque syn de l'intermédiaire acetoxyaminophthalimide se fait sur la face ré dans le cas de la conformation *s-cis* et sur la face si du $C\alpha$ dans le cas de la conformation *s-trans* pour donner la stéréosélectivité observée.

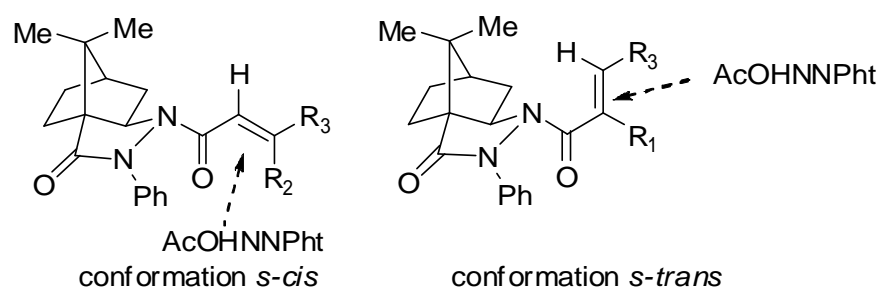
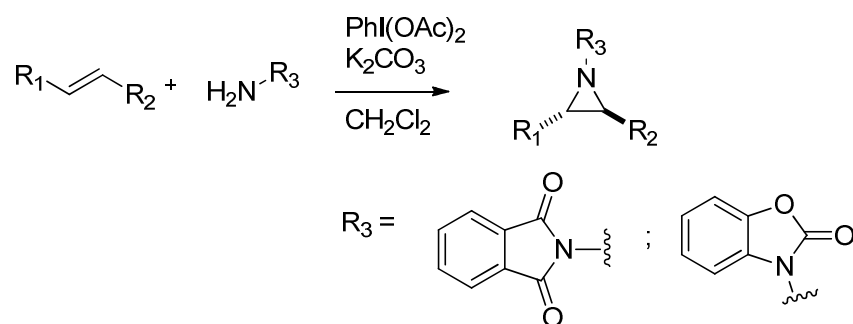


Schéma 46: configuration adoptée par les *N*-enoylpyrazolidinones permettant la stéréosélectivité

V.1.b. Synthèse en présence de diacétate d'iodobenzène :

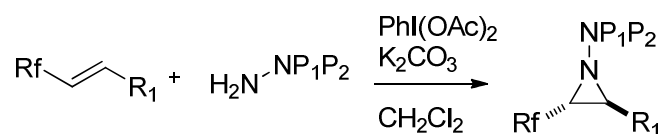
Une variante de cette réaction permet d'utiliser l'iode (III) hypervalent comme oxydant, moins toxique que le tétracétate de plomb. Cette réaction a été menée en présence de diacétate de iodobenzène $\text{PhI}(\text{OAc})_2$.³⁰⁰ Ces conditions permettent de n'utiliser qu'un équivalent de l'alcène, ce qui est intéressant dans la synthèse d'aziridines à partir d'alcènes complexes, difficiles à obtenir. Après optimisation des conditions de réaction, un équivalent d'alcène mis en présence d'un excès d'oxydant ($\text{PhI}(\text{OAc})_2$, 1,5eq) et de *N*-aminophthalimide (1,4eq) dans le dichlorométhane à température ambiante permet d'obtenir des aziridines avec des rendements et taux de conversion souvent bons (schéma 47). De plus, il est à noter que cette méthode est chimiosélective puisque d'autres groupements fonctionnels tels que des esters, cétones ou alcools présents sur l'alcène ne sont pas affectés. Elle permet en outre l'aziridination de substrats ne réagissant pas avec la méthode au tétracétate de plomb comme le tri-*O*-acétal-D-glucal et semble plus donc générale.³⁰⁰


 Schéma 47: réaction de *N*-aminoaziridination utilisant l'iode hypervalent.

Contrairement aux aziridines, peu de synthèses de *N*-aminoaziridines ont été décrites dans la littérature et, à notre connaissance, l'étude de ce type de composés portant des groupements fluorés n'a pas été entreprise jusqu'à maintenant. Pour réaliser cette synthèse nous avons utilisé la méthode de *N*-aminoaziridination développée par Che *et al.*³⁰⁰ précédemment exposée en l'appliquant à des alcènes portant un groupement fluoré et une fonction ester permettant un couplage peptidique par la suite. Dans l'optique d'utiliser ces molécules comme motif central, il nous faut en effet deux groupes protecteurs orthogonaux, libérant facilement les fonctions réactives permettant le couplage.

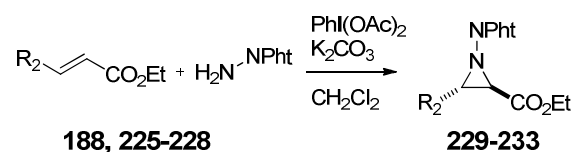
V.2. Réaction d'aziridination :

La méthode de synthèse d'aziridine utilisée au cours de ce travail est basée sur l'addition d'hydrazines sur des alcènes en présence de diacétate de iodobenzène (schéma 48).


 Schéma 48: réaction de *N*-aminoaziridination sur un alcène fluoré.

Nous avons d'abord réalisé cette réaction d'aziridination avec les produits commerciaux : le *N*-aminophthalimide et le trifluorocrotonate d'éthyle dans le dichlorométhane avec 1,5 équivalents de diacétate d'iodobenzène et 2,8 équivalents de K_2CO_3 . La *N*-aminoaziridine **225** est obtenue avec un bon rendement (64%) bien qu'inférieur à celui obtenu avec son homologue non fluoré **226** (table 13, entrées 1 et 2). La réaction a ensuite été étendue à d'autres accepteurs de Michael fluorés : le (*E*)-4,4,5,5,5-pentafluoropentenoate d'éthyle **226**

³⁰⁴, le (*E*)-4,4-difluorobutenoate d'éthyle **227** et le (*E*)-3-(perfluorophenyl) acrylate d'éthyle **228** dans les mêmes conditions que précédemment. Les *N*-aminoaziridines correspondantes sont obtenues avec des rendements moyens (tableau 13, entrée 3-5).



entry	Starting material	R ²	Product	Yield %
1	188	CF ₃	229	64
2	225	CH ₃	230	78
3	226	C ₂ F ₅	231	31
4	227	CHF ₂	232	58
5	228	C ₆ F ₅	233	55

Tableau 13: résultats des réactions d'aziridination avec différents accepteurs de Michael.

La réaction a aussi été étendue au (*E*)-trifluoronitropropène **234**³⁰⁵ et au (*E*)-benzyloxy-trifluorobutène **235**³⁰⁶ pour conduire aux *N*-aminoaziridines fluorées **236** et **237** avec des rendements de 67 et 35% respectivement (schéma 49).

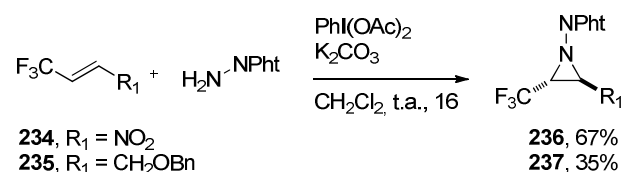
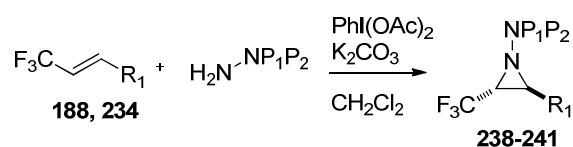


Schéma 49: synthèse de *N*-aminoaziridines trifluorométhylées

Afin d'utiliser ces *N*-aminoaziridines fluorées pour concevoir des peptidomimétiques contraints, la réaction a été effectuée avec des précurseurs de nitrènes comportant d'autres groupements protecteurs que le phthalimide. Le but étant de libérer plus tard la fonction amine afin de l'engager dans une réaction de couplage peptidique. Ainsi, le *N,N*-di-*tert*-butylcarbazate (NH₂NBoc₂)³⁰⁷, le *N*-méthyle-*N-tert*-butylcarbazate (NH₂N(CH₃)Cbz) et le *N,N*-dibenzylcarbazate (NH₂NCbz₂) ont été mis en réaction avec le trifluorocrotonate d'éthyle **188** ou le (*E*)-trifluoronitropropène **234** pour donner les *N*-aminoaziridines correspondantes, avec des rendements acceptables de 37 à 76%. Les résultats sont reportés dans le tableau 14.



entry	R ¹	Reagent	P ¹	P ²	Product	Yield %
1	CO ₂ Et	188	Boc	Boc	238	65
2	CO ₂ Et	188	Boc	Me	239	37
3	CO ₂ Et	188	Cbz	Cbz	240	76
4	NO ₂	234	Boc	Boc	241	57

 Tableau 14: réaction de *N*-aminoaziridination avec des carbazates.

Nous avons ensuite appliqué cette réaction à des trifluorocrotonates amino acides afin d'obtenir directement des peptidomimétiques fluorés contraints. L'acide trifluorocrotonique **242** est couplé avec divers acides aminés commerciaux en présence de HBTU et de HOBT comme réactifs de couplage dans le DMF (schéma 50).

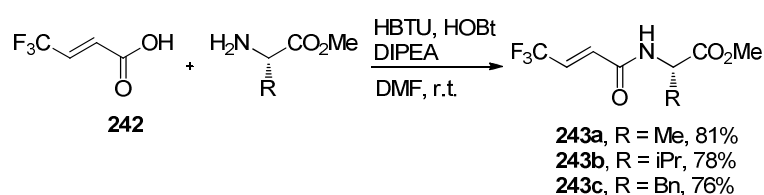
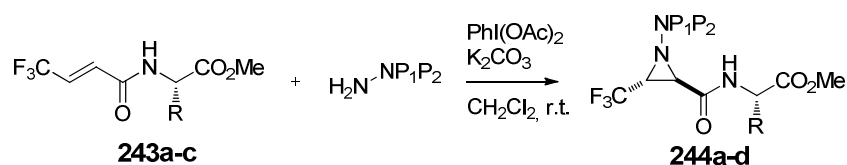


Schéma 50: réaction de couplage peptidique entre l'acide trifluorocrotonique et divers acides aminés.

La *N*-aminoaziridination des composés **243a-c** en présence de *N*-aminophthalimide ou de *N,N*-di-*tert*-butylcarbazate a été effectuée dans les conditions décrites précédemment. Les peptidomimétiques correspondants sont obtenus avec des rendements satisfaisants sous forme de diastéréoisomères avec un ratio 1:1 (tableau 15). Dans le cas des composés **244a** et **244b**, les deux diastéréoisomères sont séparés sur une colonne de silice conduisant à des peptidomimétiques énantiopurs.



entry	reagent	R	P ¹	P ²	Product	Yield %
1	243a	Me		Pht	244a	68
2	243b	iPr		Pht	244b	64
3	243c	Bn		Pht	244c	72
6	243c	Bn	Boc	Boc	244d	79

 Tableau 15: réaction de *N*-aminoaziridination des composés **243a** à **243c**.

V.3. Déprotection des *N*-aminoaziridines:

Dans l'optique d'utiliser nos *N*-aminoaziridines en synthèse peptidique, il nous faut libérer les groupements protecteurs. Dans un premier temps, nous avons essayé de déprotéger l'aziridine **229** par la méthode classique de déprotection des phtalimides en présence d'hydrazine.³⁰⁸ Malheureusement, tous nos essais se sont soldés par des échecs, et ce quelles que soient les conditions opératoires employées (solvant, nombre d'équivalents d'hydrazine, température) (schéma 51).

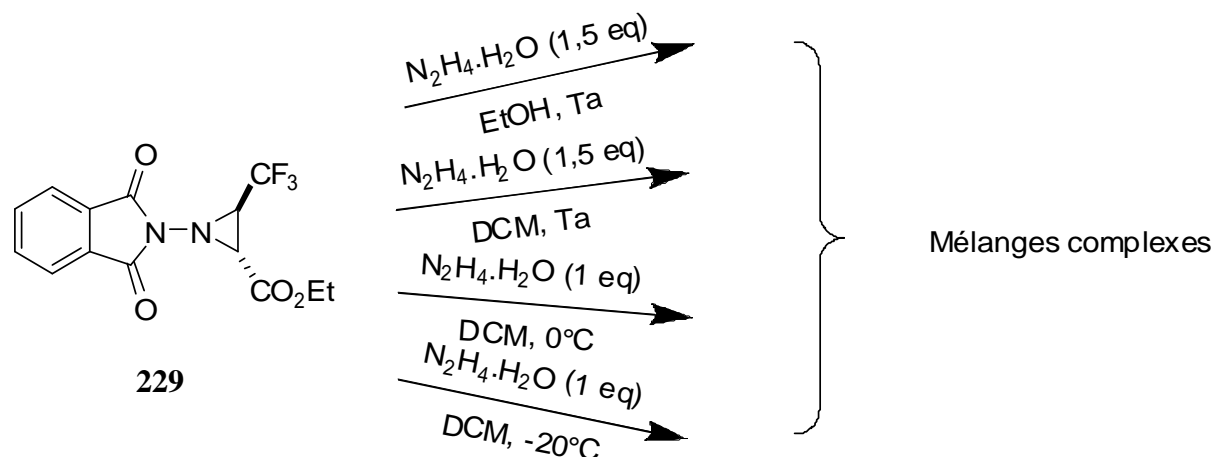
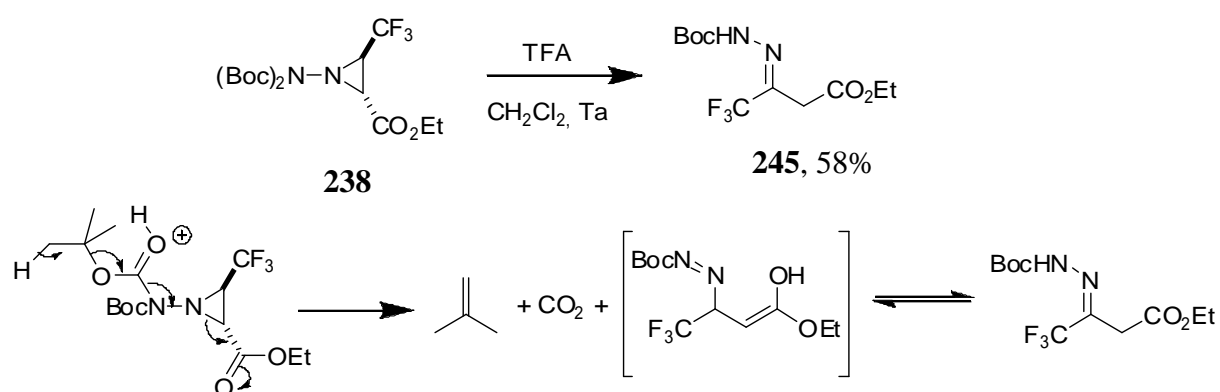


Schéma 51: résultats des essais de clivage du groupement protecteur phtalimide

Ensuite, la déprotection des deux groupements Boc de l'aziridine **238** par hydrolyse en présence d'acide trifluoroacétique n'a pas non plus conduit à la *N*-aminoaziridine attendue. Nous avons isolé l'hydrazone **245** formée probablement selon le mécanisme ci-dessous.


 Schéma 52: mécanisme d'obtention de l'hydrazone **245**.

D'autres essais de déprotection de ces groupements sont en cours tels que l'utilisation de BiCl_3 pour cliver le groupement Boc. Une autre alternative pour éviter cette étape délicate de déprotection est l'incorporation directe d'un acide aminé sur la partie hydrazine, et d'effectuer ensuite la *N*-aminoaziridination selon le schéma 53.

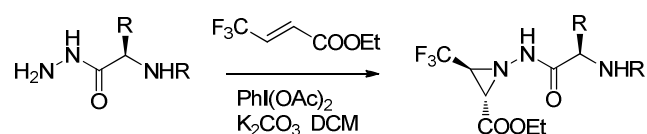


Schéma 53: alternative aux problèmes de déprotection

VI. Conclusions et perspectives du chapitre 3 :

En résumé, à partir du trifluorocrotonate d'éthyle nous avons développé de nouveaux acides cyclopropanes trifluorométhyles dans des conditions opérationnelles simples et douces. La réaction tandem de Michael, addition nucléophile suivie de cyclisation nous a permis d'accéder à de nouveaux stéréoisomères avec une excellente diastéréosélectivité pour certaines réactions. La séparation de certains diastéréoisomères se fait facilement par chromatographie sur colonne de silice. De plus, nous avons préparé un panel de nouveaux motifs cyclopropaniques trifluorométhylés. Nous avons aussi développé une synthèse efficace de *N*-aminoaziridine fluorés à partir d'oléfines fluorés et de précurseurs de nitrène en présence de diacétate d'iodobenzène ($\text{PhI}(\text{OAc})_2$). Nous avons ensuite étendu cette réaction à la synthèse de peptidomimétiques contraints trifluorométhylés. Ces travaux ont donné lieu à deux publications (dont une soumise). Ces composés sont des synthons intéressants et

peuvent être utilisés pour synthétiser des peptidomimétiques contraints et fluorés. L'incorporation de ces nouveaux scaffolds dans la structure de nos inhibiteurs de protéasome est en cours de réalisation dans le laboratoire. En perspective, nous souhaitons effectuer la synthèse énantiosélective de ces motifs contraints. Pour cela, un premier essai de synthèse énantiosélective des cyclopropanes trifluorométhylés a été effectué en utilisant la thiouré **246** (schéma 54). En effet ce catalyseur a beaucoup été utilisé dans la littérature pour la synthèse énantiosélective de nitrocyclopropane.^{309,310} Malheureusement cet essai n'a pas abouti car il n'y a pas induction d'excès énantiomérique. La réaction est à améliorer en changeant peut être le solvant ou la base.

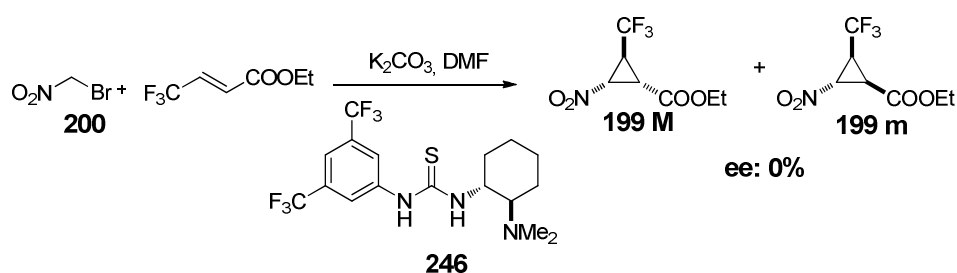


Schéma 54: essai de synthèse énantiosélective de cyclopropanes trifluorométhylés

D'autres perspectives de synthèse énantiosélective de ces cyclopropanes est l'utilisation d'amines tertiaires chirales telles que les dérivés de la quinine, dans ce dernier cas on passerait par un ylure d'ammonium quaternaire.³¹¹

Conclusion générale:

Ce travail de thèse a été essentiellement consacré à la conception, la synthèse et l'évaluation biologique des inhibiteurs non covalents fluorés et non fluorés du protéasome 26S.

Nous avons vu dans le chapitre 1 les différentes classes d'inhibiteurs du protéasome. La grande diversité et la quantité de ces inhibiteurs montrent l'importance de cette macromolécule comme cible dans le traitement du cancer. D'ailleurs, un de ces inhibiteurs est utilisé dans le traitement du myélome multiple et du lymphome du manteau et, plusieurs composés sont en études cliniques pour différents cancers. Nous avons aussi mis en évidence le bénéfice apporté par l'incorporation de groupement fluoré sur une molécule bioactive en particulier dans les structures peptidomimétiques. En revanche, ce rappel bibliographique a aussi montré que les peptidomimétiques contraints et fluorés sont peu décrits dans la littérature et le seul exemple à notre connaissance est l'analogue contraint et fluoré de la substance P contenant le motif (Z)-fluoroalcène.

La deuxième partie de mon travail s'est focalisée sur la conception, la synthèse et l'évaluation biologique d'inhibiteurs originaux du protéasome. Nous avons mis au point une synthèse facile et efficace de pseudopeptides possédant les motifs α et β -hydrazino acides et le motif β -hydrazino acide trifluorométhyle (schéma 55). Ces molécules inhibent de manière efficace le site CT-L du protéasome du lapin avec une IC_{50} de l'ordre du submicromolaire pour le composé **124b**. Nous avons ainsi démontré que l'activité biologique est maintenue en remplaçant un α -amino acide par un scaffold α ou β -hydrazino acide. La pharmacomodulation effectuée autour de ces motifs nous a permis d'établir des relations structure-activité.

Nous avons aussi mis au point un modèle de docking assez fiable qui va nous permettre de prédire le potentiel inhibiteur de nos futures molécules.

Enfin, la détermination de l' IC_{50} de nos molécules en utilisant la technique du FABS en RMN du ^{19}F a été tentée sans succès pour le moment mais, est en cours d'optimisation.

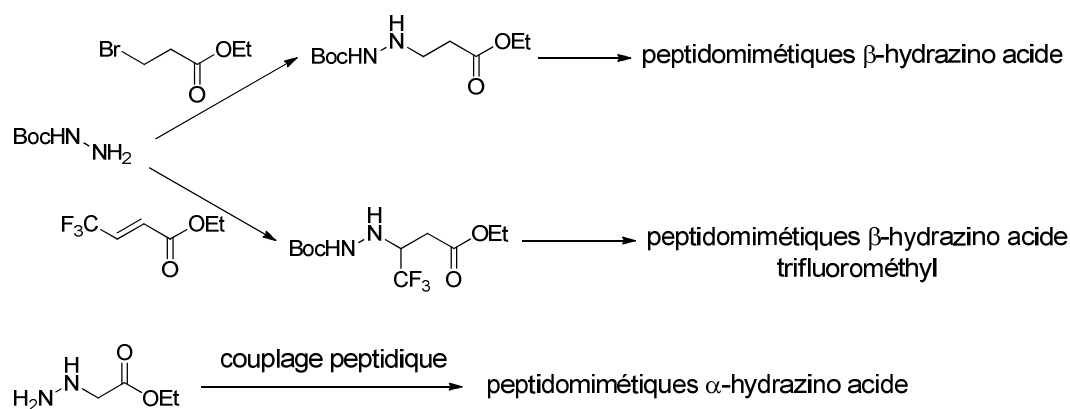


Schéma 55: voies d'accès aux peptidomimétiques contenant les motifs α et β -hydrazino acide et le motif β -hydrazino acide trifluorométhyl.

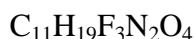
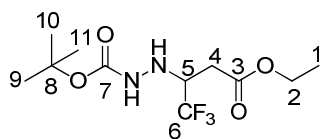
Ces travaux de thèses ont été complétés par une méthodologie de synthèse portant sur le développement de nouveaux synthons contraints fluorés dans le but de les incorporer dans nos inhibiteurs de protéasome. Les cyclopropanes trifluorométhyles ont été obtenus en utilisant la réaction tandem de Michael, addition nucléophile suivie de cyclisation avec une excellente diastéréosélectivité pour certaines réactions. Les cyclopropanes obtenus ont été fonctionnalisés en amino acides ce qui faciliterait leur incorporation dans nos pseudopeptides. Les *N*-aminoaziridines fluorés ont été synthétisés à partir d'oléfines fluorés et de précurseurs de nitrène en présence de diacétate d'iodobenzène (PhI(OAc)₂). L'incorporation de ces nouveaux scaffolds dans la structure de nos inhibiteurs de protéasome est en cours de réalisation dans le laboratoire.

Expérimental part:

General chemical techniques:

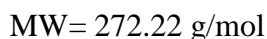
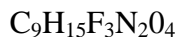
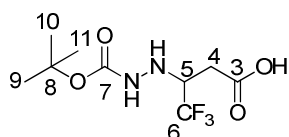
The usual solvents were purchased from commercial sources. Dimethylformamide (DMF) was distilled on CaSO₄, tetrahydrofuran (THF) was distilled on sodium/benzophenone, acetonitrile was distilled on CaCl₂. TLC was performed on silica gel, 60F-250 (0.26 mm thickness) plates. The plates were visualized with UV light (254 nm) or with a 3.5% solution of phosphomolybdic acid in ethanol or with a solution of ninhydrin in ethanol. Liquid chromatography was performed on Merck 60 silica gel (230-400 mesh). Separation of diastereoisomers of **X** was performed by HPLC using a WATERS gradient system (pump + controller E600, UV detector PDA 2996, autosampler 717) and a column SUNFIRE (C18, 5 μm, 150 mm x 19 mm). Protected aminoacids, HBTU, (HOBT) and 3-bromo-propionic acid ethyl ester **33** were purchased from commercial sources. Melting points were determined on a Kofler melting point apparatus. Unless otherwise stated, NMR spectra were performed on a Bruker AVANCE 400 (¹H, 400 MHz; ¹³C, 100 MHz). If stated, NMR spectra were performed on a BRUKER AMX 200 (¹H, 200 MHz; ¹³C, 50 MHz; 188 MHz, ¹⁹F) or an Ultrafield AVANCE 300 (¹H, 300 MHz; ¹³C, 75 MHz). Unless otherwise stated, CDCl₃ was used as solvent. Chemical shifts δ are in ppm, and the following abbreviations are used : singlet (s), doublet (d), doublet doublet (dd), triplet (t), triplet doublet (td), quintuplet (quint), multiplet (m), broad multiplet (bm), and broad singlet (bs). Mass spectra were obtained using a Bruker Esquire electrospray ionization apparatus at the SAMM (Faculty of Pharmacy at Châtenay-Malabry). Element analyses (C, H, N) were performed on a Perkin-Elmer CHN, Analyser 2400 at the Microanalyses Service of the Faculty of Pharmacy at Châtenay-Malabry (France). Rabbit protéasome and the fluorogenic substrat Suc-LLVY-AMC were obtained from Boston Biochem, Cambridge, MA.

3-(N'-tert-butoxycarbonyl-hydrazino)-4,4,4-trifluoro-butyric acid ethyl ester **85**



A solution of **84** (1.74 g, 10.35 mmol, 1.0 eq) and hydrazinecarboxylic acid tert-butyl ester (2.73 g, 20.70 mmol, 2.0 eq) in MeOH (15 ml) was stirred in a sealed tube at 80°C over 5 days. The solvent was evaporated under vacuum and purified by chromatography (cyclohexane:EtOAc 8:2), obtaining **85** (2.80 g, 9.35 mmol, 90%) as a slightly yellow oil. **Rf: 0.3** (EtOAc/cyclohexane: 1/4); **¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz)** δ 6.48 (bs, 1H, NH-C₇), 4.80 (bs, 1H, NH-C₅), 4.46 (q, J = 7.2 Hz, 2H, H₂), 4.16 (m, 1H, H₅), 2.90 (m, 2H, H₄), 1.71 (s, 9H, H₉, H₁₀, H₁₁), 1.53 (t, J = 7.2 Hz, 3H, H₁); **¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz)** δ 169.8 (C₃), 152.3 (C₇), 125.3 (q, J = 270 Hz, C₆), 81.3 (C₈), 61.3 (C₂), 58.5 (C₅), 32.1 (C₄), 28.2 (C₉, C₁₀, C₁₁), 14.0 (C₁); **¹⁹F NMR (CDCl₃, 188 MHz)** δ -75.3 (d, 1H, J = 5.6 Hz); **IR (cm⁻¹):** 3300 (N-H), 1715 (C=O), 1234 (C-O); **ESI⁺ MS m/z:** 323 [M+Na⁺]; **Anal.** Calcd for C₁₁H₁₉F₃N₂O₄: C, 44.00; H, 6.38; N, 9.33; found C, 43.72; H, 6.16; N, 9.69

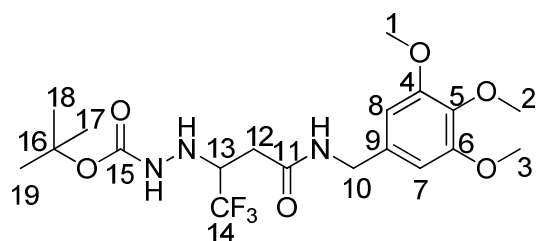
3-(N'-tert-butoxycarbonyl-hydrazino)-4,4,4-trifluoro-butyric acid **86**



An aqueous solution of NaOH 2N (1.8 mL, 9.6 mmol, 1.1 eq.) was added to a solution of **85** (985 mg, 3.28 mmol, 1.0 eq.) in THF/MeOH (5/5 mL, v/v). The reaction was stirred at room temperature over 3 hrs. After removing the solvent under reduced pressure without distilling the water, the remaining solution was brought at pH = 5 by addition of aqueous solution of 1N HCl. The aqueous phase was extracted with EtOAc (3x 20 mL). Then, the combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to give acid **86** as a white solid (844 mg, 3.10 mmol, 95%) which was used in the next step without further purification. **m.p:** 138-140 °C; **Rf: 0.3** (EtOAc/cyclohexane: 7/3); **¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz)** δ 12.54 (bs, 1H, COOH), 8.39 (bs, 1H, NH-C₇), 4.90 (bs, 1H, NH-C₅), 3.82 (m, 1H, H₅), 2.61 (dd, J = 16.6 and 5.4 Hz, 1H, H_{4a}), 2.44 (dd, J = 16.6 and 6.8 Hz, 1H, H_{4b}), 1.38 (s, 9H, H₉, H₁₀, H₁₁); **¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz)** δ 170.8 (C₃), 156.4 (C₇), 125.9 (q, J = 280 Hz, C₆), 78.9 (C₈), 57.4 (C₅), 32.4 (C₄), 28.0 (C₉, C₁₀, C₁₁); **¹⁹F NMR (DMSO-*d*₆, 188 MHz)**

δ -74.1 (d, 1H, J = 6.8 Hz); **IR** (cm^{-1}): 3325 (N-H), 3100 (OH), 1715 (C=O), 1234 (C-O); **ESI⁻ MS** m/z : 271 [M-H⁻]; **Anal.** Calcd for $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_4$: C, 39.71; H, 5.55; N, 10.29; found C, 39.83; H, 5.50; N, 10.29

N'-(2,2,2-Trifluoro-1-[(3,4,5-trimethoxy-benzylcarbamoyl)-methyl]-ethyl)-hydrazinecarboxylic acid tert-butyl ester 88

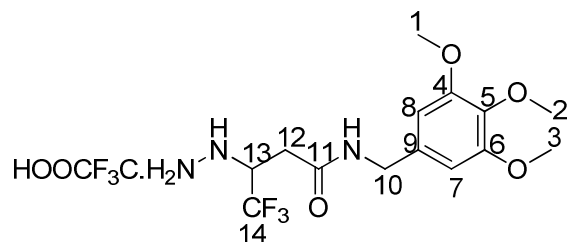


$\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_6$

MW= 451.19 g/mol

To a solution of **86** (911 mg, 3.35 mmol, 1.0 eq) in dry DMF (10ml) was successively added 3,4,5-trimethoxybenzylamine (792 mg, 4.01 mmol, 1.2 éq), DIPEA (1.7 g, 13.4 mmol, 4 eq), HBTU (1.5 g, 4.01 mmol, 1.2 eq), and HOBt (542 mg, 4.01 mmol, 1.2 eq). The mixture was stirred overnight at RT under argon atmosphere. After removal of the solvent under reduce pressure, the residue was dissolved in EtOAc (20 ml), washed with 10% aqueous solution of citric acid (2 x 20 ml), water (20 ml), 10% aqueous solution of K_2CO_3 (2 x 20 ml) and brine (20 ml). The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated to give crude product which was purified by column chromatography (EtOAc/cyclohexane: 1:1) to afford the compound **88** (1.19 g, 2.60 mmol, 79%) as colorless solid: **m.p.**: 138-140 °C; **Rf**: 0.3 (S_1O_2 , EtOAc/cyclohexane: 1/1) **¹H NMR** (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7.90 (sl, 1H, NH-C₁₀), 6.50 (s, 2H, H₇, H₈), 6.19 (s, 1H, NH-C₁₃), 4.49 (d, 2H, J =4.7 Hz, H₁₀), 3.82 (s, 6H, H₁, H₃), 3.67 (s, 3H, H₂), 3.60 (m, 1H, H₁₃), 2.53 (dd, 1H, J =16.0 and 3.2 Hz, H_{12a}), 2.41 (dd, 1H, J =16.0 and 9.0 Hz, H_{12b}), 1.4 (s, 9H, H₁₇, H₁₈, H₁₉); **¹³C NMR** (CDCl_3 , 75 MHz) δ 168.2 (C₁₁), 156.7 (C₁₅), 153.2 (C₄, C₆), 137.1 (C₅), 136.9 (C₉), 114.8 (q, J = 284.0 Hz, C₁₄) 105.1 (C₇, C₈), 81.5 (C₁₆), 60.8 (C₁₀), 59.0 (C₁, C₃), 56.1 (C₂), 44.0 (C₁₃), 33.3 (C₁₂), 28.2 (C₁₇, C₁₈, C₁₉); **¹⁹F NMR** (CDCl_3 , 188 MHz) δ -75.09 (d, 1H, J =7.0Hz); **IR** (cm^{-1}): 3300 (N-H), 1652 (C=O), 1506 (C=C), 1234 (C-O); **ESI⁺ MS** m/z : 474.2 [M+Na⁺]; **Anal.** Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_6 + 1\text{H}_2\text{O}$: C, 48.61; H, 6.45; N, 8.95; found C, 48.40; H, 5.88; N, 8.49

4,4,4-trifluoro-3-hydrazino-N-[(3,4,5-trimethoxyphenyl)methyl]butanamide trifluoroacetic acid salt **89**

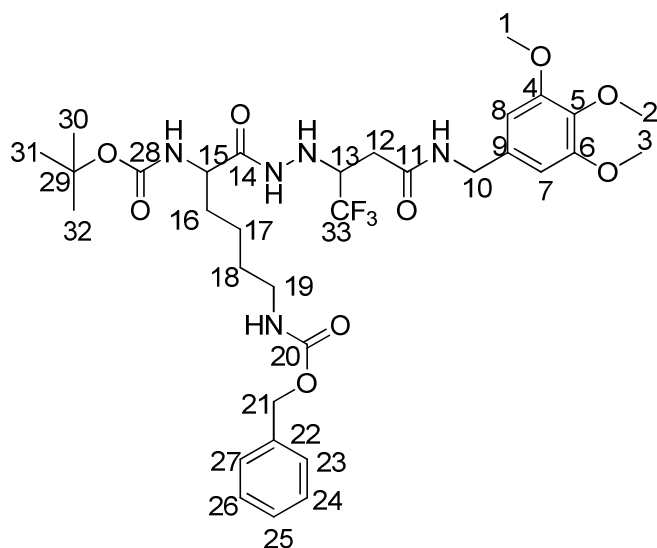


$C_{14}H_{20}F_3N_3O_4 \cdot CF_3COOH$

MW= 465.34 g/mol

A solution of the Boc-protected compound **88** (926 mg, 1.99 mmol, 1.0 eq.) in DCM/TFA 3:1 (12 mL) was stirred for 2 h at room temperature. The solvent was evaporated under reduced pressure to give the trifluoroacetic salt of **89** in quantitative yield, as a slightly yellow solid and that was used without further purification. 1H NMR (CD_3OD , 300 MHz) δ 6.62 (s, 2H, H_7, H_8), 4.31 (d, 2H, $J=2.2$ Hz, H_{10}), 4.07 (m, 1H, H_{13}), 3.81 (s, 6H, H_1, H_3), 3.75 (s, 3H, H_2), 2.89 (dd, 1H, $J=16.3$ and 3.9 Hz, H_{12a}), 2.72 (dd, 1H, $J=16.3$ and 9.0 Hz, H_{12b}).

[5-tert-Butoxycarbonylamino-5-(N'-{2,2,2-trifluoro-1-[(3,4,5-trimethoxybenzylcarbamoyl)-methyl]-ethyl}-hydrazinocarbonyl)-pentyl]-carbamic acid benzyl ester **77a**



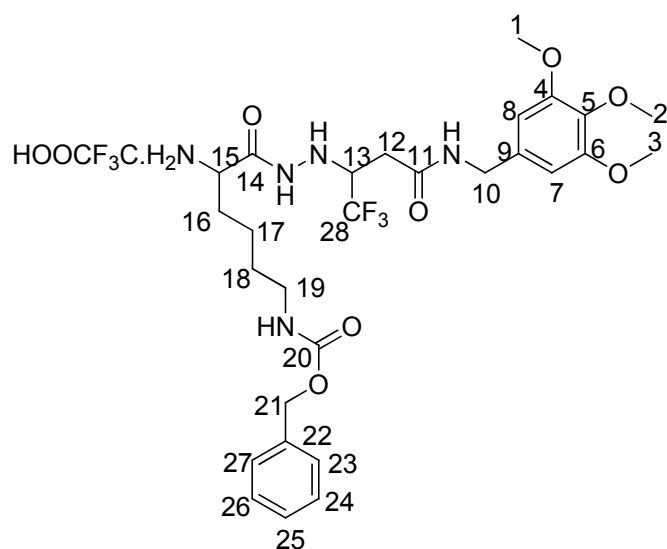
$C_{33}H_{46}F_3N_5O_9$

MW=713.73 g/mol

To a solution of the **free amine 89** (1.11 g, 3.30 mmol, 1.0 eq) in dry DMF (15 ml) was successively added Boc-lys (Z)-OH (1.50 g, 3.90 mmol, 1.2 eq), DIPEA (2.90 g, 23.03 mmol, 7 eq), HBTU (1.50 g, 3.90 mmol, 1.2 eq), and HOBT (523 mg, 3.90 mmol, 1.2 eq) in this order. The mixture was stirred overnight at RT under argon atmosphere. After removal of the

solvent under reduced pressure, the residue was dissolved in EtOAc (15 ml), washed with 10% aqueous solution of citric acid (2 x 15 ml), water (15 ml), 10% aqueous solution of K_2CO_3 (2 x 15 ml) and brine (15 ml). The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated to give a crude product which was purified by column chromatography (EtOAc) to afford the compound **77a** (1.03 g, 1.40 mmol, 45%) as a white solid; **m.p.**: 112-114 °C; **1H -NMR (CD₃OD, 300 MHz)** δ 7.35 (m, 5H, H₂₃, H₂₄, H₂₅, H₂₆, H₂₇), 6.51 (s, 2H, H₇, H₈), 5.15 (s, 2H, H₂₁), 4.89 (m, 1H, H₁₅), 4.32 (m, 2H, H₁₀), 3.90 (m, 1H, H₁₃), 3.81 (s, 6H, H₁, H₃), 3.75 (s, 3H, H₂), 3.14 (m, 2H, H₁₉), 2.50 (m, 2H, H₁₂), 1.45 (s, 9H, H₃₀, H₃₁, H₃₂); 1.80-1.20 (m, 6H, H₁₆, H₁₇, H₁₈); **^{13}C NMR (CD₃OD, 75 MHz)** δ 168.2 (C₁₁), 163.2 (C₁₄), 156.7 (C₂₈), 155.9 (C₂₀), 153.2 (C₄, C₆), 137.2 (C₂₂), 137.1 (C₉), 136.1 (C₅), 128.3 (C₂₃, C₂₇), 127.7 (C₂₄, C₂₅, C₂₆), 114.8 (q, $J = 284.0$ Hz, C₃₃), 105.1 (C₇, C₈), 81.5 (C₂₉), 65.0 (C₂₁), 60.8 (C₁₀), 59.0 (C₁, C₂, C₃), 55.6 (C₁₅), 44.0 (C₁₃), 40.0 (C₁₉), 33.3 (C₁₂), 31.8 (C₁₆), 28.0 (C₃₀, C₃₁, C₃₂) 29.1 (C₁₈), 22.4 (C₁₇); **^{19}F (CD₃OD, 188MHz)** δ -74.62 (d, 1F, $J=7.5$ Hz), -74.89 (d, 1F, $J=6.3$ Hz); **IR (cm⁻¹)**: 3312 (N-H), 1637 (C=O), 1525 (C=C), 1250 (C-O); **ESI⁺ MS m/z** : 714.4 [M+H⁺]; **Anal.** Calcd for C₃₃H₄₆F₃N₅O₉ + 1H₂O C, 54.19; H, 6.63; N, 9.58; found C, 54.17; H, 6.19; N, 9.43.

[5-Amino-5-(N'-{2,2,2-trifluoro-1-[(3,4,5-trimethoxy-benzylcarbamoyl)-methyl]-ethyl}-hydrazinocarbonyl)-pentyl]-carbamic acid benzyl ester trifluoroacetic acid salt **77b**



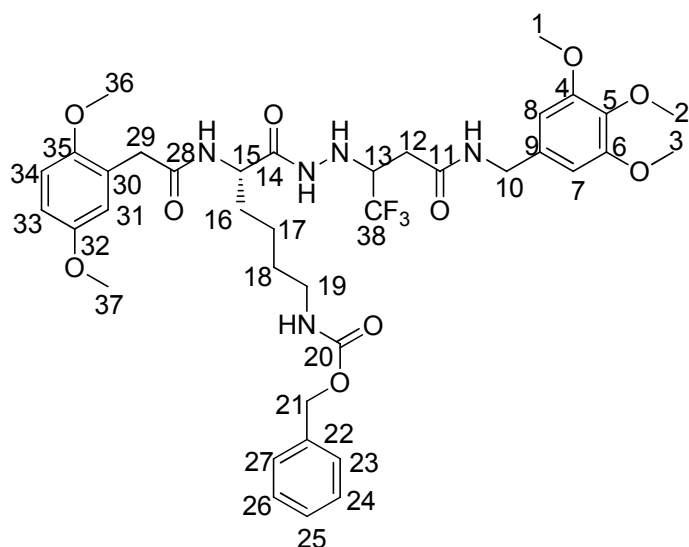
$C_{28}H_{39}F_6N_5O_9 \cdot CF_3COO^-$

MW= 727.65 g/mol

A solution of **77a** (860 mg, 1.22 mmol, 1.0 eq) in DCM/TFA 3:1 (24 mL) was stirred for 2 h at room temperature. After removal of the solvent under reduced pressure, the excess of TFA was coevaporated with methanol. The crude was then precipitated with diethyl ether and

washed with cyclohexane (3 x 15 mL) to afford **77b** as a white solid (745 mg, 1.04 mmol, quantitative). mp: 136-138 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 9.49 (m, 1H, NH-C₁₄), 8.02 (m, 1H, NH-C₂₀), 7.90 (sl, 3H, NH₃), 7.45 (m, 1H, NH-C₁₀), 7.35-7.09 (m, 5H, H₂₃, H₂₄, H₂₅, H₂₆, H₂₇), 6.51 (s, 2H, H₇, H₈), 5.25 (s, 1H, NH-C₁₃), 5.15 (s, 2H, H₂₁), 4.21 (m, 1H, H₁₅), 3.98 (m, 2H, H₁₀), 3.82 (m, 1H, H₁₃), 3.61 (s, 9H, H₁, H₂, H₃), 3.03 (m, 2H, H₁₉), 2.52 (m, 2H, H₁₂), 1.20-1.80 (m, 6H, H₁₆, H₁₇, H₁₈); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ 170.1 (C₁₁), 168.0 (C₁₄), 155.9 (C₂₀), 153.3 (C₄, C₆), 136.1 (C₉), 137.2 (C₂₂), 133.1 (C₅), 129.0; 128.5; 128.2; 127.75 (C₂₃, C₂₄, C₂₅, C₂₆, C₂₇), 114.8 (q, J = 284.0 Hz, C₂₈), 104.8 (C₇, C₈), 65.0 (C₂₁), 60.8 (C₁₀), 60.0 (C₁, C₂, C₃), 55.6 (C₁₅), 44.0 (C₁₃), 40.0 (C₁₉), 33.3 (C₁₂), 31.8 (C₁₆), 29.1 (C₁₈), 22.4 (C₁₇); ¹⁹F (DMSO-*d*₆, 188 MHz) δ -76.51 (m, 1F), -77.33 (s, 1F); IR (cm⁻¹): 2924 (C-H), 1667 (C=O), 1594 (C=C), 1123 (C-O); ESI⁺ MS *m/z*: 614 [M+H⁺]; Anal. Calcd for C₃₀H₃₉F₆N₅O₉+ 1.5 H₂O: C, 47.74; H, 5.72; N, 9.28; found C, 47.52; H, 5.04; N, 8.80.

[5-[2-(2,5-Dimethoxy-phenyl)-acetylamino]-5-(N'-(2,2,2-trifluoro-1-[(3,4,5-trimethoxy-benzylcarbamoyl)-methyl]-ethyl)-hydrazinocarbonyl)-pentyl]-carbamic acid benzyl ester 91a



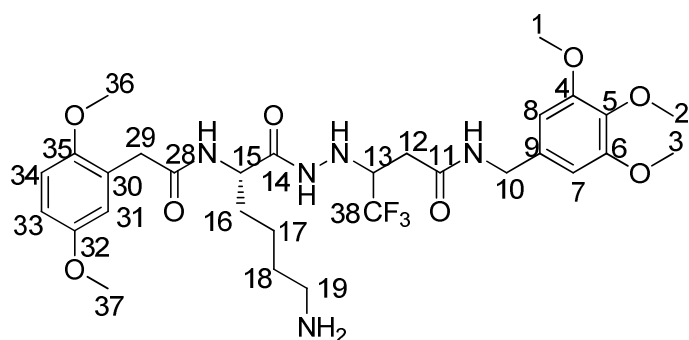
C₃₈H₄₈F₃N₅O₁₀

MW = 791.81 g/mol

To a solution of the **free amine 77b** (376 mg, 0.61 mmol, 1.0 eq) in dry DMF (10 ml) was successively added 2,5-dimethoxyphenyl acetic acid (143 mg, 0.73 mmol, 1.2 eq), DIPEA (556 mg, 4.30 mmol, 7 eq), HBTU (277 mg, 0.73 mmol, 1.2 eq), and HOBt (99 mg, 0.73 mmol, 1.2 eq) in this order. The mixture was stirred overnight at RT under argon atmosphere. After removal of the solvent under reduced pressure, the residue was dissolved in EtOAc (15 ml), washed with 10% aqueous solution of citric acid (2 x 10 ml), water (10 ml), 10%

aqueous solution of K_2CO_3 (2 x 10 ml) and brine (10 ml). The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated to give a crude product which was purified by column chromatography (EtOAc) to afford the compound **91a** (277 mg, 0.35 mmol, 57%) as a white solid; **m.p.**: 138-140 °C; **Rf**: **0.3** (S_1O_2 , EtOAc); **1H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz)** δ 9.55 (dd, 1H, $J=5.1$ Hz, NH-C₁₄), 8.52 (t, 1H, $J=5.4$ Hz, NH-C₁₁), 7.91 (m, 1H, NH-C₂₀), 7.32 (m, 5H, H₂₃, H₂₄, H₂₅, H₂₆, H₂₇), 7.21 (t, 1H, $J=5.1$ Hz, NH-C₂₈), 6.85 (d, 1H, $J=8.7$ Hz, H₃₄), 6.73 (m, 2H, H₃₁, H₃₃), 6.58 (s, 2H, H₇, H₈), 5.56 (dd, 1H, $J=14.4$ and 4.1 Hz, NH-C₁₃), 5.00 (s, 2H, H₂₁), 4.28 (m, 2H, H₁₀), 4.19 (m, 1H, H₁₅), 3.84 (m, 1H, H₁₃), 3.73 (s, 9H, H₁, H₂, H₃), 3.57 (s, 6H, H₃₆, H₃₇), 3.40 (m, 2H, H₂₉), 2.96 (m, 2H, H₁₉), 2.52 (m, 2H, H₁₂), 1.55 (m, 2H, H₁₆), 1.36 (m, 2H, H₁₈), 1.25 (m, 2H, H₁₇); **^{13}C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz)** δ 171.3 (C₁₄), 169.9 (C₂₈), 168.0 (C₁₁), 156.0 (C₂₀), 152.9 (C₄), 152.8 (C₆), 151.3 (C₃₅, C₃₂), 137.3 (C₂₂), 136.3 (C₅), 134.7 (C₉), 128.3 (C₂₃, C₂₇), 127.7 (C₂₄, C₂₅, C₂₆), 125.7 (C₃₀), 116.8 (C₃₄), 115.1 (q, $J = 284.0$ Hz, C₂₈), 111.9 (C₃₁, C₃₃), 104.4 (C₇, C₈), 65.09 (C₂₁), 59.9 (C₃₆, C₃₇), 57.6 (C₁₃), 55.7 (C₁, C₂, C₃), 51.0 (C₁₅), 42.4 (C₁₀), 40.0 (C₁₉), 36.6 (C₂₉), 33.2 (C₁₂), 31.8 (C₁₆), 29.1 (C₁₈), 22.4 (C₁₇); **^{19}F (DMSO-*d*₆, 188 MHz)** δ -76.51 (m, 1F), -77.33 (s, 1F); **IR (cm⁻¹)**: 3298 (N-H), 1633 (C=O), 1503 (C=C), 1228 (C-N), 1126 (C-O); **MS (ESI)** m/z : 793 [$M+H^+$]; **Anal.** Calcd for $C_{38}H_{48}F_3N_5O_{10}+1H_2O$: C, 56.34; H, 6.23; N, 8.65; found C, 56.55; H, 6.38; N, 8.41.

3-[2-[(2S)-6-amino-2-[[2-(2,5-dimethoxyphenyl)acetyl]amino]hexanoyl]hydrazino]-4,4,4-trifluoro-N-[(3,4,5-trimethoxyphenyl)methyl]butanamide 91b



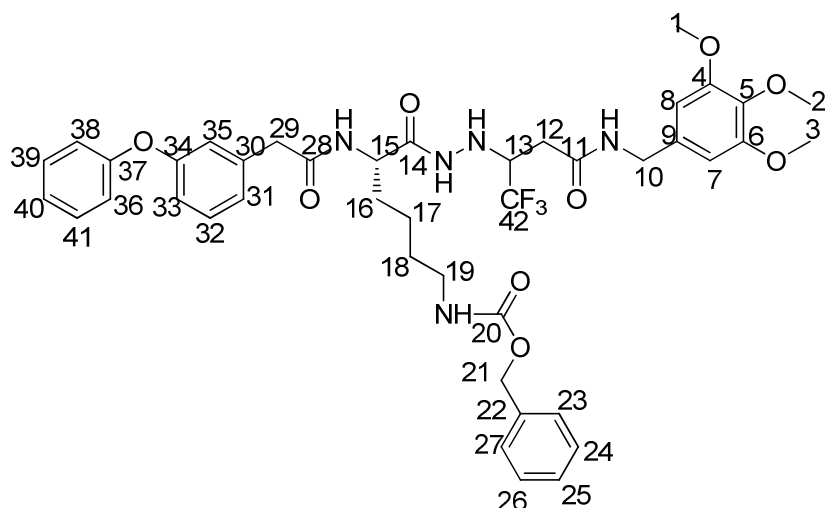
$C_{30}H_{42}F_3N_5O_8$

MW= 657.68 g/mol

To a solution of **91a** (119 mg, 0.15 mmol, 1 eq) in dry DMF/MeOH (5:30 mL, v/v) was added 10% Pd/C (11 mg). The mixture was stirred overnight under hydrogen atmosphere at room temperature. The catalyst was filtrated on a celite pad and the solvent was evaporated under reduced pressure to afford **91b** as a white solid (70 mg, 0.10 mmol, 75%). **1H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz)** δ 8.57 (t, 1H, $J=5.4$ Hz, NH-C₁₀), 7.97 (m, 1H, NH-C₁₅), 6.86 (d, 1H, $J=8.7$

Hz, H₃₄), 6.76 (m, 2H, H₃₁, H₃₃), 6.57 (s, 2H, H₇, H₈), 5.54 (d, 1H, J = 3.6 Hz, NH-C₁₃), 4.28 (m, 2H, H₁₀), 4.20 (m, 1H, H₁₅), 3.86 (m, 1H, H₁₃), 3.74 (s, 9H, H₁, H₂, H₃), 3.67 (s, 6H, H₃₆, H₃₇), 3.41 (m, 2H, H₂₉), 2.73 (m, 2H, H₁₂), 2.51 (m, 2H, H₁₉), 1.56 (m, 1H, H_{16a}), 1.50 (m, 1H, H_{16b}), 1.35 (m, 2H, H₁₈), 1.21 (m, 2H, H₁₇); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 171.3 (C₁₄), 169.9 (C₂₈), 168.1 (C₁₁), 152.8 (C₄, C₆), 151.3 (C₃₅, C₃₂), 136.3 (C₅), 134.9 (C₉), 125.7 (C₃₀), 115.0 (q, J = 284.0 Hz, C₃₈), 111.9 (C₃₁, C₃₃), 111.6 (C₃₄), 104.4 (C₇, C₈), 59.9 (C₃₆, C₃₇), 57.8 (C₁₃), 55.7 (C₁, C₂, C₃), 51.1 (C₁₅), 42.3 (C₁₀), 36.7 (C₂₉), 33.4 (C₁₂), 33.2 (C₁₉), 31.9 (C₁₆), 31.4 (C₁₈), 22.4 (C₁₇); ¹⁹F (DMSO-*d*₆, 188MHz): -71,34 (s), -72,71 (s): 2 diastereoisomers: 75/25. APCI⁺ MS *m/z*: 658 (M+H)⁺; Anal. Calcd for C₂₉H₄₀F₃N₅O₈ + 4 H₂O: C, 49.40 ; H, 6.92 ; N, 9.60; found : C, 48.83 ; H, 6.35 ; N, 9.76 ;

benzyl N-[6-oxo-6-[2-[3-oxo-1-(trifluoromethyl)-3-[(3,4,5-trimethoxyphenyl)methylamino]propyl]hydrazino]-5-[[2-(3-phenoxyphenyl)acetyl]amino]hexyl]carbamate 93a



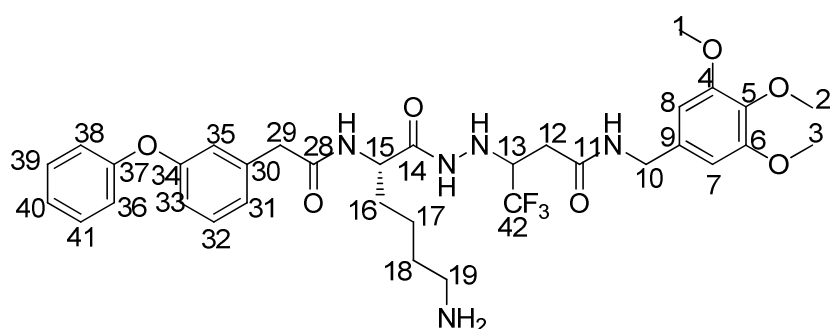
C₄₂H₄₈F₃N₅O₉

MW = 823.85 g/mol

To a solution of **77b** (376 mg, 0.61 mmol, 1.0 eq) in dry DMF (10 mL) was successively added 3-phenoxyphenyl acetic acid (166 mg, 0.73 mmol, 1.2 eq), DIPEA (556 mg, 4.30 mmol, 7.0 eq), HBTU (277 mg, 0.73 mmol, 1.2 eq), and HOBT (99 mg, 0.73 mmol, 1.2 eq). The mixture was stirred overnight at room temperature under argon atmosphere. After removal of the solvent under reduced pressure, the residue was taken up in EtOAc (15 mL), washed with 10% aqueous citric acid (2 x 10 mL), water (10 mL), 10% aqueous K₂CO₃ (2 x 10 mL) and brine (10 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure to give a crude product which was purified by column

chromatography (EtOAc) to afford the Cbz protected amine **93a** (355 mg, 4.30 mmol, 71%) as a white solid. **Rf: 0.2** (SiO₂, EtOAc/cyclohexane: 8/2); ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.10 (s, 1H, NH-C₁₄), 7.92 (m, 1H, NH-C₁₀), 7.35-7.18 (m, 6H, H₂₃, H₂₄, H₂₅, H₂₆, H₂₇, NH-C₂₈), 7.02 (m, 2H, H₃₆, H₃₈), 6.92-6.71 (m, 7H, H₃₁, H₃₂, H₃₃, H₃₅, H₃₉, H₄₁, H₄₀), 6.49 (s, 2H, H₇, H₈), 6.30 (bs, 1H, NH-C₂₀), 5.01 (s, 2H, H₂₁), 4.90 (m, 1H, NH-C₁₃), 4.32 (m, 2H, H₁₀), 4.15 (m, 1H, H₁₅), 3.79 (m, 1H, H₁₃), 3.73 (s, 9H, H₁, H₃, H₂), 3.07 (m, 2H, H₂₉), 2.41 (m, 2H, H₁₂), 2.23 (m, 2H, H₁₉), 1.70-1.41 (m, 2H, H₁₆), 1.32 (m, 2H, H₁₈), 1.15 (m, 2H, H₁₇); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 171.1 (C₁₄), 169.7 (C₂₈), 168.1 (C₁₁), 156.6 (C₃₇), 156.4 (C₃₄), 152.8 (C₆, C₄), 138.6 (C₃₀), 136.3 (C₅), 136.0 (C₂₂), 134.7 (C₉), 129.9 (C₃₈), 129.6 (C₃₁, C₃₅, C₃₆), 128.3 (C₂₃, C₂₇), 127.7 (C₂₄, C₂₅, C₂₆), 124.1 (C₃₂), 123.3 (C₃₉, C₄₁), 119.2 (C₃₃), 118.5 (C₄₀), 116.0 (q, *J* = 283.0 Hz, C₄₂), 104.4 (C₇, C₈), 67.1 (C₁₄), 66.6 (C₂₁), 59.9 (C₂), 57.5 (C_{1,3}), 55.7 (C₁₃), 51.9 (C₁₉), 50.9 (C₁₅), 42.3 (C₁₀), 41.8 (C₂₉), 33.3 (C₁₂), 32.0 (C₁₆), 26.5 (C₁₈), 23.1 (C₁₇); ¹⁹F (CDCl₃, 188 MHz) δ -76.51 (m, 1F), -77.33 (s, 1F).

3-[2-[(2S)-6-amino-2-[[2-(3-phenoxyphenyl)acetyl]amino]hexanoyl]hydrazino]-4,4,4-trifluoro-N-[(3,4,5-trimethoxyphenyl)methyl]butanamide 93b



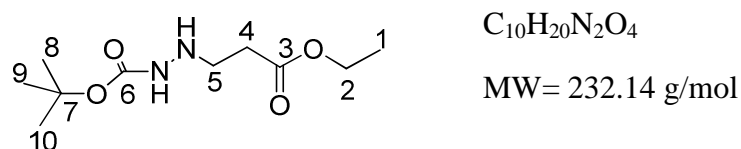
C₃₄H₄₂F₃N₅O₇

MW= 689.72 g/mol

To a solution of **93a** (183 mg, 0.22 mmol, 1.0 eq) in dry DMF/MeOH 1/15 (48 mL) was added 10% Pd/C (18 mg). The mixture was stirred overnight under hydrogen atmosphere at room temperature and was filtered on a celite pad. After removal of the solvent under reduced pressure **93b** was obtained as a white solid (89%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 9.62 (s, 1H, NH-C₁₄), 8.53 (m, 1H, NH-C₁₀), 8.21 (m, 1H, NH-C₁₅), 7.37 (m, 2H, H₃₆, H₃₈), 7.27 (m, 2H, H₃₁, H₃₅), 7.11 (m, 2H, H₃₉, H₄₁), 7.02 (m, 1H, H₃₂), 6.99 (m, 1H, H₄₀), 6.94 (m, 1H, H₃₃), 6.57 (s, 2H, H₇, H₈), 5.54 (m, 1H, NH-C₁₃), 4.24 (m, 2H, H₁₀), 4.19 (m, 1H, H₁₅), 3.85 (m, 1H, H₁₃), 3.73 (s, 6H, H₁, H₃), 3.62 (s, 3H, H₂), 3.45 (m, 2H, H₂₉), 2.51 (m, 2H, H₁₂), 2.23 (m, 2H, H₁₉), 1.52 (m, 2H, H₁₆), 1.29 (m, 2H, H₁₈), 1.19 (m, 2H, H₁₇); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 171.1 (C₁₄), 169.7 (C₂₈), 168.1 (C₁₁), 156.6 (C₃₇), 156.4 (C₃₄), 152.8 (C₆, C₄), 138.6

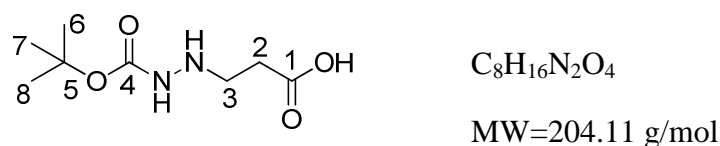
(C₃₀), 136.3 (C₅), 134.7 (C₉), 129.9 (C₃₈), 129.6 (C₃₁, C₃₅, C₃₆), 124.1 (C₃₂), 123.3 (C₃₉, C₄₁), 119.2 (C₃₃), 118.5 (C₄₀), 104.4 (C₇, C₈), 115.8 (q, *J* = 283.0 Hz, C₄₂), 59.9 (C₂), 57.5 (C₁, C₃), 55.7 (C₁₃), 51.9 (C₁₉), 50.9 (C₁₅), 42.3 (C₁₀), 41.8 (C₂₉), 33.3 (C₁₂), 32.0 (C₁₆), 26.5 (C₁₈), 23.1 (C₁₇). ¹⁹F (DMSO-*d*₆, 188MHz):): -71,35 (s, 1F), -72,75 (s, 1F): 2 diastereoisomers: 75/25; **ESI⁺ MS** *m/z*: 690 (M+H)⁺; **Anal.** Calcd for C₃₄H₄₂F₃N₅O₇ + 0.75 H₂O: C, 58.66; H, 5.97; N, 10.36; found. C, 58.38; H, 6.09; N, 9.40;

3-(N'-tert-Butoxycarbonyl-hydrazino)-propionic acid ethyl ester **95**



A solution of 3-Bromo-propionic acid ethyl ester **94** (2 ml, 15.7 mmol, 1.0 eq.), DIPEA (2.6 ml, 15.7 mmol, 1.0 eq.) and Boc-hydrazine (3.1 g, 3.1 g, 23.55 mmol, 1.5 eq) in toluene was heated at 80 °C for 4 days. After removal of the solvent under pressure, the crude product was purified by column chromatography (cyclohexane:EtOAc 6:4) to give **95** as a slightly yellow oil (1.58 g, 6.80 mmol, 56%). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 6.26 (bs, 1H, NH-C₅), 4.08 (q, 2H, *J*=7.1 Hz, H₂), 3.06 (t, 2H, *J*= 6.6 Hz, H₅), 2.41 (t, 2H, *J*=6.6 Hz, H₄), 1.39 (s, 9H, H₈, H₉, H₁₀), 1.19 (t, 3H, *J*=7.1Hz, H₁); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 172.2 (C₃), 156.7 (C₆), 80.3 (C₇), 60.3 (C₂), 47.3 (C₅), 33.0 (C₄), 28.2 (C₈, C₉, C₁₀), 14.0 (C₁); **IR (cm⁻¹):** 2980 (C-H), 1714 (C=O), 1252 (C-O); **ESI⁺ MS** *m/z*: 233 [M+H⁺]; **Anal.** Calcd for C₁₀H₂₀N₂O₄: C, 51.71; H, 8.68; N, 12.06; found C, 51.61; H, 8.25; N, 11.58.

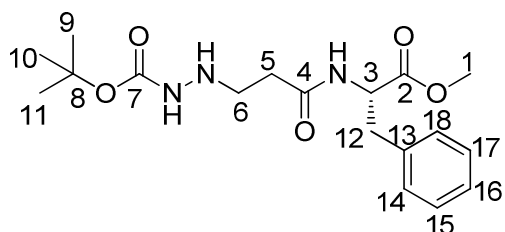
3-(2(N-tert butoxycarbonyl)hydrazinyl)propionic acid **96**



An aqueous solution of NaOH 2N (4.8 mL, 9.6 mmol, 1.1 eq.) was added to a solution of **95** (2.00 g, 8.6 mmol, 1.0 eq.) in THF/MeOH (10/10 mL, v/v). The reaction was stirred at room temperature over 3 hrs. After removing the solvent under reduced pressure without distilling the water, the remaining solution was brought at pH = 5 by addition of aqueous solution of 1N HCl. The aqueous phase was extracted with EtOAc (3x 20 mL). Then, the combined organic

layers were dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure to give the 3-(N'-tert-Butoxycarbonyl-hydrazino)-propionic acid **96** as a white solid (1.64 g, 8.0 mmol, 93%) which was used in the next step without further purification; **m.p.** 112-114 °C (crude); $^1\text{H NMR}$ (DMSO-*d*₆ 300 MHz) δ 8.20 (s, 2H, OH and NH-C₄), 3.30 (s, 1H, NH-C₃), 2.90 (t, 2H, J=6.9 Hz, H₃), 2.30 (t, 2H, J=6.9 Hz, H₂), 1.40 (s, 9H, H₆, H₇, H₈); $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ 173.2 (C₁), 156.2 (C₄), 78.2 (C₅), 46.7 (C₃), 32.5 (C₂), 28.0 (C₆, C₇, C₈); IR (cm⁻¹): 3350 (N-H), 2981 (C-H), 1679 (C=O), 1437 (C-H); **ESI⁺ MS** *m/z*: 227 [M+Na⁺], 431.1 [2M+Na⁺]; **Anal.** Calcd for C₈H₁₆N₂O₄: C 47.05; H, 7.90; N, 13.72; found C, 47.43; H, 7.90; N, 13.33.

2-[3-(N'-tert-Butoxycarbonyl-hydrazino)-propionylamino]-3-phenyl-propionic acid methyl ester **97**



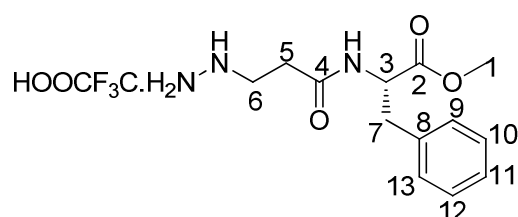
C₁₈H₂₇N₃O₅

MW= 365 g/mol

To a solution of **96** (985 mg, 4.8 mmol, 1.0 eq) in dry DMF (15 ml) was successively added H-Phe-OMe (1.25 g, 5.8 mmol, 1.2 eq), DIPEA (2.48 g, 19.2 mmol, 4 eq), HBTU (2.20 g, 5.8 mmol, 1.2 eq) and HOBt (784 mg, 5.8 mmol, 1.2 eq). The mixture was stirred overnight at room temperature under argon atmosphere. After removal of the solvent under reduced pressure, the residue was taken up in EtOAc (20 ml), washed with 10% aqueous solution of citric acid (2 x 15 ml), water (15 ml), 10% aqueous solution of K₂CO₃ (2 x 15 ml) and brine (20 ml). The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure to give crude product which was purified by column chromatography (EtOAc /cyclohexane, 8:2) to give the compound **97** (1.33 g, 3.6 mmol, 76%) as uncolored oil. **R_f** = **0.30** (EtOAc /cyclohexane, 8:2, v/v, SiO₂). $^1\text{H NMR}$ (DMSO, 300 MHz) δ 8.45 (s, 1H, NH-C₇), 8.30 (s, 1H, NH-C₄), 7.28-7.13 (m, 5H, H₁₄, H₁₅, H₁₆, H₁₇, H₁₈), 6.10 (sl, 1H, NH-C₆), 4.85 (dd, 1H, J=6.9 and 13.1 Hz, H₃), 3.73 (s, 3H, H₁), 3.11 (dd, 1H, J=6.9 and 13.1 Hz, H_{12a}), 3.09-2.99 (m, 3H, H₆ and H_{12b}), 2.34 (t, 2H, J=5.4 Hz, H₅), 1.45 (s, 9H, H₉, H₁₀, H₁₁); $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO, 75 MHz) δ 172.4 (C₂), 171.9 (C₄), 157.0 (C₇), 136.21 (C₁₃), 129.2 (C₁₄, C₁₈), 128.5 (C₁₅, C₁₇), 127.1 (C₁₆), 81.0 (C₈), 53.3 (C₃), 52.3 (C₁), 47.9 (C₆), 37.5 (C₁₂), 33.7 (C₅),

28.2 (C₉, C₁₀, C₁₁); **IR** (cm⁻¹): 2935 (C-H), 1728 (C=O), 1529 (N-H), 1156 (C-O); **ESI⁺ MS** *m/z*: 388.3 [M+Na⁺]; **Anal.** Calcd for C₁₈H₂₇N₃O₅: C, 59.16; H, 7.45; N, 11.50; found C, 59.20; H, 7.20; N, 11.05.

methyl (2*S*)-2-(3-hydrazinopropanoylamino)-3-phenyl-propanoate trifluoroacetic acid salt **98**

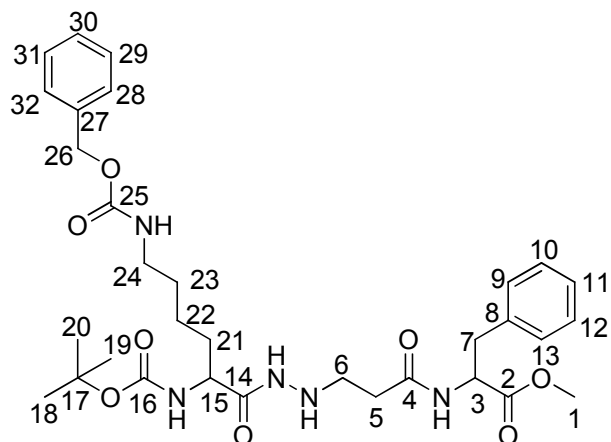


C₁₃H₁₉N₃O₃.CF₃COOH

MW= 379.36 g/mol

A solution of **97** (1.03 g, 2.82 mmol, 1.0 eq) in HCl 4M in dioxane (30 ml) was stirred for 2 h at room temperature. The solvent was evaporated in vacuum to afford the hydrochloride salt of **98** with quantitative yield as a yellow oil, which was used without further purification. **¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz)** δ 8.61 (d, 1H, J=7.5 Hz, NH-C₃), 7.20-7.45 (m, 5H, H₉, H₁₀, H₁₁, H₁₂, H₁₃), 4.51 (m, 1H, H₃), 3.97 (sl, 3H, NH₃), 3.59 (s, 3H, H₁), 2.78-3.15 (m, 4H, H₆, H₇), 2.48 (m, 2H, H₅); **¹³C RMN (DMSO-*d*₆, 75 MHz)** 171.9 (C₂), 169.8 (C₄), 137.0 (C₈), 129.0 (C₉, C₁₃), 128.2 (C₁₀, C₁₂), 126.56 (C₁₁), 53.6 (C₃), 51.8 (C₁), 46.15 (C₆), 36.7 (C₇), 35.9 (C₅).

2-{3-[N'-(6-Benzyloxycarbonylamino-2-tert-butoxycarbonylamino-hexanoyl)-hydrazino]-propionylamino}-3-phenyl-propionic acid methyl ester **99**

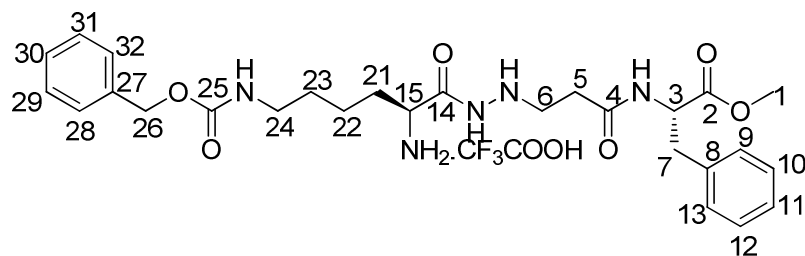


$C_{32}H_{45}N_5O_8$

MW=627.73 g/mol

To a solution of **98** (653 mg, 1.8 mmol, 1 eq) in dry DMF (15 ml) was successively added Boc-Lys(Z)-OH (841 mg, 2.2 mmol, 1.2 eq), DIPEA (1.62 g, 12.6 mmol, 7 eq), HBTU (841 mg, 2.2 mmol, 1.2 eq) and HOBt (298 mg, 2.2 mmol, 1.2 eq). The mixture was stirred overnight at room temperature under argon atmosphere. After removal of the solvent under reduced pressure, the residue was dissolved in EtOAc (15 ml), washed with 10% aqueous solution of citric acid (2 x 15 ml), water (15 ml), 10% aqueous solution of K_2CO_3 (2 x 15 ml) and brine (20 ml). The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated under reduced pressure to give crude product which was purified by column chromatography (EtOAc) to afford the compound **99** (569 mg, 0.90 mmol, 50%) as white solid: **mp** 106-108 °C; **Rf** = 0.20 (EtOAc, SiO_2); 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 8.07 (bs, 1H, NH- C_{14}), 7.20-7.41 (m, 10H, $H_9, H_{10}, H_{11}, H_{12}, H_{13}$ and $H_{28}, H_{29}, H_{30}, H_{31}, H_{32}$), 7.17 (s, 1H, NH- C_{25}), 7.15 (s, 1H, NH- C_{16}), 5.20 (m, 1H, NH- C_6), 5.09 (s, 2H, H_{26}), 4.85 (m, 1H, H_3), 4.15 (m, 1H, H_{15}), 3.60 (s, 3H, H_1), 3.05-3.28 (m, 6H, H_6, H_7, H_{24}), 2.35 (t, 2H, $J=6.8$ Hz, H_5), 1.31-1.88 (m, 6H, H_{21}, H_{22}, H_{23}), 1.50 (s, 9H, H_{18}, H_{19}, H_{20}); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 172.9 (C_2), 171.4 (C_4), 171.1 (C_{14}), 156.6 (C_{25}), 156.0 (C_{17}), 136.6 (C_{27}), 136.1 (C_8), 129.1 ; 128.6 ; 128.5 ; 128.0 ($C_9, C_{10}, C_{11}, C_{12}, C_{13}$ and $C_{28}, C_{29}, C_{30}, C_{31}, C_{32}$), 80.4 (C_{17}), 66.6 (C_{26}), 56.0 (C_1), 53.3 (C_3), 51.6 (C_{15}), 47.7 (C_6), 40.5 (C_{24}), 37.5 (C_7), 34.3 (C_5), 31.1(C_{21}), 29.3(C_{23}), 28.0 (C_{18}, C_{19}, C_{20}), 22.3 (C_{22}); **IR** (cm^{-1}): 3309 (N-H), 1686 (C=O), 1653 (C=O), 1524 (C=C); **ESI⁺ MS** m/z : 650.8 [$M+Na^+$]; **Anal.** Calcd for $C_{32}H_{45}N_5O_8$ C, 61.23; H, 7.23; N, 11.16; found C, 61.03; H, 7.14; N, 10.94.

Methyl (2S)-2-[3-[2-[(2S)-2-amino-6-(benzyloxycarbonylamino)hexanoyl] hydrazino] propanoylamino]-3-phenyl-propanoate trifluoroacetic acid salt **100**

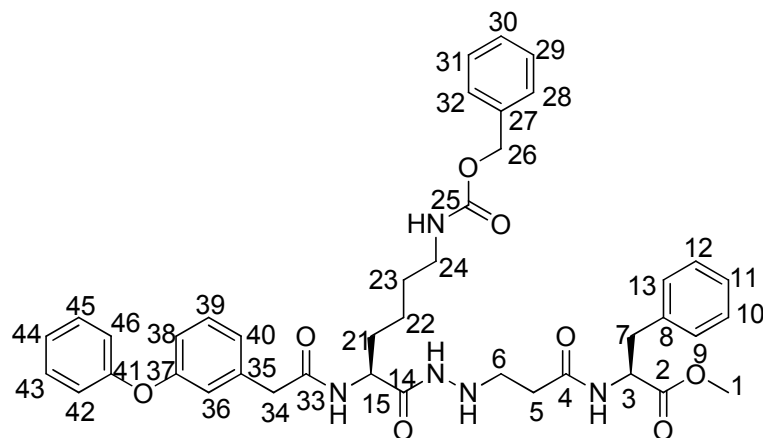


$C_{27}H_{37}N_5O_6 \cdot CF_3COOH$

MW= 641.26 g/mol

A solution of **99** (400 mg, 0.64 mmol, 1.0 eq) in DCM/TFA 3:1 (16 mL) was stirred for 2 h at room temperature. The solvent was evaporated under reduced pressure and the excess of TFA was coevaporated with methanol. The crude product was then precipitated with diethyl ether and washed with cyclohexane (3 x 15 mL) to afford **100** as a white solid with quantitative yield. **mp:** 96-98 °C 1H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz,) δ 9.89 (bs, 1H, NH-C₁₄), 8.41 (s, 1H, NH-C₄), 8.20 (s, 3H, NH₃), 7.95 (s, 1H, NH-C₂₅), 7.17-7.40 (m, 10H, H₉, H₁₀, H₁₁, H₁₂, H₁₃ and H₂₈, H₂₉, H₃₀, H₃₁, H₃₂), 6.51 (bs, 1H, NH-C₆), 5.02 (s, 2H, H₂₆), 4.51 (m, 1H, H₃), 3.55 (m, 1H, H₁₅), 3.50 (s, 3H, H₁), 3.10-2.82 (m, 6H, H₆, H₇, H₂₄), 2.23 (t, 2H, J= 6,8 Hz, H₅), 1.22-1.70 (m, 6H, H₂₁, H₂₂, H₂₃); ^{13}C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz,) δ 174.5 (C₂), 174.1 (C₄), 169.5 (C₁₄), 159.4 (C₂₅), 138.8 (C₂₇), 138.5 (C₈), 130.8 ; 130.2 ; 129.8 ; 129.2 ; 128.3 (C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃ and C₂₈, C₂₉, C₃₀, C₃₁, C₃₂), 67.8 (C₂₆), 55.7 (C₁), 53.6 (C₃), 53.1 (C₆), 41.6 (C₂₄), 51.6 (C₁₅), 38.7 (C₇), 35.3 (C₅), 32.5 (C₂₁), 30.8 (C₂₃), 23.5 (C₂₂); **ESI⁺ MS** *m/z*: 528 [M+H]⁺; **Anal.** Calcd for C₂₉H₃₈F₃N₅O₈·1.5 H₂O: C, 52.12; H, 6.20; N, 10.48; found C, 52.48; H, 6.28; N, 10.13.

2-[3-(N'-(6-Benzoyloxycarbonylamino-2-[2-(4-phenoxy-phenyl)-acetylamino]-hexanoyl)-hydrazino)-propionylamino]-3-phenyl-propionic acid methyl ester 101a



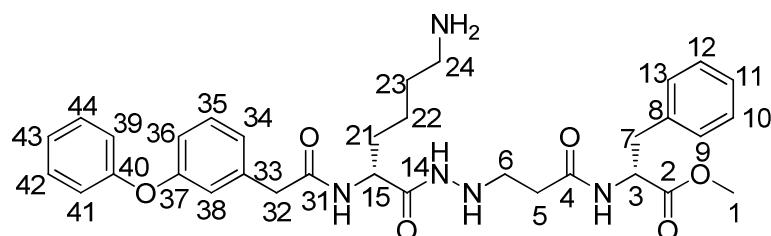
$C_{41}H_{52}N_4O_8$

MW= 737.83 g/mol

To a solution of **100** (387 mg, 0.41 mmol, 1.0 eq) in dry DMF (5ml) was successively added 2-phenoxyphenylacetic acid (114 mg, 0.50 mmol, 1.2 eq), DIPEA (371 mg, 2.87 mmol, 7.0 eq), HBTU (190 mg, 0.50 mmol, 1.2 eq) and HOBt (67 mg, 0.50 mmol, 1.2 eq). The mixture was stirred overnight at RT under argon atmosphere. After removal of the solvent under reduced pressure, the residue was dissolved in EtOAc (10 ml), washed with 10% aqueous solution of citric acid (2 x 10 ml), water (10 ml), 10% aqueous solution of K_2CO_3 (2 x 10 ml) and brine (10 ml). The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated under reduced pressure to give crude product which was purified by column chromatography (EtOAc /MeOH, 10:0 then EtOAc/MeOH, 9.5:0.5, EtOAc/MeOH, 9:1, EtOAc /MeOH, 8.5:1.5 v/v) to give the compound **101a** (119 mg, 0.16 mmol, 40%) as white solid: **mp** decomposition at 70-80 °C (452 mg, 0.61 mmol, 81%); **Rf** = 0,1(EtOAc, SiO_2); **1H NMR (CDCl₃, 400 MHz)** δ 8.45 (s, 1H, NH-C₁₄), 7.41-7.10 (m, 15H, H₉, H₁₀, H₁₁, H₁₂, H₁₃ and H₂₈, H₂₉, H₃₀, H₃₁, H₃₂, H₃₉, H₄₀, and H₄₃, H₄₄, H₄₅), 7.14 (bs, 1H, NH-C₃), 7.01-6.80 (m, 4H, H₃₆, H₃₈, H₄₂, H₄₆), 6.38 (d, 1H, J=7.3 Hz, NH-C₁₅), 5.25 (m, 1H, NH-C₆), 5.10 (s, 2H, H₂₆), 4.83 (dd, 1H, J=7.5 and 12.2 Hz, H₃), 4.28 (dd, 1H, J=7.2 et 14.0 Hz, H₁₅), 3.79 (s, 3H, H₁), 3.52 (s, 2H, H₃₄), 3.16 (m, 1H, H_{7a}), 3.13 (m, 2H, H₂₄), 3.03 (m, 1H, H_{7b}), 3.02 (m, 2H, H₆), 2.22 (m, 2H, H₅), 1.75 (m, 1H, H_{21a}), 1.55 (m, 1H, H_{21b}), 1.46 (m, 2H, H₂₃), 1.24 (m, 2H, H₂₂); **^{13}C NMR (CDCl₃, 100 MHz)** δ 172.9 (C₂), 171.8 (C₃₃), 171.4 (C₄), 171.1 (C₁₄), 156.6 (C₂₅), 153.8 (C₃₇), 151.1 (C₄₁), 136.6 (C₂₇), 136.1 (C₈), 135.8 (C₃₅) 129.1 ; 128.6 ; 128.5 ; 128.0 ; 127.0 (C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃ and C₂₈, C₂₉, C₃₀, C₃₁, C₃₂, C₄₀, C₄₂, C₄₃, C₄₄), 124.2 (C₄₅), 117.2 (C₄₆), 113.2 (C₃₉), 111.8 (C₃₈), 66.6 (C₂₆), 56.0 (C₁), 53.3 (C₃), 52.5 (C₃₄), 51.6 (C₁₅), 47.7 (C₆), 40.5 (C₂₄), 37.5 (C₇), 34.3 (C₅), 31.1(C₂₁), 29.3(C₂₃), 22.3 (C₂₂); **ESI⁺ MS m/z:** 760 [M+Na⁺],

776.5 [M+K⁺]; **Anal.** Calcd for C₄₁H₄₇N₅O₈+0.75 H₂O: C, 65.58; H, 6.52; N, 9.53; found C, 65.95; H, 6.40; N, 8.87.

Methyl (2S)-2-[3-[2-[(2S)-6-amino-2-[[2-(3-phenoxyphenyl)acetyl]amino]hexanoyl]hydrazino]propanoylamino]-3-phenyl-propanoate 101b

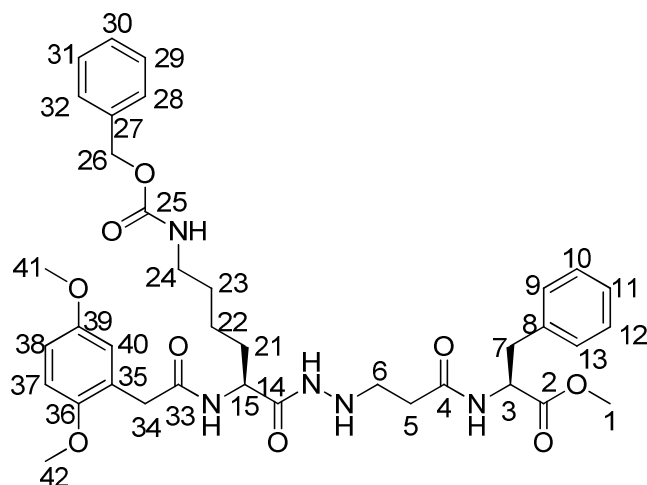


C₃₃H₄₁N₅O₆

MW= 603.71 g/mol

To a solution of **101a** (114 mg, 0.15 mmol, 1 eq) in dry methanol (5 mL) was added 10% Pd/C (11 mg). The mixture was stirred overnight under hydrogen atmosphere at room temperature and filtered on a celite pad. After the removal of the solvent under reduced pressure, **101b** was obtained as yellow resinous oil (81 mg, 0.13 mmol, 89%). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.55 (bs, 1H, NH-C₁₅), 7.23-6.85 (m, 15H, H₉, H₁₀, H₁₁, H₁₂, H₁₃, H₃₄, H₃₅, H₃₆, H₃₈, H₃₉, H₄₄, H₄₃, H₄₂, H₄₁, NH-C₃), 4.80 (m, 1H, H₃), 4.33 (m, 1H, H₁₅), 3.67 (m, 3H, H₁), 3.51 (m, 2H, H₃₂), 3.10 (m, 1H, H_{7a}), 3.02 (m, 1H, H_{7b}), 3.00 (m, 2H, H₆), 2.70 (m, 2H, H₂₄), 2.24 (m, 2H, H₅), 1.70 (m, 1H, H_{21a}), 1.59 (m, 1H, H_{21b}), 1.49 (m, 2H, H₂₃), 1.33 (m, 2H, H₂₂); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 172.9 (C₂), 171.9 (C₄), 171.2 (C₁₄), 171.0 (C₃₁), 157.54 (C₃₇), 156.9 (C₄₀), 136.7 (C₈), 136.3 (C₃₃), 130.0, 129.8, 129.1, 128.5 (C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃), 127.0, 124.0, 123.4 (C₃₄, C₃₅, C₄₂, C₄₃, C₄₄), 119.7, 118.9, 117.4 (C₃₆, C₃₈, C₃₉, C₄₁), 53.5 (C₃), 52.4 (C₁), 51.8 (C₁₅), 47.5 (C₆), 43.0 (C₃₂), 40.5 (C₂₄), 37.5 (C₇), 34.1 (C₅), 31.7 (C₂₁), 30.0 (C₂₃), 22.3 (C₂₂); **ESI⁺ MS** *m/z*: 604 (M+H)⁺; **Anal.** Calcd for C₃₃H₄₁N₅O₆ + 2.5 H₂O: C, 61.13; H, 7.17 ; N, 10.90 ; found C, 61.36 ; H, 6.50 ; N, 10.07.

Methyl (2S)-2-[3-[2-[(2S)-6-(benzyloxycarbonylamino)-2-[[2-(2,5-dimethoxyphenyl)acetyl]amino]hexanoyl]hydrazino]propanoylamino]-3-phenyl-propanoate 102a



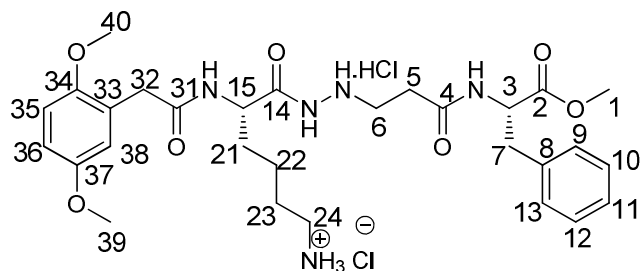
$C_{37}H_{47}N_5O_9$

MW= 705.80 g/mol

To a solution of **100** (490 mg, 0.93 mmol, 1.0 eq) in dry DMF (10ml) was successively added 2,5-dimethoxyphenyl acetic acid (235 mg, 1.2 mmol, 1.2 eq), DIPEA (841 mg, 6.51 mmol, 7 eq), HBTU (456 mg, 1.2 mmol, 1.2 eq) and HOBt (152 mg, 1.2 mmol, 1.2 eq). The mixture was stirred overnight at RT under argon atmosphere. After removal of the solvent under reduced pressure, the residue was taken up in EtOAc (20 ml), washed with 10% aqueous solution of citric acid (2 x 15 ml), water (15 ml), 10% aqueous solution of K_2CO_3 (2 x 15 ml) and brine (20 ml). The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated to afford crude product which was purified by column chromatography (EtOAc /MeOH, 10:0 then EtOAc/MeOH, 9.5:0.5, EtOAc/MeOH, 9:1, EtOAc /MeOH, 8.5:1.5 v/v) to give the compound **102a** (247 mg, 0.35 mmol, 37%) as a white solid. **m.p.** : 171-173°C; **Rf**: 0.1 (AcOEt, $S_I O_2$); **1H NMR (CDCl₃, 400 MHz)** δ 7.20-7.33 (m, 10H, H_9 , H_{10} , H_{11} , H_{12} , H_{13} and H_{28} , H_{29} , H_{30} , H_{31} , H_{32}), 7.14 (d, 1H, $J=7.3$ Hz, NH- C_3), 6.82-6.73 (m, 3H, H_{37} , H_{38} , H_{40}), 6.48 (d, 1H, $J=7.3$ Hz, NH- C_{15}), 5.10 (s, 2H, H_{26}), 4.83 (dd, 1H, $J=7.5$ and 12.2 Hz, H_3), 4.28 (dd, 1H, $J=7.2$ and 14.0 Hz, H_{15}), 3.72 (s, 6H, H_{41} , H_{42}), 3.79 (s, 3H, H_1), 3.52 (s, 2H, H_{34}), 3.16 (m, 1H, H_{7a}), 3.13 (m, 2H, H_{24}), 3.03 (m, 1H, H_{7b}), 3.02 (m, 2H, H_6), 2.21 (t, 2H, $J=5.4$ Hz, H_5), 1.75 (m, 1H, H_{21a}), 1.55 (m, 1H, H_{21b}), 1.46 (m, 2H, H_{23}), 1.24 (m, 2H, H_{22}); **^{13}C NMR (CDCl₃, 100 MHz)** δ 172.9 (C_2), 171.8 (C_{33}), 171.4 (C_4), 171.1 (C_{14}), 156.6 (C_{25}), 153.8 (C_{36}), 151.1 (C_{39}), 136.6 (C_{27}), 136.1 (C_8), 129.1 ; 128.6 ; 128.5 ; 128.0 ; 127.0 (C_9 , C_{10} , C_{11} , C_{12} , C_{13} and C_{28} , C_{29} , C_{30} , C_{31} , C_{32}), 124.2 (C_{35}), 117.2 (C_{38}), 113.2 (C_{37}), 111.8 (C_{40}), 66.6 (C_{26}), 56.0 (C_1), 53.3 (C_3), 52.5 (C_{41} , C_{42}), 51.6 (C_{15}), 47.7 (C_6), 40.5 (C_{24}), 38.9 (C_{34}), 37.5 (C_7), 34.3 (C_5), 31.1 (C_{21}), 29.3(C_{23}), 22.3 (C_{22}); **IR (cm⁻¹)** : 3283 (N-H), 1742 (C=O), 1682 (C=O),

1638 (N-H), 1535 (C=C). **APCI⁺ MS** *m/z*: 706 [M+H]⁺. **Anal.** Calcd for C₃₇H₄₇N₅O₉ + 1.5 H₂O: C, 60.64; H, 6.89; N, 9.56; found C, 60.48; H, 6.71; N, 9.31

Methyl (2S)-2-[3-[2-[(2S)-6-amino-2-[[2-(2,5-dimethoxyphenyl)acetyl]amino]hexanoyl]hydrazino]propanoylamino]-3-phenyl-propanoate 102b

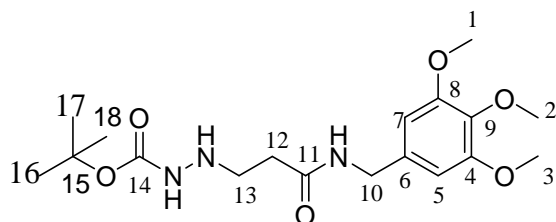


C₂₉H₄₃N₅O₇Cl₂

MW= 644.59 g/mol

To a solution of **102a** (175 mg, 0.24 mmol, 1 eq) in dry methanol (5 mL) was added 10% Pd/C (17.5 mg). The mixture was stirred overnight under hydrogen atmosphere at room temperature and filtered on a celite pad. After removal of the solvent under reduced pressure and addition of HCl/MeOH, **102b** was obtained as a white hygroscopic hydrochloride salt (110 mg, 0.17 mmol, 73%). **¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*6)** δ 7.28-7.19 (m, 5H, H₉, H₁₀, H₁₁, H₁₂, H₁₃), 6.83 (m, 3H, H₃₅, H₃₆, H₃₈), 4.67 (dd, 1H, J= 5.73 and 8.71 Hz, H₃), 4.34 (dd, 1H, J= 5.82 and 8.30, H₁₅), 3.79 (s, 3H, H₃₉), 3.74 (s, 3H, H₄₀), 3.69 (s, 3H, H₁), 3.52 (d, 2H, J= 5.06 Hz, H₃₂), 3.17 (dd, 1H, J= 5.63 and 13.82, H_{7a}), 3.01-2.88 (m, 5H, H_{7b}, H₆, H₂₄), 2.31 (m, 2H, H₅), 1.39-1.04 (m, 6H, H₂₁, H₂₂, H₂₃); **¹³C NMR (100 MHz, MeOD-*d*6)** δ 174.7 (C₂), 173.4 (C₁₄), 172.4 (C₄), 171.9 (C₃₁), 155.0 (C₃₇), 153.1 (C₃₄), 138.0 (C₈), 130.3 (C₉, C₁₃), 129.6 (C₁₀, 12), 128.0 (C₁₁), 126.0 (C₃₃), 118.3 (C₃₅), 113.7 (C₃₆), 112.7 (C₃₈), 68.2 (C₃₂), 56.7 (C₁), 56.2 (C₃₉), 55.5 (C₄₀), 52.8 (C₃), 50.0 (C₁₅), 40.5 (C₆), 38.4 (C₇), 38.2 (C₅), 32.0 (C₂₄), 30.4 (C₂₃), 28.0 (C₂₁), 23.4 (C₂₂); **IR (cm⁻¹):** 2926 (C-H), 1682 (C=O), 1650 (C=C), 1592 (N-H). **ESI⁺ MS** *m/z*: 572 (M+H)⁺. **Anal.**: calcd for C₂₉H₄₃Cl₂N₅O₇ + 2.5 H₂O: C, 50.50, H, 7.03, N, 10.16 found C, 50.58, H, 7.26, N, 9.63

tert-butyl N-[[3-oxo-3-[(3,4,5-trimethoxyphenyl)methylamino]propyl]amino]carbamate
104

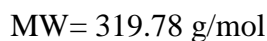
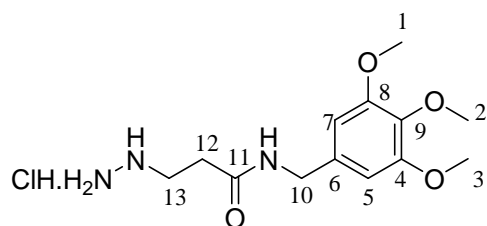


$C_{18}H_{29}N_3O_6$

MW= 383.44 g/mol

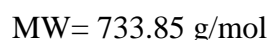
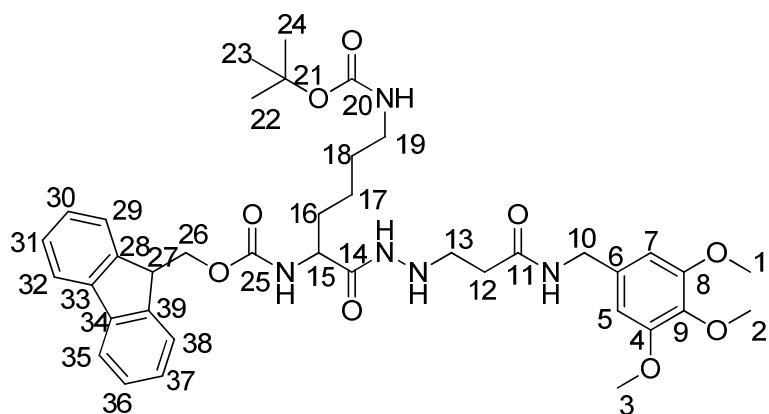
To a solution of 3-(N'-tert-Butoxycarbonyl-hydrazino)-propionic acid (1.3g, 6.38 mmol, 1 eq) in dry DMF (30mL) was successively added 3,4,5-trimethoxybenzylamine (1.5 g, 7.65 mmol, 1.2 eq), DIPEA (3.3 g, 25.5 mmol, 7 eq), HBTU (2.9 g, 7.65 mmol, 1.2 eq), and HOBT (1.0 g, 7.65 mmol, 1.2 eq). The mixture was stirred overnight at room temperature under argon atmosphere. After removal of the solvent under reduced pressure, the residue was taken up in EtOAc (20 mL) and successively washed with 10% aqueous citric acid (2 x 20 mL), water (20 mL), 10% aqueous K_2CO_3 (2 x 20 mL) and brine (20 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated under reduced pressure to give a crude product which was purified by column chromatography (EtOAc) to afford **104** (1.26 g, 3.28 mmol, 52%) as a white foam. **Rf**: 0.2 ($S_{I}O_2$, EtOAc). **1H NMR (CDCl₃, 300 MHz)** δ 7.18 (bs, 1H, NH-C₁₄), 6.51 (s, 2H, H₅, H₇), 6.45 (bs, 1H, NH-C₁₁), 6.01 (s, 1H, NH-C₁₃), 4.31 (d, 2H, J= 5.7 Hz, H₁₀), 3.81 (s, 6H, H₁, H₃), 3.80 (s, 3H, H₂), 3.06 (t, 2H, J= 6.1 Hz, H₁₃), 2.35 (t, 2H, J= 6.1 Hz, H₁₂), 1.45 (s, 9H, H₁₅, H₁₆, H₁₇); **^{13}C NMR (CDCl₃, 75 MHz)** δ 171.7 (C₁₁), 157.3 (C₁₄), 153.3 (C₄, C₈), 136.9 (C₉), 134.3 (C₆), 104.8 (C₅, C₇), 80.8 (C₁₅), 60.8 (C₂), 56.1 (C₁, C₃), 48.5 (C₁₃), 43.6 (C₁₀), 34.4 (C₁₂), 28.6 (C₁₆, C₁₇, C₁₈); **IR (cm⁻¹)**: 3303 (N-H), 2352 (C-H), 1647 (C=O), 1592 (C=C), 1507 (C=C), 1457 (C=C). **ESI⁺ MS m/z** : 406 (M+Na)⁺

3-hydrazinyl-N-(3,4,5-trimethoxybenzyl)propanamide hydrochloride **105**



A solution of **104** (1.2 g, 3.28 mmol, 1.0 eq) in HCl 4M in dioxane (25 ml) was stirred for 2 h at RT. The solvent was evaporated in vacuum to afford the hydrochloride salt of the amine **105** (1.14 g, 3.57 mmol, quantitative) as a colorless oil, which was used without further purification. $^1\text{H NMR}$ (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 8.51 (s, 3H, NH₃), 6.52 (s, 2H, H₅, H₇), 4.21 (d, 2H, J= 5.5 Hz, H₁₀), 3.79 (s, 6H, H₁, H₃), 3.61 (s, 3H, H₂), 3.15 (t, 2H, J= 6.6 Hz, H₁₃), 2.60 (t, 2H, J=6.6 Hz, H₁₂); $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ 172.0 (C₁₁), 152.7 (C₄, C₈), 137.1 (C₉), 134.7 (C₆), 104.7 (C₅, C₇), 59.9 (C₂), 55.9 (C₁, C₃), 48.6 (C₁₃), 43.8 (C₁₀), 34.2 (C₁₂).

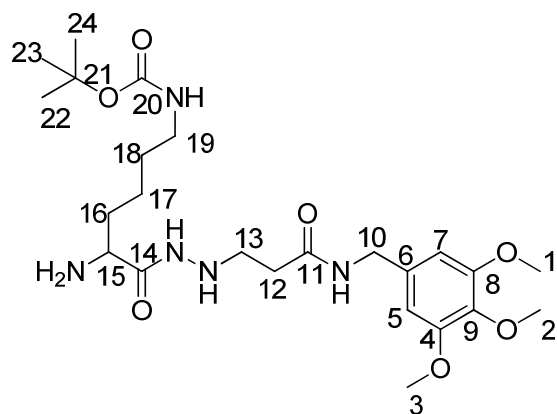
9H-fluoren-9-ylmethyl N-[(1S)-5-(tert-butoxycarbonylamino)-1-[[[3-oxo-3-[(3,4,5-trimethoxyphenyl)methylamino]propyl]amino]carbonyl]pentyl]carbamate **106**



To a solution of the hydrochloride salt of the amine **105** (1.04 g, 3.28 mmol, 1 eq) in dry DMF (25 mL) was successively added *N* α -Fmoc-*N* ϵ -*Z*-*L*-Lys (1.7 g, 3.68 mmol, 1.1 eq), collidine (2.5 g, 21.1 mmol, 7 eq), EDC (694 mg, 3.68 mmol, 1.1 eq), and HOBT (489 mg, 3.68 mmol, 1.1 eq). The mixture was stirred overnight at room temperature under argon atmosphere. After removal of the solvent under reduced pressure, the residue was taken up in EtOAc (20 mL) and successively washed with 10% aqueous citric acid (2 x 20 mL), water (20 mL), 10%

aqueous K_2CO_3 (2 x 20 mL) and brine (20 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated under reduced pressure to give a crude product that was purified by column chromatography (EtOAc) to afford **106** (672 mg, 0.92 mmol, 30%) as a white solid. **m.p.**: 140-142°C. **Rf**: 0.1 (SfO_2 , AcOEt). **1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz)** δ 7.74 (d, 2H, $J=7.6$ Hz, H_{29} , H_{38}), 7.55 (d, 2H, $J=7.5$ Hz, H_{32} , H_{35}), 7.38 (t, 2H, $J=7.3$ Hz, H_{30} , H_{37}), 7.29 (t, 2H, $J=7.4$ Hz, H_{31} , H_{36}), 7.13 (t, 1H, $J=5.3$ Hz, NH- C_{10}), 6.52 (s, 2H, H_5 , H_7), 5.58 (m, 1H, NH- C_{15}), 4.71 (m, 1H, NH- C_{20}), 4.37 (m, 2H, H_{26}), 4.35 (m, 2H, H_{10}), 4.17 (m, 1H, H_{27}), 4.06 (m, 1H, H_{15}), 3.81 (s, 6H, H_1 , H_3), 3.80 (s, 3H, H_2), 3.11 (m, 2H, H_{13}), 3.06 (m, 2H, H_{19}), 2.36 (m, 2H, H_{12}), 1.79 (m, 1H, H_{16a}), 1.66 (m, 1H, H_{16b}), 1.45 (m, 2H, H_{18}), 1.41 (s, 9H, H_{22} , H_{23} , H_{24}), 1.35 (m, 2H, H_{17}); **^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz)** δ 171.6 (C_{14}), 171.5 (C_{11}), 157.0 (C_{25}), 156.3 (C_{20}), 153.3 (C_4 , C_8), 143.6 (C_{28} , C_{39}), 141.3 (C_{33} , C_{34}), 137.1 (C_9), 134.2 (C_6), 127.8 (C_{30} , C_{37}), 127.1 (C_{31} , C_{36}), 124.9 (C_{32} , C_{35}), 120.0 (C_{29} , C_{38}), 104.9 (C_5 , C_7), 80.2 (C_{21}), 67.0 (C_{26}), 60.1 (C_2), 56.0 (C_1 , C_3), 53.6 (C_{15}), 48.1 (C_{13}), 47.1 (C_{27}), 43.7 (C_{10}), 39.7 (C_{19}), 34.7 (C_{12}), 31.6 (C_{16}), 29.5 (C_{18}), 28.4 (C_{22} , C_{23} , C_{24}), 22.4 (C_{17}); **IR (cm^{-1})**: 2926 (C-H), 1682 (C=O), 1650 (C=C), 1592 (N-H); **ESI⁺ MS m/z** : 756 ($M+23$)⁺. **Anal.**: calcd for $C_{39}H_{51}N_5O_9$ C. 62.71, H. 7.10, N. 9.38 found C. 62.86, H. 7.20, N. 9.24

tert-butyl N-[(5S)-5-amino-6-oxo-6-[2-[3-oxo-3-[(3,4,5-trimethoxyphenyl) methylamino] propyl]hydrazino]hexyl]carbamate **107**



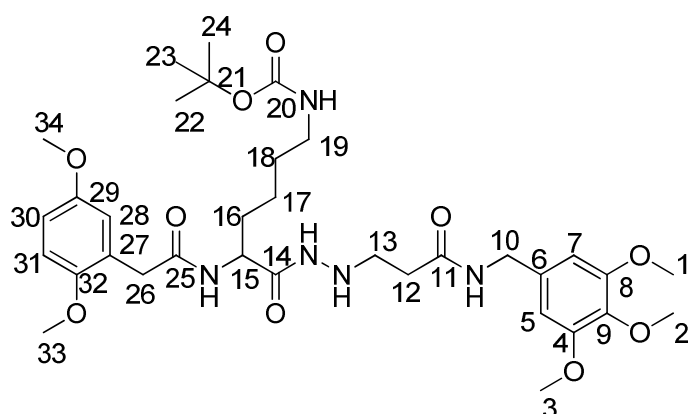
$C_{24}H_{41}N_5O_7$

MW= 511.61 g/mol

To a compound **106** (613 mg, 0.84 mmol, 1.0 eq) was added a solution of piperidine in DMF (10% v/v, 12 ml). The mixture was stirred at RT for 2 h. The solvent was evaporated under reduced pressure to afford the free amine **107** (quantitative) as uncolourless oil, which was used without further purification. **1H NMR ($DMSO-d_6$, 300 MHz)** δ 8.51 (sl, 2H, NH_2), 8.01 (m, 1H, NH- C_{14}), 6.74 (m, 1H, NH- C_{10}), 6.58 (s, 2H, H_5 , H_7), 4.98 (m, 1H, NH- C_{20}), 4.30 (d,

2H, $J = 5.8$ Hz, H_{10}), 4.05 (m, 1H, H_{15}), 3.76 (s, 6H, H_1, H_3), 3.62 (s, 3H, H_2), 3.15 (m, 2H, H_{13}), 3.07 (m, 2H, H_{19}), 2.30 (m, 2H, H_{12}), 1.62-1.28 (m, 6H, H_{16}, H_{17}, H_{18}), 1.38 (s, 9H, H_{22}, H_{23}, H_{24}); ^{13}C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ 169.7 (C_{11}), 169.5 (C_{14}), 152.7 (C_{20}), 146.2 (C_4, C_8), 135.2 (C_9), 132.1 (C_6), 104.3 (C_5, C_7), 77.2 (C_{21}), 60.0 (C_2), 55.8 (C_1, C_3), 54.3 (C_{13}), 53.6 (C_{15}), 47.8 (C_{10}), 42.1 (C_{19}), 35.0 (C_{12}), 34.2 (C_{16}), 30.7 (C_{22}, C_{23}, C_{24}), 25.7 (C_{18}), 24.1 (C_{17}); ESI MS m/z : 510 (M-H)⁻.

tert-butyl N-[(5*S*)-5-[[2-(2,5-dimethoxyphenyl)acetyl]amino]-6-oxo-6-[2-[3-oxo-3-[(3,4,5-trimethoxyphenyl)methylamino]propyl]hydrazino]hexyl] carbamate 108a



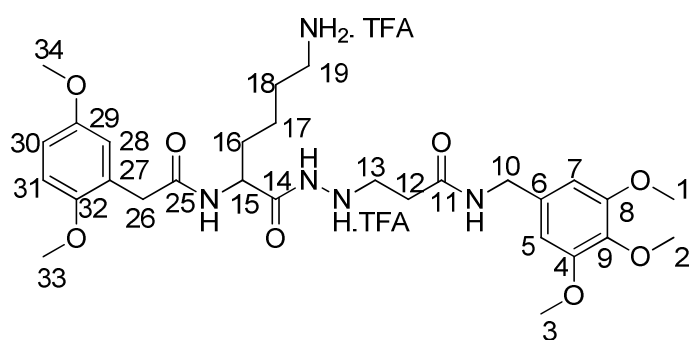
$\text{C}_{34}\text{H}_{51}\text{N}_5\text{O}_{10}$

MW = 689.80 g/mol

To a solution of the **amine 107** (305 mg, 0.42 mmol, 1.0 eq) in dry DMF (10 ml) was successively added 2,5-dimethoxyphenylacetic acid (99 mg, 0.50 mmol, 1.2 eq), DIPEA (380 mg, 2.94 mmol, 7 eq), HBTU (191 mg, 0.50 mmol, 1.2 eq), and HOBt (68 mg, 0.50 mmol, 1.2 eq) in this order. The mixture was stirred overnight at RT under argon atmosphere. After removal of the solvent under reduced pressure, the residue was dissolved in EtOAc (10 ml), washed with 10% aqueous solution of citric acid (2 x 10 ml), water (10 ml), 10% aqueous solution of K_2CO_3 (2 x 10 ml) and brine (10 ml). The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated to give crude product which was purified by column chromatography (EtOAc) to afford the compound **108a** (142 mg, 0.20 mmol, 50%) as a white solid. **m.p.**: 138-140°C; **Rf**: 0.60 (SiO_2 , EtOAc/MeOH: 8/2); ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7.23 (t, 1H, $J = 5.0$ Hz, NH- C_{14}), 7.18 (m, 1H, NH- C_{11}), 6.79 (m, 1H, H_{31}), 6.79 (m, 1H, NH- C_{20}), 6.78 (m, 1H, H_{30}), 6.77 (m, 1H, H_{28}), 6.54 (s, 2H, H_5, H_7), 6.41 (d, 1H, $J = 6.9$ Hz, NH- C_{15}), 4.96 (m, 1H, NH- C_{13}), 4.36 (m, 2H, H_{10}), 4.23 (m, 1H, H_{15}), 3.82 (s, 6H, H_1, H_3), 3.81 (s, 3H, H_2), 3.78 (s, 6H, H_{33}, H_{34}), 3.49 (s, 2H, H_{26}), 3.05 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz, H_{13}), 3.01 (m, 2H, H_{19}), 2.28 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz, H_{12}), 1.78 (m, 1H, H_{16a}), 1.55 (m, 1H, H_{16b}), 1.42 (s, 9H, H_{22}, H_{23}, H_{24}), 1.41 (m, 2H,

H₁₈), 1.25 (m, 2H, H₁₇); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 171.7 (C₁₄), 171.6 (C₂₅), 171.2 (C₁₁), 156.2 (C₂₀), 153.9 (C₂₉), 153.3 (C₄, C₈), 151.1 (C₃₂), 137.1 (C₉), 134.4 (C₆), 124.2 (C₂₇), 117.4 (C₂₈, C₃₁), 113.2 (C₃₀), 104.8 (C₅, C₇), 79.2 (C₂₁), 60.8 (C₁, C₃), 56.1 (C₃₃, C₃₄), 55.7 (C₂), 51.9 (C₁₅), 48.2 (C₁₃), 43.7 (C₁₀), 40.0 (C₁₉), 39.0 (C₂₆), 34.6 (C₁₂), 31.1 (C₁₆), 29.6 (C₁₈), 28.4 (C₂₂, C₂₃, C₂₄), 22.5 (C₁₇); IR (cm⁻¹): 2926 (C-H), 1680 (C=O), 1591 (N-H), 1459 (C-H), 1225 (C-N); ESI⁺ MS *m/z*: 712 (M+Na)⁺; Anal.: calcd for C₃₄H₅₁N₅O₁₀: C. 57.69, H. 7.56, N. 9.90 found C. 57.73, H. 7.17, N. 9.87

3-[2-[(2*S*)-6-amino-2-[[2-(2,5-dimethoxyphenyl)acetyl]amino]hexanoyl]hydrazino]-N-[(3,4,5-trimethoxyphenyl)methyl]propanamide 108b

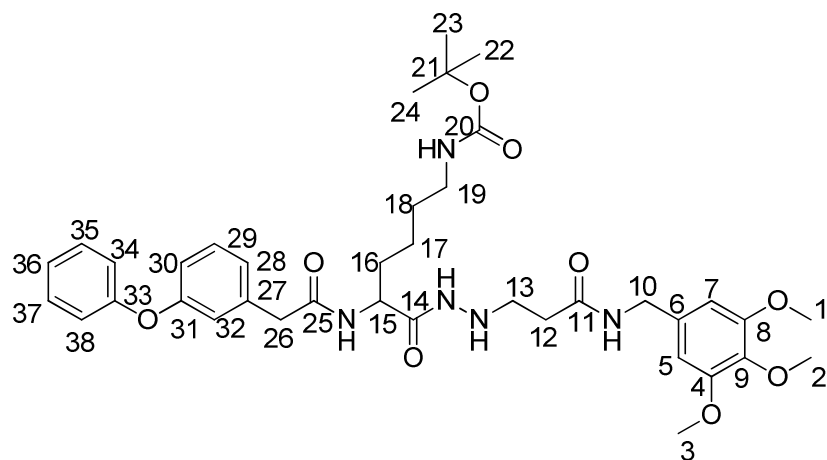


C₃₃H₄₅F₆N₅O₁₂

MW= 817.73 g/mol

A solution of **108a** (93 mg, 0.13 mmol, 1.0 eq) in DCM/TFA 3:1 (4 mL) was stirred for 2 h at room temperature. The solvent was evaporated under reduced pressure and the excess of TFA was coevaporated with methanol to afford **108b** as a white solid (81 mg, 0.13 mmol, quantitative). ¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz) δ 6.87 (d, 1H, J= 8.8 Hz, H₃₁), 6.80 (s, 1H, H₂₈), 6.79 (m, 1H, H₃₀), 6.62 (s, 2H, H₅, H₇), 4.32 (m, 1H, H₁₅), 4.31 (m, 2H, H₁₀), 3.82 (s, 6H, H₁, H₃), 3.77 (s, 3H, H₃₃), 3.73 (s, 6H, H₂, H₃₄), 3.60 (s, 2H, H₂₆), 3.44 (m, 2H, H₁₃), 2.91 (m, 2H, H₁₉), 2.68 (m, 2H, H₁₂), 1.88 (m, 1H, H_{16a}), 1.78 (m, 1H, H_{16b}), 1.68 (m, 2H, H₁₈), 1.44 (m, 2H, H₁₇); ¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ 173.2 (C₂₅), 171.2 (C₁₁), 170.9 (C₁₄), 153.7 (C₂₉), 153.2 (C₄, C₈), 151.7 (C₃₂), 136.9 (C₉), 134.4 (C₆), 124.5 (C₂₇), 117.0 (C₂₈), 112.2 (C₃₀), 111.3 (C₃₁), 104.8 (C₅, C₇), 59.7 (C₂), 55.3 (C₁, C₃), 55.2 (C₃₃), 54.7 (C₃₄), 51.9 (C₁₅), 47 (C₁₃), 43.0 (C₁₀), 39.0 (C₁₉), 36.8 (C₂₆), 30.4 (C₁₆), 30.0 (C₁₂), 26.6 (C₁₈), 22.3 (C₁₇). IR (cm⁻¹): 2926 (C-H), 1682 (C=O), 1650 (C=C), 1592 (N-H); ESI⁻ MS *m/z*: 588 (M-H)⁻; Anal.: calcd for C₃₃H₄₅F₆N₅O₁₂ + 4 H₂O: C. 44.54, H. 6.02, N. 7.87 found C. 44.17, H. 5.66, N. 7.37

tert-butyl N-[(5*S*)-6-oxo-6-[2-[3-oxo-3-[(3,4,5-trimethoxyphenyl)methylamino]propyl]hydrazino]-5-[[2-(3-phenoxyphenyl)acetyl]amino]hexyl]carbamate **109a**



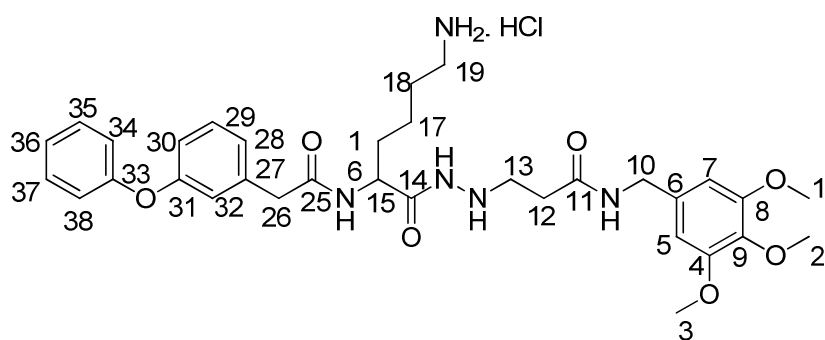
$C_{38}H_{51}N_5O_8$

MW= 721.84 g/mol

To a solution of the free amine **107** (305 mg, 0.42 mmol, 1 eq) in dry DMF (10 mL) was added successively 3-phenoxyphenylacetic acid (145 mg, 0.50 mmol, 1.2 eq), DIPEA (380 mg, 2.94 mmol, 7 eq), HBTU (191 mg, 0.50 mmol, 1.2 eq), and HOBT (68 mg, 0.50 mmol, 1.2 eq). The mixture was stirred overnight at room temperature under argon atmosphere. After removal of the solvent under reduced pressure, the residue was taken up in EtOAc (10 mL) and successively washed with 10% aqueous citric acid (2 x 10 mL), water (10 mL), 10% aqueous K_2CO_3 (2 x 10 mL) and brine (10 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated under reduced pressure to yield a crude product which was purified by column chromatography (EtOAc) to afford **109a** (157 mg, 0.21 mmol, 52%) as a white solid. **m.p.:** 142°C-144°C; **Rf:** 0.66 (SfO_2 , EtOAc/MeOH: 8/2); **1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz)** δ 8.31 (t, 1H, J= 5.5 Hz, NH-C₂₀), 8.21 (d, 1H, J= 8.0 Hz, NH-C₁₄), 7.31 (t, 1H, J= 8.2 Hz, H₃₅), 7.25 (m, 1H, H₃₇), 7.17 (t, 1H, J= 5.6 Hz, NH-C₁₀), 7.10 (t, 1H, J= 7.0 Hz, H₂₉), 6.95 (t, 1H, J= 9.0 Hz, H₃₆), 6.93 (m, 1H, H₃₀), 6.90 (m, 2H, H₃₂, H₃₈), 6.87 (m, 2H, H₂₈, H₃₄), 6.52 (s, 2H, H₅, H₇), 6.44 (m, 1H, NH-C₁₅), 4.74 (m, 1H, NH-C₁₃), 4.34 (m, 2H, H₁₀), 4.28 (m, 1H, H₁₅), 3.80 (s, 9H, H₁, H₂, H₃), 3.46 (s, 2H, H₂₆), 3.07 (m, 2H, H₁₃), 3.02 (m, 2H, H₁₉), 2.32 (m, 2H, H₁₂), 1.75 (m, 1H, H_{16a}), 1.58 (m, 1H, H_{16b}), 1.42 (m, 2H, H₁₈), 1.41 (s, 9H, H₂₂, H₂₃, H₂₄), 1.25 (m, 2H, H₁₇); **^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz)** δ 171.6 (C₁₁), 171.1 (C₂₅), 171.0 (C₁₄), 157.7 (C₂₀), 156.8 (C₃₃), 156.3 (C₃₁), 153.3 (C₈), 153.2 (C₄), 137.1 (C₉), 136.4 (C₂₇), 134.3 (C₆), 130.2 (C₃₇), 129.8 (C₃₅), 123.9 (C₃₀, C₃₆), 123.5 (C₂₉), 119.5 (C₃₂, C₃₈), 117.5 (C₃₄, C₂₈), 104.8 (C₅, C₇), 79.2 (C₂₁), 60.8 (C₂), 56.1 (C₁, C₃), 51.8 (C₁₅), 48.0 (C₁₃), 43.6 (C₁₀), 43.1 (C₂₆), 36.9 (C₁₉), 34.5 (C₁₂), 31.2 (C₁₆), 29.5 (C₁₈), 28.4 (C₂₂, C₂₃, C₂₄), 22.5 (C₁₇); **IR (cm^{-1}):**

3585 (NH-CO), 2931 (C-H), 2048 (C-H_{arm}), 1638 (C=O), 1586 (N-H); **ESI⁺ MS** *m/z*: 744 (M+23)⁺; **Anal.** calcd for C₃₈H₅₁N₅O₉ C. 61.68, H. 7.24, N. 9.47 found C. 61.46.

3-[2-[(2*S*)-6-amino-2-[[2-(3-phenoxyphenyl)acetyl]amino]hexanoyl]hydrazino]-N-[(3,4,5-trimethoxyphenyl)methyl]propanamide 109b

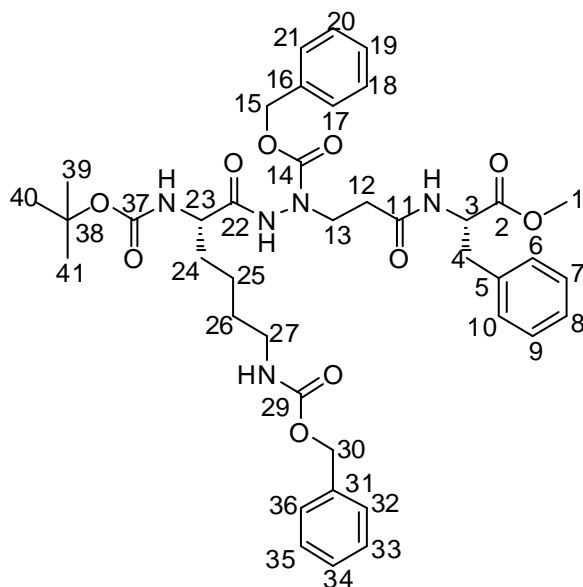


C₃₃H₄₄ClN₅O₇

MW= 658.18 g/mol

A solution of **109a** (103 mg, 0.14 mmol, 1 eq) in HCl 4M in dioxane (10 mL) was stirred for 2 h at room temperature. The solvent was evaporated under reduced pressure to afford the hydrochloride salt **109b** (100 mg, 0.15 mmol, quantitative) as a colorless oil. **NMR (CD₃OD, 400 MHz)** δ 7.39 (bs, 1H, NH-C₂₅), 7.30 (m, 2H, H₂₈, H₃₅), 7.22 (t, 1H, J= 8.1 Hz, H₃₇), 7.08 (t, 1H, J= 7.2 Hz, H₃₆), 6.95 (m, 3H, H₂₉, H₃₄, H₃₈), 6.89 (m, 2H, H₃₀, H₃₂), 6.50 (s, 2H, H₅, H₇), 4.31 (m, 1H, H₁₅), 4.30 (d, 1H, J= 5.0 Hz, H₁₀), 3.79 (s, 6H, H₁, H₃), 3.78 (s, 3H, H₂), 3.47 (s, 2H, H₂₆), 3.05 (t, 2H, J=5.5 Hz, H₁₃), 2.61 (t, 2H, J= 6.3 Hz, H₁₉), 2.31 (t, 2H, J= 5.5 Hz, H₁₂), 1.67 (m, 1H, H_{16a}), 1.56 (m, 1H, H_{16b}), 1.39 (m, 2H, H₁₈), 1.26 (m, 2H, H₁₇); **¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz)** δ 171.7 (C₁₁), 171.1 (C₂₅), 171.0 (C₁₄), 157.6 (C₃₁), 156.8 (C₃₃), 153.2 (C₄, C₈), 137.0 (C₆), 136.6 (C₂₇), 134.2 (C₉), 130.1 (C₃₇), 129.9 (C₃₈), 129.8 (C₃₅, C₂₈), 123.9 (C₃₄), 123.5 (C₃₆), 119.6 ; 118.9 ; 117.3 (C₃₀, C₃₂, C₂₉), 104.8 (C₅, C₇), 60.8 (C₂), 56.0 (C₁, C₃), 51.9 (C₁₅), 48.0 (C₁₃), 43.6 (C₁₀), 43.0 (C₂₆), 41.0 (C₁₉), 34.5 (C₁₂), 31.7 (C₁₆), 31.5 (C₁₈), 22.4 (C₁₇); **IR (cm⁻¹):** 2926 (C-H), 1682 (C=O), 1650 (C=C), 1592 (N-H); **ESI⁺ MS** *m/z*: 622 (M+H)⁺; **Anal.** calcd for C₃₃H₄₃N₅O₇ + 0.75 H₂O: C. 62.39, H. 7.08, N. 11.03 found C. 62.69, H. 7.29, N. 10.75

Methyl (2S)-2-[3-[benzyloxycarbonyl-[(2S)-6-(benzyloxycarbonylamino)-2-(tert-butoxycarbonylamino)hexanoyl]amino]amino]propanoylamino]-3-phenyl-propanoate
115



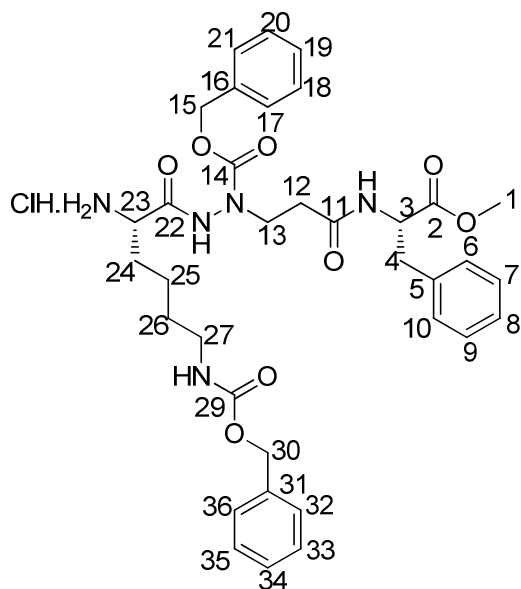
C₄₀H₅₁N₅O₁₀

MW= 761.86 g/mol

To a solution of **99** (650 mg, 1.04 mmol) in dry pyridine (20 mL) was added benzyl chloroformate (355mg, 2.08 mmol, 2 eq) and the mixture was stirred during 3 h at 30°C. After removal of Pyridine under reduced pressure, the residue was dissolved in CH₂Cl₂ and washed successively with 10% aqueous K₂CO₃ (2 x 15 mL), brine (20 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated under vacuo to afford a crude product which was purified by column chromatography (EtOAc/Cyclohexan: 6/4) to afford **115** as colorless oil (583 mg, 76.5 mmol, 74%). **Rf: 0.6** (S₁O₂, EtOAc); **¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz)** δ 9.05 (sl, 1H, NH-C₂₂), 7.76 (sl, 1H, NH-C₃), 7.37-7.22 (m, 15H, H₆, H₇, H₈, H₉, H₁₀, H₁₇, H₁₈, H₁₉, H₂₀, H₂₁, H₃₂, H₃₃, H₃₄, H₃₅, H₃₆), 5.13 (m, 1H, NH-C₂₃), 5.07 (s, 4H, H₁₅, H₃₀), 4.80 (m, 1H, H₃), 4.04 (m, 1H, H₂₃), 3.77 (m, 2H, H₁₃), 3.72 (s, 3H, H₁), 3.19 (m, 1H, H_{4a}), 2.95 (dd, 1H, J= 10.0 and 14.3 Hz, H_{4b}), 2.94 (m, 2H, H₂₇), 2.33 (m, 2H, H₁₂), 1.82 (m, 1H, H_{24a}), 1.68 (m, 1H, H_{24b}), 1.60 (m, 2H, H₂₅), 1.44 (s, 9H, H₃₉, H₄₀, H₄₁), 1.33 (m, 2H, H₂₆); **¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz)** δ 174.7 (C₂), 171.7 (C₂₂, C₁₁), 156.2 (C₁₄, C₂₉), 156.0 (C₃₇), 136.6 (C₁₆, C₃₁), 136.3 (C₅), 128.9, 128.5, 128.4, 128.0, 127.9, 126.9 (C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C₂₁, C₃₂, C₃₃, C₃₄, C₃₅, C₃₆), 80.6 (C₃₈), 66.6, 66.5 (C₁₅, C₃₀), 53.8 (C₃), 52.8 (C₂₃), 52.7 (C₁), 45.4 (C₁₃), 40.4 (C₂₇), 37.0 (C₄), 32.7 (C₁₂), 31.2 (C₂₄), 28.9 (C₂₆), 28.3 (C₃₉, C₄₀, C₄₁), 22.2 (C₂₅). **IR (cm⁻¹):** 3322 (N-H), 2952 (C-H), 1689 (C=O), 1525 (N-H), 1454 (C-H), 1225 (C-N); **ESI⁺ MS m/z:**

784 (M+23)⁺; **Anal.**: calacd for [C₄₀H₅₁N₅O₁₀ + 0.25 H₂O] C. 63.23, H. 7.30, N. 8.92 found C. 62.90, H. 7.34, N. 8.88

Methyl (2S)-2-[3-[[[(2S)-2-amino-6-(benzyloxycarbonylamino)hexanoyl]amino]-benzyloxycarbonyl-amino]propanoylamino]-3-phenyl-propanoate hydrochloride 116

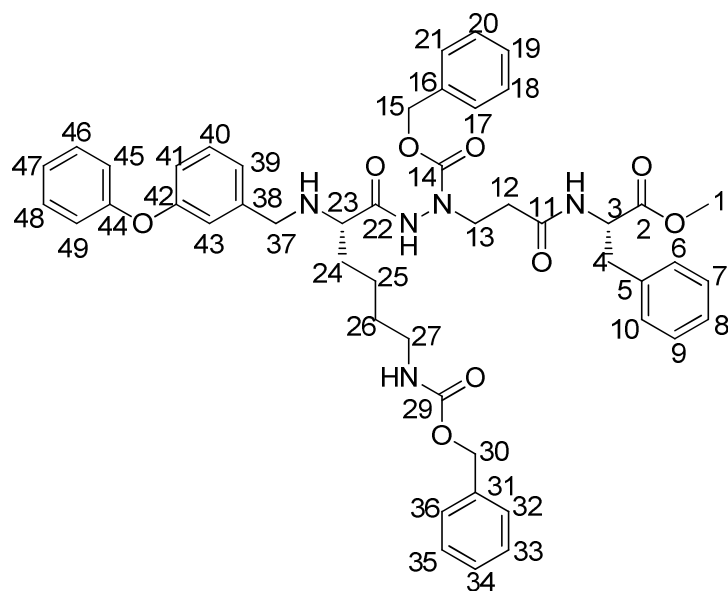


C₃₅H₄₄ClN₅O₈

MW= 698.21 g/mol

A solution of **115** (523 mg, 0.69 mmol, 1 eq) in HCl 4M in dioxane (15 ml) was stirred for 2 h at room temperature. The solvent was evaporated under vacuum to afford the free amine **116** as an hydrochloride salt in quantitative yield as a white solid, which was used without further purification. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 10.80 (s, 1H, NH-C₂₂), 8.55 (d, 1H, J= 7.8 Hz, NH-C₁₁), 8.35 (bs, 3H, NH₃), 7.30-7.25 (m, 15H, H₆, H₇, H₈, H₉, H₁₀, H₁₇, H₁₈, H₁₉, H₂₀, H₂₁, H₃₂, H₃₃, H₃₄, H₃₅, H₃₆), 5.01 (s, 4H, H₁₅, H₃₀), 4.80 (m, 1H, H₃), 4.45 (d, 1H, NH-C₂₉), 4.04 (m, 1H, H₂₃), 3.55 (s, 3H, H₁), 3.02 (m, 6H, H₄, H₂₇, H₁₃), 2.41 (m, 2H, H₁₂), 1.8-1.2 (m, 6H, H₂₄, H₂₅, H₂₆). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ 177.2 (C₂), 175.1 (C₂₂), 173.4 (C₁₁), 161.3(C₁₄), 159.9 (C₂₉), 142.4 (C₁₆, C₄₁), 141.4 (C₅), 134.3; 133.6; 133.4; 133.2; 133.0; 132.8; 131.8 (C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C₂₁, C₃₂, C₃₃, C₃₄, C₃₅, C₃₆), 72.3; 71.6 (C₁₅, C₃₀), 58.8 (C₃), 57.0 (C₁), 56.1 (C₂₃), 44.8 (C₁₃), 44.7 (C₄), 43.9 (C₂₇), 41.9 (C₁₂), 35.7 (C₂₄), 34.0 (C₂₆), 26.5 (C₂₅).

Methyl (2*S*)-2-[3-[benzyloxycarbonyl-[(2*S*)-6-(benzyloxycarbonylamino)-2-[(3-phenoxyphenyl)methylamino]hexanoyl]amino]amino]propanoylamino]-3-phenylpropanoate **117a**



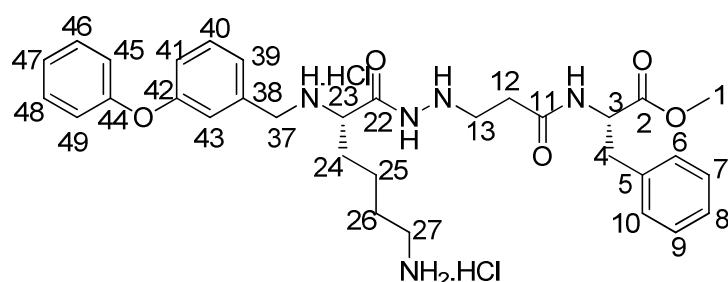
C₄₈H₅₃N₅O₉

MW = 843.96 g/mol

To a solution of **116** (297 mg, 0.39 mmol, 1 eq) in methanol (7 mL) was added DIPEA (100 mg, 0.78 mmol, 2 eq) and a solution of 3-phenoxybenzaldehyde (78 mg, 0.39 mmol, 1 eq) in methanol (3 mL). After stirring for 5 min at room temperature, NaBH₃CN (25 mg, 0.39 mmol, 1 eq) was added and the solution was brought at pH= 5 by addition of acetic. The mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction was quenched by addition of 2N solution of HCl. After stirring for 10 min at room temperature, the mixture was brought at pH= 10 by addition of saturated Na₂CO₃. The methanol was then evaporated under vacuo (without distilling water) and the aqueous mixture was extracted with AcOEt (2 x 15 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated to give a crude product which was purified by column chromatography (AcOEt) to afford **117a** (190 mg, 0.23 mmol, 58%) as a colorless oil. **Rf** = 0.6 (SiO₂, EtOAc); ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.90 (bs, 1H, NH-C₂₂), 7.32 (m, 2H, H₄₆, H₄₈), 7.26 (m, 10H, H₃₂, H₃₃, H₃₄, H₃₅, H₃₆, H₁₇, H₁₈, H₁₉, H₂₀, H₂₁), 7.23 (m, 1H, H₄₀), 7.11 (m, 1H, H₄₇), 7.09 (m, 5H, H₆, H₇, H₈, H₉, H₁₀), 7.08 (m, 2H, H₃₉, H₄₃), 6.98 (m, 2H, H₄₅, H₄₉), 6.87 (m, 1H, H₄₁), 6.42 (bs, 1H, NH-C₁₁), 5.08 (s, 4H, H₁₅, H₃₀), 4.80 (m, 1H, H₃), 3.86 (m, 2H, H₁₃), 3.63 (s, 3H, H₁), 3.42 (s, 2H, H₃₇), 3.14 (m, 1H, H₂₃), 3.13 (m, 2H, H₂₇), 3.07 (m, 1H, H_{4a}), 2.97 (m, 1H, H_{4b}), 2.39 (m, 2H, H₁₂), 1.66 (m, 1H, H_{24a}), 1.57 (m, 1H, H_{24b}), 1.37 (m, 2H, H₂₆), 1.30 (m, 2H, H₂₅); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 172.3 (C₂), 172.0 (C₂₂), 171.8 (C₁₁), 157.4 (C₄₂), 157.1 (C₄₄), 156.3 (C₁₄, C₂₉), 141.6 (C₃₈),

136.7 (C₁₆, C₃₂), 135.8 (C₅), 129.7; 129.1; 128.6; 128.5, 128.2; 128.0; 127.1 (C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C₂₁, C₃₂, C₃₃, C₃₄, C₃₅, C₃₆, C₄₀, C₄₆, C₄₇, C₄₈), 123.3 (C₃₉, C₄₃), 118.8 (C₄₅, C₄₉), 117.5 (C₄₁), 68.2 (C₃₀), 66.5 (C₁₅), 60.9 (C₂₃), 53.3 (C₃), 52.3 (C₁), 51.9 (C₃₇), 47.7 (C₁₃), 40.6 (C₂₇), 37.7 (C₄), 35.2 (C₁₂), 32.9 (C₂₄), 29.5 (C₂₆), 22.7 (C₂₅); **IR** (cm⁻¹): 3295 (N-H), 2949 (C-H), 1707 (C=O), 1498 (C=C), 1453 (C-H); **ESI⁺ MS** *m/z*: 867 [M+Na]⁺; **Anal.** Calcd for C₄₈H₅₃N₅O₉ + 1.5 H₂O: C, 66.19; H, 6.49; N, 8.04; found C, 66.20; H, 6.44; N, 7.44.

Methyl (2S)-2-[3-[2-[(2S)-6-amino-2-[(3-phenoxyphenyl)methylamino]hexanoyl]hydrazino]propanoylamino]-3-phenyl-propanoate dihydrochloride **117b**

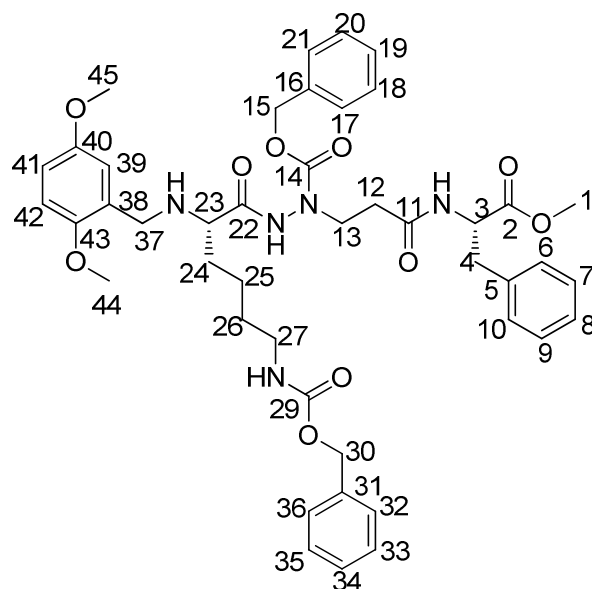


C₃₂H₄₃Cl₂N₅O₅

MW= 648.62 g/mol

To a solution of **117a** (150 mg, 0.18 mmol, 1.0 eq) in dry MeOH (25 ml) was added palladium on activated charcoal 10% (15 mg, 10% m/m). The mixture was stirred overnight under hydrogen atmosphere at RT. The catalyst was filtrated on a celite pad. After removal of the solvent under reduced pressure, HCl/MeOH was added and precipitation with Et₂O afforded the hydrochloride salt **117b** as a colorless solid (100 mg, 16,33 mmol, 91%); **¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz)** δ 7.31-7.03 (m, 8H, H₆, H₇, H₈, H₉, H₁₀, H₄₀, H₄₆, H₄₈), 6.98 (t, J = 7.4 Hz, 2H, H₄₅, H₄₉), 6.93-6.81 (m, 3H, H₃₉, H₄₃, H₄₇), 6.75 (dd, J = 8.1 and 1.6 Hz, 1H, H₄₁), 4.57 (dd, J= 8.8 and 5.7 Hz, 1H, H₃), 3.65 (s, 3H, H₁), 3.38 (m, 2H, H₃₇), 3.12 (dd, 8.7 and 4.3 Hz, 1H, H₂₃), 3.00-2.79 (m, 4H, H₄, H₂₇), 2.56 (t, J= 7.1 Hz, 2H, H₁₃), 2.22 (t, J= 7.1 Hz, 2H, H₁₂), 1.56 (m, 1H, H_{24a}), 1.49 (m, 1H, H_{24b}), 1.33 (m, 2H, H₂₆), 1.26 (m, 2H, H₂₅); **¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz)** δ 172.1 (C₂), 171.8 (C₂₂), 171.5 (C₁₁), 155.0 (C₄₂), 153.1 (C₄₄), 140.9 (C₃₈), 138.0 (C₅), 131.8; 131.0; 129.5; 127.9, 128.2 (C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₄₀, C₄₆, C₄₇, C₄₈), 124.9 (C₃₉, C₄₃), 120.7 (C₄₅, C₄₉), 120.3 (C₄₁), 61.2 (C₂₃), 56.6 (C₃), 56.2 (C₁), 52.8 (C₃₇), 48.5 (C₁₃), 40.6 (C₂₇), 38.3 (C₄), 36.2 (C₁₂), 33.7 (C₂₄), 28.3(C₂₆), 22.3 (C₂₅); **IR** (cm⁻¹): 3295 (N-H), 2949 (C-H), 1707 (C=O), 1498 (C=C), 1453 (C-H); **Anal.** Calcd for C₃₂H₄₃Cl₂N₅O₅ + 3 H₂O: C, 54.77; H, 7.05; N, 9.98; found C, 54.34; H, 6.81; N, 10.09.

Methyl (2S)-2-[3-[benzyloxycarbonyl-[(2S)-6-(benzyloxycarbonylamino)-2-[(2,5-dimethoxyphenyl)methylamino]hexanoyl]amino]amino]propanoylamino]-3-phenylpropanoate **118a**



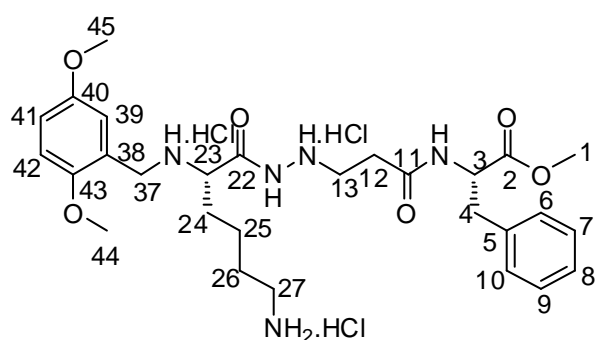
$C_{44}H_{53}N_5O_{10}$

MW= 811.92 g/mol

To a solution of the **116** (200 mg, 0.30 mmol, 1 eq) in methanol (7 mL) was added DIPEA (0.19 mL, 1.12 mmol, 2 eq) and a solution of 2,5-dimethoxybenzaldehyde (47 mg, 0.30 mmol, 1 eq) in methanol (3 mL). After stirring for 5 min at room temperature, $NaBH_3CN$ (19 mg, 0.30 mmol, 1 eq) was added and the solution was brought at pH= 5 by addition of acetic. The mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction was quenched by addition of 2N solution of HCl. After stirring for 10 min at room temperature, the mixture was brought at pH= 10 by addition of saturated Na_2CO_3 . The methanol was then evaporated under vacuo (without distilling water) and the aqueous mixture was extracted with AcOEt (2 x 20 mL). The organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated to give a crude product which was purified by column chromatography (AcOEt) to afford **118a** (165 mg, 0.20 mmol, 68%) as a colorless oil. **Rf** = **0.3** (S_iO_2 , EtOAc); 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 9.26 (s, 1H, NH- C_{22}), 7.32-7.21 (m, 15H, $H_6, H_7, H_8, H_9, H_{10}, H_{17}, H_{18}, H_{19}, H_{20}, H_{21}, H_{32}, H_{33}, H_{34}, H_{35}, H_{36}$), 7.12 (d, J = 7.3 Hz, 1H, NH- C_{11}), 6.80 (m, 1H, H_{41}), 6.76 (d, J = 1.9 Hz, 1H, H_{39}), 6.68 (m, 1H, H_{42}), 5.13 (m, 1H, NH- C_{23}), 5.05 (s, 4H, H_{15}, H_{30}), 4.80 (m, 1H, H_3), 4.66 (s, 2H, H_{37}), 3.82 (m, 2H, H_{13}), 3.76 (s, 3H, H_{45}), 3.74 (s, 3H, H_{44}), 3.64 (s, 3H, H_1), 3.17 (m, 1H, H_{23}), 3.08 (m, 2H, H_{27}), 3.06 (m, 2H, H_4), 2.46 (m, 2H, H_{12}), 1.68 (m, 1H, H_{24a}), 1.54 (m, 1H, H_{24b}), 1.45 (m, 2H, H_{26}), 1.26 (m, 2H, H_{25}); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 172.2 (C_2), 170.6 (C_{11}, C_{22}), 156.5 (C_{29}), 155.3 (C_{14}), 153.5 (C_{40}), 151.8 (C_{43}), 136.7 (C_{16}, C_{31}), 136.1 (C_5),

135.8 (C₃₈), 129.1; 128.5; 128.4; 128.2; 128.1; 127.0 (C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C₂₁, C₃₂, C₃₃, C₃₄, C₃₅, C₃₆), 116.9 (C₄₂), 113.0 (C₄₁), 111.3 (C₃₉), 68.2 (C₃₀), 66.5 (C₁₅), 62.1 (C₃₇), 60.9 (C₂₃), 55.8 (C₄₅), 55.7 (C₄₄), 53.5 (C₃), 52.2 (C₁), 47.3 (C₁₃), 37.9 (C₄, C₂₇), 34.8 (C₁₂), 32.8 (C₂₄), 29.4 (C₂₆), 22.6 (C₂₅); **IR** (cm⁻¹): 3295 (N-H), 2949 (C-H), 1707 (C=O), 1498 (C=C), 1453 (C-H); **ESI⁺ MS** *m/z*: 834 [M+Na]⁺; **Anal.** Calcd for C₄₄H₅₃N₅O₁₀ + 0.3 H₂O: C, 64.65; H, 6.62; N, 8.57; found C, 64.66; H, 6.90; N, 7.82.

Methyl (2S)-2-[3-[2-[(2S)-6-amino-2-[(2,5-dimethoxyphenyl)methylamino]hexanoyl]hydrazino]propanoylamino]-3-phenyl-propanoate 118b

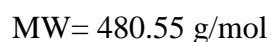
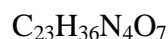
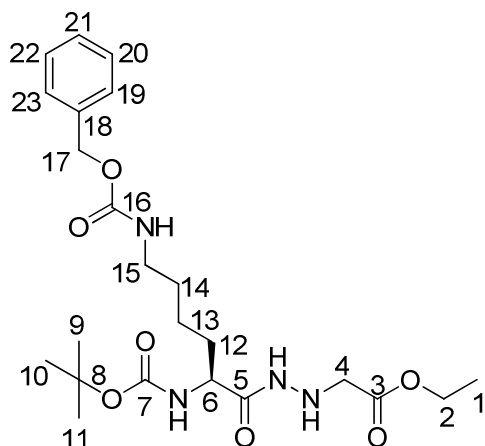


C₂₈H₄₄Cl₃N₅O₆

MW = 653.04 g/mol

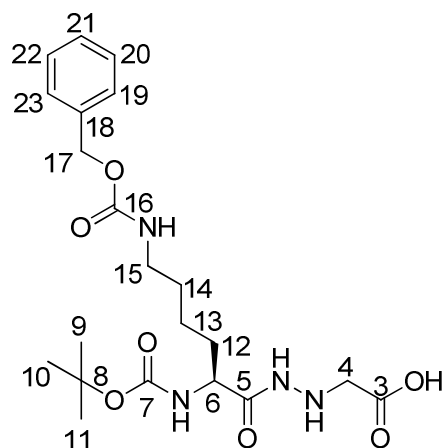
To a solution of **118a** (181 mg, 0.22 mmol, 1 eq) in dry MeOH (25 mL) was added 10% Pd/C (18 mg). The mixture was stirred overnight under hydrogen atmosphere at room temperature and filtered on a celite pad. After removal of the solvent under reduced pressure **118b** was obtained as a white solid (101 mg, 0.19 mmol, 86%). **¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz)** δ 9.37 (s, 1H, NH-C₂₂), 8.68 (d, J = 7.7 Hz, 1H, NH-C₁₁), 8.11 (s, 2H, NH₂), 7.27 (m, 2H, H₇, H₉), 7.24 (m, 1H, H₃₉), 7.23 (m, 2H, H₆, H₁₀), 7.21 (m, 1H, H₈), 6.98 (m, 1H, H₄₁), 6.95 (m, 1H, H₄₂), 4.46 (m, 1H, H₃), 4.04 (s, 2H, H₃₇), 3.80 (m, 1H, H₂₃), 3.75 (s, 3H, H₄₅), 3.72 (s, 3H, H₄₄), 3.59 (s, 3H, H₁), 3.07 (m, 2H, H₁₃), 3.02 (dd, J = 12.5 and 6.9 Hz, 1H, H_{4a}), 2.91 (dd, J = 13.9 and 9.1 Hz, 1H, H_{4b}), 2.74 (m, 2H, H₂₇), 2.49 (m, 2H, H₁₂), 1.96 (m, 1H, H_{24a}), 1.86 (m, 1H, H_{24b}), 1.59 (m, 2H, H₂₆), 1.36 (m, 2H, H₂₅); **¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz)** δ 172.0 (C₂), 169.8 (C₁₁), 165.9 (C₂₂), 152.8 (C₄₀), 151.6 (C₄₃), 137.2 (C₅), 129.1 (C₃₂, C₃₆), 128.2 (C₃₃, C₃₅), 126.5 (C₃₄), 119.7 (C₃₈), 117.5 (C₃₉), 115.5 (C₄₁), 112.1 (C₄₂), 57.2 (C₂₃), 56.0 (C₄₄), 55.6 (C₄₅), 53.7 (C₃), 51.8 (C₁), 46.4 (C₁₃), 43.3 (C₃₇), 38.2 (C₂₇), 36.7 (C₄), 31.5 (C₁₂), 28.8 (C₂₄), 26.3 (C₂₆), 21.1 (C₂₅); **IR** (cm⁻¹): 3295 (N-H), 2949 (C-H), 1707 (C=O), 1498 (C=C), 1453 (C-H); **Anal.** Calcd for C₂₈H₄₄Cl₃N₅O₆ + 1.5 H₂O: C, 49.45; H, 6.98; N, 10.30; found C, 49.69; H, 6.78; N, 10.16.

Ethyl 2-[2-[6-(benzyloxycarbonylamino)-2-(tert-butoxycarbonylamino)hexanoyl]hydrazino] acetate **120**



To a solution of ethyl 2-hydrazinylacetate hydrochloride **119** (1.0 g, 6.47 mmol, 1 eq) in dry DMF (20mL) was successively added N_α -Boc- N_ϵ -Z-Lys (2.95 g, 7.76 mmol, 1.2 eq), DIPEA (5.8 g, 4.3 mmol, 7 eq), HBTU (2.95 g, 7.76 mmol, 1.2 eq), and HOBT (1.04 g, 7.76 mmol, 1.2 eq). The mixture was stirred overnight at room temperature under argon atmosphere. After removal of the solvent under reduced pressure, the residue was taken up in EtOAc (20 mL) and washed successively with 10% aqueous citric acid (2 x 15 mL), water (15 mL), 10% aqueous K_2CO_3 (2 x 15 mL) and brine (20 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product obtained was purified by column chromatography (EtOAc/cyclohexane, 8:2) to give **120** (2.35 g, 4.9 mmol, 76%) as a white foam. **Rf**: 0.5 (S_1O_2 , EtOAc). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 8.30 (m, 1H, NH- C_6), 8.16 (s, 1H, NH- C_{16}), 7.27 (m, 5H, H_{19} , H_{20} , H_{21} , H_{22} , H_{23}), 5.25 (m, 1H, NH- C_4), 5.01 (s, 2H, H_{17}), 4.12 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz, H_2), 3.90 (m, 1H, H_6), 3.56 (s, 2H, H_4), 3.10 (m, 2H, H_{15}), 1.47 (m, 6H, H_{12} , H_{13} , H_{14}), 1.34 (s, 9H, H_9 , H_{10} , H_{11}), 1.18 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, H_1); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ 172.2 (C_3), 171.5 (C_5), 156.7 (C_7), 155.8 (C_{16}), 136.6 (C_{18}), 128.5; 128.0 (C_{19} , C_{20} , C_{21} , C_{22} , C_{23}), 80.3 (C_8), 66.6 (C_{17}), 61.3 (C_2), 53.2 (C_{15}), 52.8 (C_6), 40.3 (C_4), 31.4 (C_{12}), 29.3 (C_{14}), 28.2 (C_9 , C_{10} , C_{11}), 22.3 (C_{13}), 15.26 (C_1); **IR** (cm^{-1}): 3290 (N-H), 1684 (C=O), 1519 (C=C), 1367 (C-H), 1245 (C-N). **ESI⁺ MS** m/z : 503 ($\text{M} + \text{Na}$)⁺

2-[2-[(2S)-6-(benzyloxycarbonylamino)-2-(tert-butoxycarbonylamino)hexanoyl]hydrazino]acetic acid **121**

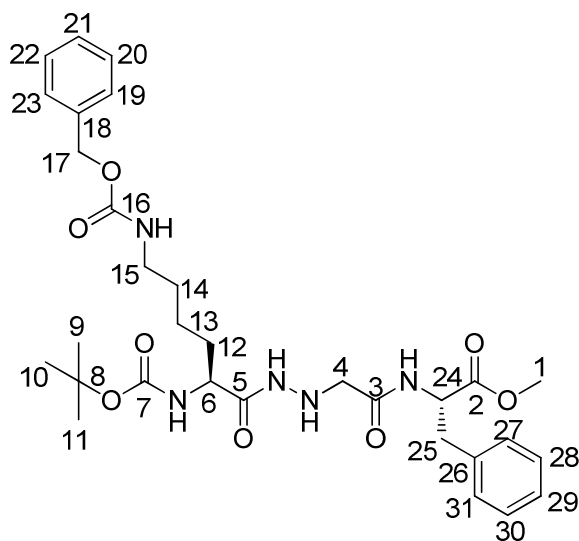


$C_{21}H_{32}N_4O_7$

MW= 452.5 g/mol

To solution of **120** (2.00 g, 4.16 mmol, 1.0 eq) in THF/MeOH (15 ml/15 ml) was added a 2N solution of NaOH (4 ml). The reaction was stirred at RT over 3 hrs. The solvent was removed under vacuum (without distilling the water) and the remaining solution was brought at pH=5 by addition of 10% aqueous solution of citric acid. The aqueous phase was extracted with EtOAc (2 x 30 ml). The combined organic layers were dried with $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum to obtain **acid 121** (1.65 g, 3.60 mmol, 88%) as white foam which was used in the next step without further purification. 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 8.81 (s, 1H, OH), 8.10 (m, 1H, NH- C_6), 7.90 (s, 1H, NH- C_{16}), 7.34 (m, 5H, H_{19} , H_{20} , H_{21} , H_{22} , H_{23}), 5.61 (m, 1H, NH- C_4), 5.10 (s, 2H, H_{17}), 4.25 (m, 1H, H_6), 3.40 (s, 2H, H_4), 3.15 (m, 2H, H_{15}), 1.65-1.28 (m, 6H, H_{12} , H_{13} , H_{14}), 1.41 (s, 9H, H_9 , H_{10} , H_{11}). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 173.8 (C_3), 172.1 (C_5), 156.8 (C_7), 156.0 (C_{16}), 136.5 (C_{18}), 128.5; 128.0 (C_{19} , C_{20} , C_{21} , C_{22} , C_{23}), 80.5 (C_8), 66.7 (C_{17}), 53.2 (C_{15}), 52.8 (C_6), 40.50 (C_4), 32.0 (C_{12}), 29.3 (C_{14}), 28.3 (C_9 , C_{10} , C_{11}), 22.5 (C_{13}); IR (cm^{-1}): 2951 (C-H), 1694 (C=O), 1519 (C=C), 1367 (C-N), 1246 (OH); APCI MS m/z : 451(M-H) $^-$

Methyl (2S)-2-[[2-[2-[(2S)-6-(benzyloxycarbonylamino)-2-(tert-butoxycarbonylamino)hexanoyl]hydrazino]acetyl]amino]-3-phenyl-propanoate **122**

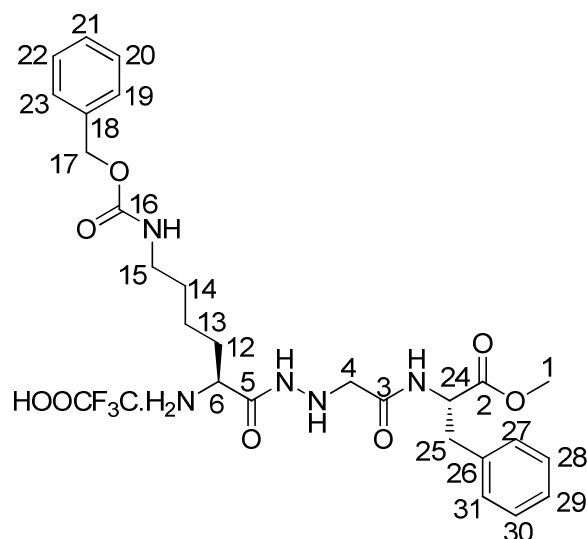


$C_{31}H_{43}N_5O_8$

MW= 613.7 g/mol

To a solution of the carboxylic acid **121** (1.20 g, 2.64 mmol, 1 eq) in dry DMF (20mL) was added successively H-Phe-OMe (690 mg, 3.16 mmol, 1.2 eq), DIPEA (1.36 g, 10.56 mmol, 4 eq), HBTU (1.20 g, 3.16 mmol, 1.2 eq), and HOBT (430 mg, 3.16 mmol, 1.2 eq). The mixture was stirred overnight at room temperature under argon atmosphere. After removal of the solvent under reduced pressure, the residue was taken up in EtOAc (20 mL) and washed with 10% aqueous citric acid (2 x 15 mL), water (15 mL), 10% aqueous K_2CO_3 (2 x 15 mL) and brine (20 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated under reduced pressure to give a crude product which was purified by column chromatography (EtOAc) to afford **122** (907 mg, 1.48 mmol, 76%) as a white foam. **Rf**: 0.2 ($S_{T}O_2$, AcOEt). **1H NMR (CDCl₃, 300 MHz)** δ 8.08 (m, 1H, NH-C₂₄), 7.37-7.15 (m, 10H, H₁₉, H₂₀, H₂₁, H₂₂, H₂₃ and H₂₇, H₂₈, H₂₉, H₃₀, H₃₁), 7.05 (d, 1H, J= 5.6 Hz, NH-C₆), 6.99 (d, 1H, J= 5.5 Hz, NH-C₁₆), 5.08 (s, 2H, H₁₇), 4.79 (m, 1H, H₂₄), 3.90 (m, 1H, H₆), 3.65 (s, 3H, H₁), 3.38 (s, 2H, H₄), 3.03 (m, 4H, H₁₅, H₂₅), 1.47 (m, 6H, H₁₂, H₁₃, H₁₄), 1.34 (s, 9H, H₉, H₁₀, H₁₁); **^{13}C NMR (CDCl₃, 75 MHz)** δ 172.4 (C₂), 172.2 (C₃), 171.5 (C₅), 156.7 (C₇), 155.8 (C₁₆), 136.6 (C₁₈), 135.9 (C₂₆), 129.1 ; 128.7 (C₂₇, C₂₈, C₂₉, C₃₀, C₃₁), 128.0; 128.5 (C₁₉, C₂₀, C₂₁, C₂₂, C₂₃), 80.7 (C₈), 66.6 (C₁₇), 54.8 (C₄), 53.2 (C₁₅), 53.0 (C₂₄), 52.4 (C₁), 51.3 (C₆), 37.5 (C₂₅), 31.4 (C₁₂), 29.3 (C₁₄), 28.2 (C₉, C₁₀, C₁₁), 22.3 (C₁₃); **APCI⁺ MS m/z** : 614 (M+H)⁺; **Anal.** Calcd for $C_{31}H_{43}N_5O_8 + 0.25 H_2O$: C, 60.67; H, 7.06; N, 11.41; found: C, 60.25; H, 7.13; N, 10.95;

Methyl (2S)-2-[[2-[2-[(2S)-2-amino-6-(benzyloxycarbonylamino) hexanoyl] hydrazino] acetyl]amino]-3-phenyl-propanoate trifluoro acetic acid salt **123**

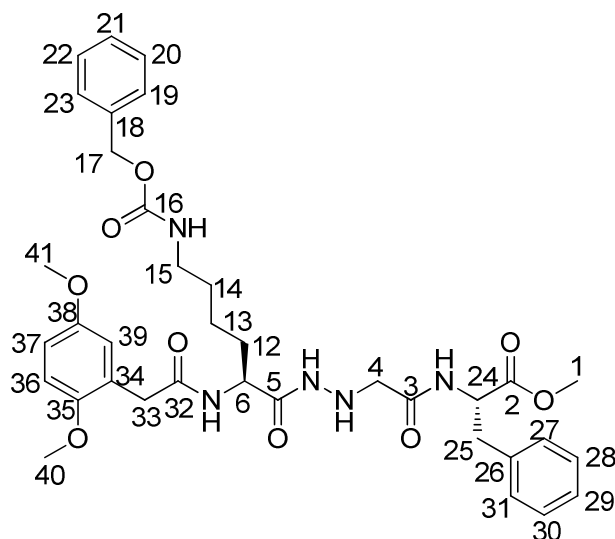


$C_{26}H_{35}N_5O_6 \cdot CF_3COOH$

MW= 627.60 g/mol

A solution of **122** (775 mg, 1.26 mmol, 1 eq) in DCM/TFA 3/1 (19 mL) was stirred for 2 h at room temperature. The solvent was evaporated under reduced pressure and the excess of TFA was coevaporated with methanol to afford the hydrochloride salt of the amine **123** as a colorless oil, which was used without further purification. 1H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 9.75 (m, 1H, NH-C₅), 8.30 (sl, 3H, NH₃), 8.08 (m, 1H, NH-C₂₄), 7.05-7.41 (m, 10H, H₁₉, H₂₀, H₂₁, H₂₂, H₂₃ and H₂₇, H₂₈, H₂₉, H₃₀, H₃₁), 6.28 (m, 2H, NH-C₁₆, NH-C₄), 5.01 (s, 2H, H₁₇), 4.55 (m, 1H, H₂₄), 3.61 (m, 1H, H₆), 3.59 (s, 3H, H₁), 3.45 (s, 2H, H₄), 2.98 (m, 4H, H₁₅, H₂₅), 1.71-1.18 (m, 6H, H₁₂, H₁₃, H₁₄); ^{13}C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ 171.7 (C₂), 169.40 (C₃), 167.8 (C₅), 156.0 (C₁₆), 137.2 (C₁₈), 136.9 (C₂₆), 129.0; 125.3 (C₂₇, C₂₈, C₂₉, C₃₀, C₃₁, C₁₉, C₂₀, C₂₁, C₂₂, C₂₃), 65.1 (C₁₇), 58.3 (C₄) 53.2 (C₁₅), 53.3 (C₂₄), 51.8 (C₁), 51.0 (C₆), 37.5 (C₂₅), 30.7(C₁₂), 28.8 (C₁₄), 21.4 (C₁₃); IR (cm⁻¹): 2944 (C-H), 1664 (C=O), 1528 (C=C), 1439 (C-H), 1157 (C-O); ESI⁺ MS *m/z*: 515(M+H)⁺

methyl (2S)-2-[[2-[2-[(2S)-6-(benzyloxycarbonylamino)-2-[[2-(2,5-dimethoxyphenyl)acetyl]amino]hexanoyl]hydrazino]acetyl]amino]-3-phenyl-propanoate
124a



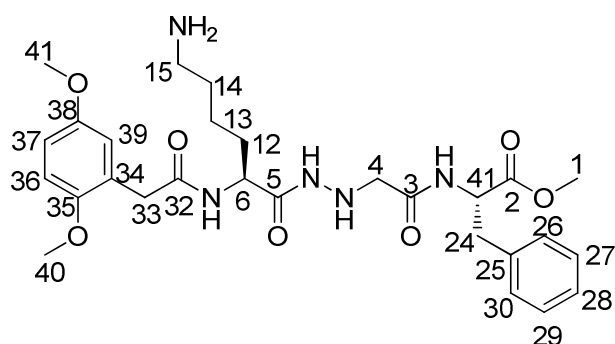
$C_{36}H_{45}N_5O_9$

MW= 691.77 g/mol

To a solution of the **free amine 123** (457 mg, 0.89 mmol, 1.0 eq) in dry DMF (10ml) was successively added 2,5-dimethoxyphenylacetic acid (209mg, 1.07 mmol, 1.2 eq), DIPEA (685 mg, 5.30 mmol, 7 eq), HBTU (406 mg, 1.07 mmol, 1.2 eq), and HOBt (144 mg, 1.07 mmol, 1.2 eq) in this order. The mixture was stirred overnight at RT under argon atmosphere. After removal of the solvent under reduced pressure, the residue was dissolved in EtOAc (10 ml), washed with 10% aqueous solution of citric acid (2 x 10 ml), water (10 ml), 10% aqueous solution of K_2CO_3 (2 x 10 ml) and brine (10 ml). The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtrated and evaporated to give crude product which was purified by column chromatography (EtOAc/MeOH : 10:0, then EtOAc /MeOH : 9,5:0,5, EtOAc /MeOH : 9:1) to afford the compound **124a** (423 mg, 0.61 mmol, 69%) as a white soild. **m.p.** : 143-145°C; **Rf**: **0.4** (S_1O_2 , EtOAc/MeOH: 9/1); **1H NMR (CDCl₃, 400 MHz)** δ 8.20 (s, 1H, NH-C₅), 7.47 (d, 1H, J=8.3 Hz, NH-C₂₄), 7.24-7.33 (m, 8H, H₁₉, H₂₀, H₂₁, H₂₂, H₂₃ and H₂₈, H₂₉, H₃₀), 7.14 (m, 2H, H₂₇ and H₃₁), 6.78 (m, 2H, H₃₇, H₃₉), 6.77 (m, 1H, H₃₆), 6.52 (d, J = 7.5 Hz, 1H, NH-C₆), 5.12 (m, 1H, NH-C₁₅), 5.07 (s, 2H, H₁₇), 4.83 (m, 1H, H₂₄), 4.63 (m, 1H, NH-C₄), 4.24 (m, 1H, H₆), 3.78 (s, 3H, H₄₁), 3.72 (s, 3H, H₄₀), 3.69 (s, 3H, H₁), 3.49 (m, 2H, H₃₃), 3.38 (s, 2H, H₄), 3.15 (m, 2H, H₂₅), 3.10 (m, 2H, H₁₅), 1.74 (m, 1H, H_{12a}), 1.53 (m, 1H, H_{12b}), 1.42 (m, 2H, H₁₄), 1.19 (m, 2H, H₁₃); **^{13}C NMR (CDCl₃, 100 MHz)** δ 172.5 (C₂), 171.4 (C₃₂), 169.9 (C₃), 167.7 (C₅), 156.5 (C₁₆), 153.7 (C₃₅), 151.1 (C₃₈), 136.7 (C₁₈), 136.0 (C₂₆), 129.1 (C₂₇, C₃₁), 128.6 ; 128.5 ; 128.0 ; 127.1 (C₁₉, C₂₀, C₂₁, C₂₂, C₂₃ and C₂₈, C₂₉, C₃₀), 124.3 (C₃₄), 117.2

(C₃₇, C₃₉), 113.1 (C₃₆), 66.5 (C₁₇), 56.0 (C₄₀), 55.7 (C₄₁), 54.8 (C₄), 53.0 (C₂₄), 52.4 (C₁), 51.4 (C₆), 40.5 (C₁₅), 38.8 (C₃₃), 37.4 (C₂₅), 31.4 (C₁₂), 29.3 (C₁₄), 22.3 (C₁₃); **IR** (cm⁻¹): 3285 (N-H), 1731 (C=O), 1688 (C=O), 1649 (N-H), 1501 (C=C), 1223 (C-N); **APCI⁺ MS** *m/z*: 692 [M+H]⁺; **Anal.** calcd for C₃₆H₄₅N₅O₉: C, 62.50; H, 6.56; N, 10.12; found: C, 62.45; H, 6.60; N, 10.02;

Methyl (2S)-2-[[2-[2-[(2S)-6-amino-2-[[2-(2,5-dimethoxyphenyl)acetyl]amino]hexanoyl]hydrazino]acetyl]amino]-3-phenyl-propanoate 124b

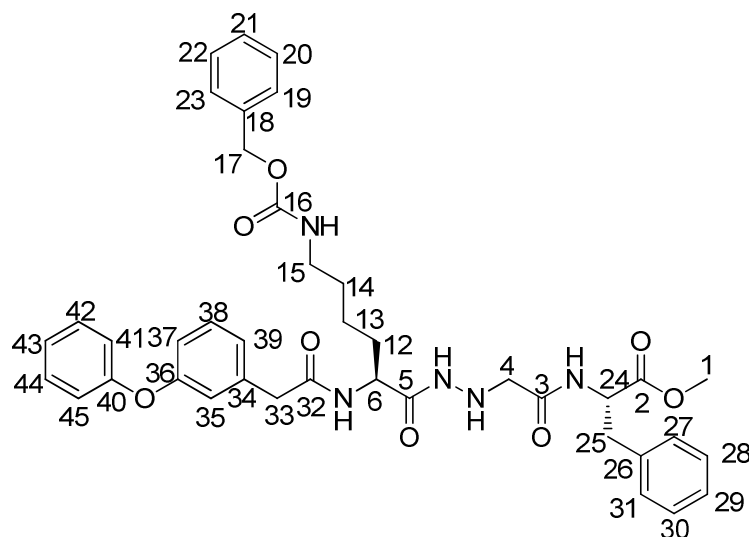


C₂₈H₃₉N₅O₇

MW= 557.64 g/mol

To a solution of **124a** (100 mg, 0.14 mmol, 1 eq) in dry MeOH/DMF (4/1 v/v 25 mL) was added 10% Pd/C (11 mg). The mixture was stirred overnight under hydrogen atmosphere at room temperature and filtered on a celite pad. After removal of the solvent under reduced pressure **124b** was obtained as a white solid (79 mg, 0.13 mmol, quantitative). **m.p.**: 84-86°C; **¹H NMR** (CDCl₃, 300 MHz) δ 8.48 (d, 1H, J= 7.4 Hz, NH-C₄₁), 7.96 (d, 1H, J= 8.0 Hz, NH-C₆), 7.28-7.21 (m, 5H, H₂₆, H₂₇, H₂₈, H₂₉, H₃₀), 6.86 (d, 1H, J= 8.5Hz, H₃₇), 6.75 (m, 2H, H₃₉, H₃₆), 5.25 (m, 1H, NH-C₄), 4.48 (dd, 1H, J=7.4 and 14.2 Hz, H₄₁), 4.16 (m, 1H, H₆), 3.69 (s, 3H, H₄₀), 3.67 (s, 3H, H₄₁), 3.57 (s, 3H, H₁), 3.42 (s, 2H, H₃₃), 3.26 (m, 2H, H₄), 3.04 (m, 1H, H_{24a}), 2.92 (m, 1H, H_{24b}), 2.53 (m, 2H, H₁₅), 1.59 (m, 1H, H_{12a}), 1.49 (m, 1H, H_{12b}), 1.34 (m, 2H, H₁₄), 1.25 (m, 2H, H₁₃); **¹³C NMR** (CDCl₃, 75 MHz) δ 171.7 (C₂), 171.2 (C₅), 169.8 (C₃), 169.7 (C₃₂), 152.9 (C₃₈), 151.3 (C₃₅), 137.0 (C₂₅), 130.0, 129.0, 128.3, 126.6 (C₂₆, C₂₇, C₂₈, C₂₉, C₃₀), 125.7 (C₃₄), 116.8 (C₃₇), 111.9 (C₃₆), 111.6 (C₃₉), 55.9 (C₄₀), 55.3 (C₄₁), 53.7 (C₄), 53.1 (C₄₁), 51.8 (C₁), 51.2 (C₆), 41.0 (C₁₅), 36.9 (C₂₄), 36.7 (C₃₃), 31.9 (C₁₂), 31.8 (C₁₄), 22.5 (C₁₃); **IR** (cm⁻¹): 2935 (C-H), 1647 (N-H), 1500 (C=C), 1224 (C-N); **ESI⁺ MS** *m/z*: 558 (M+H)⁺. **Anal.** : calcd for C₂₈H₃₉N₅O₇·0.75H₂O C. 58.91, H. 7.17, N. 12.27 found C. 58.87, H. 6.79, N. 12.36

Methyl (2S)-2-[[2-[2-[(2S)-6-(benzyloxycarbonylamino)-2-[[2-(3-phenoxyphenyl)acetyl]amino]hexanoyl]hydrazino]acetyl]amino]-3-phenyl-propanoate
125a



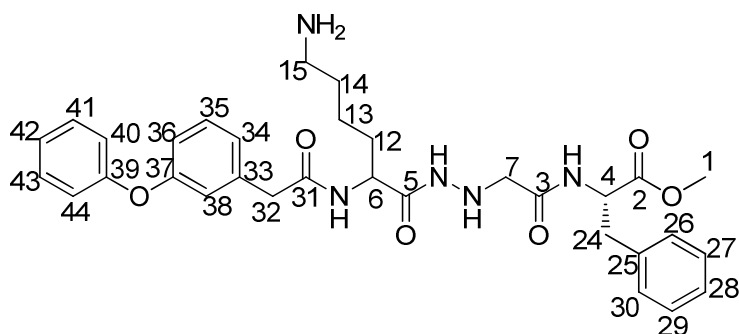
$C_{40}H_{45}N_5O_8$

MW=723.81 g/mol

To a solution of the trifluoroacetic salt of the amine **123** (300 mg, 0.63 mmol, 1 eq) in dry DMF (10mL) was successively added 3-phenoxyphenylacetic acid (218 mg, 0.75 mmol, 1,2 éq), DIPEA (871 mg, 5.30 mmol, 7 eq), HBTU (287 mg, 0.75 mmol, 1,2 eq), and HOBT (102 mg, 0.75 mmol, 1.2 eq). The mixture was stirred overnight at room temperature under argon atmosphere. After removal of the solvent under the reduced pressure, the residue was taken up in EtOAc (10 mL), and washed with 10% aqueous citric acid (2 x 10 mL), water (10 mL), 10% aqueous K_2CO_3 (2 x 10 mL) and brine (10 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated to give a crude product which was purified by column chromatography (EtOAc) to afford the compound **125a** (227 mg, 0.38 mmol, 48%) as a white solid. **m.p.**: 156-157°C; 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 8.05 (s, 1H, NH-C₅), 7.35 (d, 1H, J=8.3 Hz, NH-C₂₄), 7.24-6.82 (m, 21H, H₁₉, H₂₀, H₂₁, H₂₂, H₂₃ and H₂₇, H₂₈, H₂₉, H₃₀, H₃₁, H₃₅, H₃₇, H₃₈, H₃₉ and H₄₁, H₄₂, H₄₃, H₄₄, H₄₅ and NH-C₃₂, NH-C₅), 6.25 (m, 1H, NH-C₄), 5.07 (s, 2H, H₁₇), 4.75 (m, 1H, H₂₄), 4.24 (m, 1H, H₆), 3.42 (m, 2H, H₃₃), 3.26 (s, 3H, H₁), 3.38 (s, 2H, H₄), 3.10 (m, 4H, H₂₅, H₁₅), 1.74 (m, 1H, H_{12a}), 1.53 (m, 1H, H_{12b}), 1.42 (m, 2H, H₁₄), 1.19 (m, 2H, H₁₃); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 172.7 (C₂), 171.4 (C₃₂), 171.0 (C₅), 169.9 (C₃), 157.6 (C₁₆), 156.8 (C₃₆), 156.7 (C₄₀), 136.5 (C₁₈), 136.0 (C₂₆), 130.2 ; 129.8; 127.2 (C₂₇, C₂₈, C₂₉, C₃₀, C₃₁, C₃₈, C₄₂, C₄₄, C₃₅ and C₁₉, C₂₀, C₂₁, C₂₂, C₂₃), 125.3 (C₃₄), 123.9 (C₄₃), 123.5 (C₃₉), 119.6 (C₃₇), 119.0 (C₄₁, C₄₅), 66.6 (C₁₇), 54.7 (C₄), 53.1 (C₂₄), 52.5 (C₁), 51.4 (C₆), 43.1 (C₁₅), 40.4 (C₃₃), 37.4 (C₂₅), 31.4 (C₁₂), 29.3 (C₁₄), 22.3 (C₁₃); **IR** (cm^{-1}) : 3304 (N-H), 1690

(C=O), 1646 (N-H), 1533 (C=C), 1487 (C-H), 1258 (C-N); **MS (APCI+)**: m/z 724 (M+H)⁺; **Anal.** Calcd for C₄₀H₄₅N₅O₈: C, 66.37; H, 6.27; N, 9.68 ; found: C, 66.39 ; H, 6.37 ; N, 9.57 ;

Methyl (2S)-2-[[2-[2-[(2S)-6-amino-2-[[2-(3-phenoxyphenyl)acetyl]amino]hexanoyl]hydrazino]acetyl]amino]-3-phenyl-propanoate **125b**

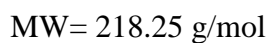
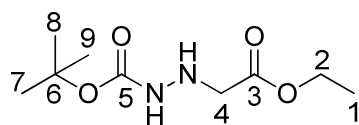


C₃₂H₃₉N₅O₆

MW= 589.68 g/mol

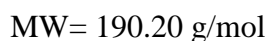
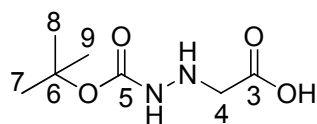
To a solution of **125a** (114 mg, 0.15 mmol, 1.0 eq) in dry MeOH/DMF (4/1 v/v 25 ml) was added palladium on activated charcoal 10% (11 mg, 10% m/m). The mixture was stirred overnight under hydrogen atmosphere at RT. The catalyst was filtrated on a celite pad. After removal of the solvent under reduced pressure, HCl/MeOH was added and precipitation with Et₂O afforded the hydrochloride salt **125b** as a colorless solid (81 mg, 0.13 mmol, 98%). **m.p.**: 118-120°C; **¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz)** δ 8.48 (d, 1H, J= 8.0 Hz, NH-C₅), 8.35 (d, 1H, J= 7.6 Hz, NH-C₄), 8.25 (d, 1H, J= 8.2 Hz, NH-C₆), 7.38 (t, 2H, J= 6.7 Hz, H₄₁, H₄₃), 7.28 (m, 4H, H₂₇, H₂₈, H₂₉, H₃₅), 7.21 (m, 2H, H₂₆, H₃₀), 7.13 (t, 1H, J= 7.2 Hz, H₄₂), 7.03 (d, 1H, J= 8.2 Hz, H₃₄), 6.99 (m, 2H, H₄₀, H₄₄), 6.94 (m, 2H, H₃₆, H₃₈), 5.25 (m, 1H, NH-C₇), 4.24 (m, 1H, H₄), 4.14 (m, 1H, H₆), 3.56 (s, 3H, H₁), 3.40 (s, 2H, H₃₂), 3.26 (m, 2H, H₇), 3.11 (m, 1H, H_{24a}), 2.95 (m, 1H, H_{24b}), 2.52 (m, 2H, H₁₅), 1.55 (m, 1H, H_{12a}), 1.49 (m, 1H, H_{12b}), 1.33 (m, 2H, H₁₄), 1.22 (m, 2H, H₁₃); **¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz)** δ 171.7 (C₂), 171.1 (C₅), 169.9 (C₃), 169.7 (C₃₁), 156.6-156.5 (C₃₇, C₃₉), 137.0 (C₂₅), 135.6 (C₃₃), 130.1, 130.0, 129.7, 129.0, 128.3, 126.9, 126.7 (C₂₆, C₂₇, C₂₈, C₂₉, C₃₀, C₃₅, C₄₁, C₄₃), 124.2 (C₃₄), 123.4 (C₄₂), 119.3, 119.2, 118.6 (C₃₈, C₄₀, C₄₄), 116.6 (C₃₆), 55.2 (C₁), 53.7 (C₇), 53.4 (C₄), 51.9 (C₆), 41.9 (C₃₂), 40.8 (C₁₅), 37.0 (C₂₄), 32.0 (C₁₂), 31.4 (C₁₄), 22.6 (C₁₃); **IR (cm⁻¹)** : 3514 () 2926 (C-H), 2048 (C-H), 1656 (C=O), 1485 (C-H). **ESI⁺ MS** m/z : 590 (M+H)⁺. **Anal.** Calcd for C₃₂H₄₀ClN₅O₆ + H₂O: C.59.66, H. 6.58, N. 10.87 found C. 59.51, H. 6.57, N. 10.57.

Ethyl 2-(2-tert-butoxycarbonylhydrazino)acetate **128**



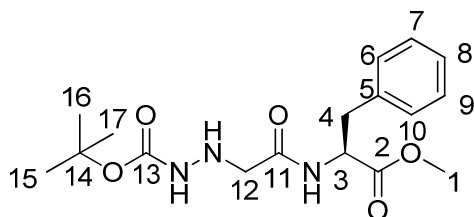
To a solution of ethyl hydrazinoacetate (2.0 g, 13.0 mmol, 1.0 eq) in MeOH (20 mL) was added DIPEA (6.72 g, 52.0 mmol, 4.0 eq) and Boc₂O (3.0 g, 14.2 mmol, 1.1 eq). The mixture was stirred overnight at room temperature. The solvent was removed and the residue obtained was dissolved in EtOAc (20 mL). The organic layer was washed successively with 10% aqueous solution of citric acid (2 X 15 mL), brine (20 mL), dried over MgSO₄ filtrated and evaporated. The crude product was purified by column chromatography (EtOAc/cyclohexane: 8:2) to afford the compound **128** (2.0 g, 9.2 mmol, 70%) as a colorless oil. **Rf**: 0.7 (EtOAc/cyclohexane: 8:2, SiO₂); **¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz)** δ 6.43 (bs, 1H, NH-C₅), 4.52 (m, 1H, NH-C₄), 4.17 (q, 2H, J= 6.7 Hz, H₂), 4.06 (m, 2H, H₄), 1.42 (s, 9H, H₇, H₈, H₉), 1.23 (t, 3H, J= 6.7 Hz, H₁); **¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz)** δ 171.4 (C₃), 156.2 (C₅), 81.2 (C₆), 61.0 (C₂), 52.8 (C₄), 28.2 (C₇, C₈, C₉), 14.2 (C₁); **ESI⁺ MS m/z**: 241 [M+Na]⁺; **Anal.** Calcd for C₉H₁₈N₂O₄: C, 49.53; H, 8.31; N, 12.84; found C, 50.47; H, 9.24; N, 12.59

2-(2-tert-butoxycarbonylhydrazino)acetic acid **129**



To a solution of **X** (1.86 g, 8.53 mmol, 1.0 eq.) in THF/MeOH (10 ml/10 ml) a 2N aqueous solution of NaOH (4.7 ml, 9.4 mmol, 1.1 eq.) was added. The reaction was stirred at room temperature over 3 hrs. The solvent was removed under vacuum (without distilling the water) and the remaining solution was brought at pH=5 by addition of 1N solution of HCl. The aqueous phase was extracted with EtOAc (3x 20 ml). The combined organic layers were dried with MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum to obtain **129** as white solid which was used in the next step without further purification (823 mg, 4.33 mmol, 51%); **¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz)** δ 8.30 (bs, 1H, NH-C₅), 7.52 (bs, 1H, COOH), 3.93 (s, 2H, H₄), 1.38 (s, 9H, H₇, H₈, H₉); **¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz)** δ 171.1 (C₃), 156.2 (C₅), 79.5 (C₆), 52.8 (C₄), 28.1 (C₇, C₈, C₉); **MS (ESI⁺) m/z**: 213 [M+Na]⁺; **Anal.** Calcd for C₇H₁₄N₂O₄: C, 44.20; H, 7.42; N, 14.73; found C, 44.22; H, 7.88; N, 14.48

**Methyl (2S)-2-[[2-(2-tert-butoxycarbonylhydrazino)acetyl]amino]-3-phenyl-propanoate
130**

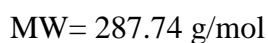
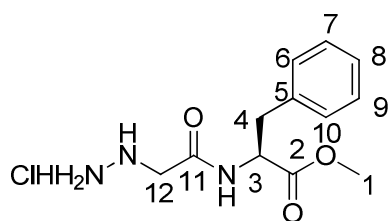


$C_{17}H_{25}N_3O_5$

MW= 351.40 g/mol

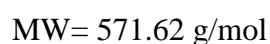
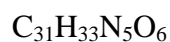
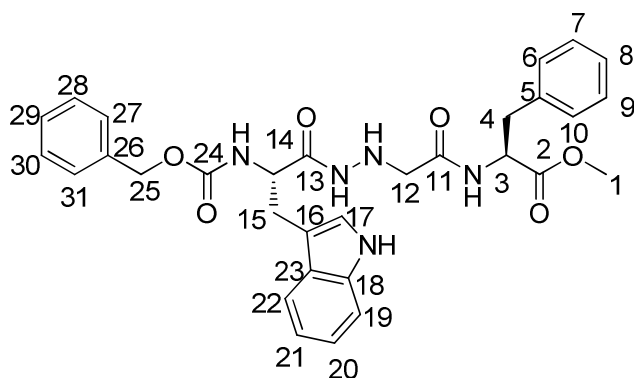
To a solution of **X** (800 mg, 4.20 mmol, 1.0 eq) in dry DMF (10ml) was added H-Phe-OMe (1.10 g, 5.04 mmol, 1.2 eq), DIPEA (2.14 g, 16.8 mmol, 4 eq), HBTU (1.9 g, 5.04 mmol, 1.2 eq), and HOBt (681 mg, 5.04 mmol, 1.2 eq) in this order. The mixture was stirred overnight at RT under argon atmosphere. The solvent was evaporated under vacuum and the residue obtained was dissolved in EtOAc (20 ml). The organic layer was washed successively with 10% aqueous solution of citric acid (2 x 20 ml), water (20 ml), 10% aqueous solution of K_2CO_3 (2 x 20 ml) and brine (20 ml) and dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated. The crude product was purified by column chromatography (EtOAc/cyclohexane: 8:2) to afford the compound **130** (1.3 g, 4.0 mmol, 99%) as a white foam: **Rf: 0.5** (S_1O_2 , EtOAc); **1H NMR (CDCl₃, 300 MHz)** δ 7.26 (m, 5H, H₆, H₇, H₈, H₉, H₁₀), 7.08 (m, 1H, NH-C₃), 6.42 (d, J= 5.1 Hz, NH-C₁₃), 5.90 (m, 1H, NH-C₁₂), 4.88 (m, 1H, H₃), 4.03 (s, 2H, H₁₂), 3.72 (s, 3H, H₁), 3.20-3.10 (m, 2H, H₄), 1.44 (s, 9H, H₁₅, H₁₆, H₁₇) **^{13}C NMR (CDCl₃, 75 MHz)** δ 171.8 (C₂), 168.7 (C₁₁), 156.9 (C₁₃), 135.9 (C₅), 129.3 (C₆, C₁₀), 128.6 (C₇, C₉), 127.2 (C₈), 81.2 (C₁₄), 54.9 (C₁₂), 53.6 (C₃), 53.0 (C₁), 37.8 (C₄), 28.2 (C₁₅, C₁₆, C₁₇); **IR (cm⁻¹):** 3300 (N-H), 2970 (C-H) (1652 –C=O), 1506 (C=C), 1234 (C-O); **ESI⁺ MS m/z :** 374.2 [M+Na]⁺;

Methyl (2S)-2-[(2-hydrazinoacetyl)amino]-3-phenyl-propanoate **131**



A solution of **130** (662 mg, 1.00 mmol, 1 eq) in HCl 4M in dioxane (15 ml) was stirred for 2 h at room temperature. The solvent was evaporated in vacuum to afford the amine **131** as an hydrochloride salt in quantitative yield as a yellow oil, which was used without further purification. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 8.82 (d, 1H, J= 5.3 Hz, NH-C₃), 8.2 (bs, 3H, NH₃), 7.31-7.21 (m, 6H, H₆, H₇, H₈, H₉, H₁₀, NH-C₁₂), 4.52 (m, 1H, H₃), 4.03 (s, 2H, H₁₂), 3.62 (s, 3H, H₁), 3.03 (dd, J= 13.6, 6.3 Hz, 1H, H_{4a}), 2.92 (m, 1H, H_{4b}); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ 171.6 (C₂), 168.2 (C₁₁), 136.9 (C₅), 129.0 (C₆, C₁₀), 128.3 (C₇, C₉), 126.6 (C₈), 53.7 (C₃), 53.5 (C₁), 50.2 (C₁₂), 36.6 (C₄); ESI⁺ MS *m/z*: 252 [M+H]⁺;

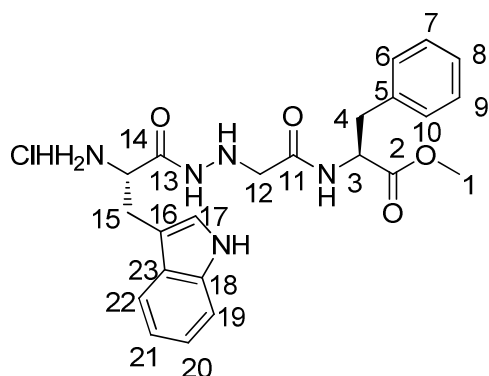
Methyl (2S)-2-[[2-[2-[(2S)-2-(benzyloxycarbonylamino)-3-(1H-indol-3-yl)propanoyl]hydrazino]acetyl]amino]-3-phenyl-propanoate **132**



To a solution of **131** (1.3 g, 3.70 mmol, 1.0 eq) in dry DMF (20ml) was added Z-Trp-OH (1.0 g, 2.96 mmol, 0.8 eq), DIPEA (3.3 g, 25.9 mmol, 7.0 eq), HBTU (1.7 g, 4.45 mmol, 1.2 eq), and HOBT (601 mg, 4.45 mmol, 1.2 eq) in this order. The mixture was stirred overnight at room temperature under argon atmosphere. The solvent was evaporated under vacuum and the residue obtained was dissolved in EtOAc (20 ml). The organic layer was washed successively with 10% aqueous solution of citric acid (2 x 20 ml), water (20 ml), 10% aqueous solution of K₂CO₃ (2 x 20 ml) and brine (20 ml) and dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated. The

crude product was purified by column chromatography (EtOAc) to afford the compound **132** (896 mg, 1.57 mmol, 53%) as a white foam: **Rf: 0.5** (S_iO_2 , EtOAc); **1H NMR (CDCl₃, 400 MHz)** δ 8.38 (bs, 1H, NH-C₁₈), 7.60 (m, 2H, H₂₀, H₂₁), 7.32 (m, 2H, H₂₇, H₃₁), 7.30 (m, 2H, H₁₉, H₂₂), 7.24 (m, 1H, NH-C₃), 7.22-7.15 (m, 6H, H₇, H₈, H₉, H₂₈, H₂₉, H₃₀), 7.08 (m, 2H, H₆, H₁₀), 6.89 (bs, 1H, H₁₇), 5.59 (d, 1H, J= 5.1 Hz, NH-C₁₄), 5.09 (dd, 2H, J= 20.6 and 12.4 Hz, H₂₅), 4.72 (dd, 1H, J= 6.9 and 13.2 Hz, H₃), 4.40 (m, 1H, H₁₄), 3.61 (s, 3H, H₁), 3.25 (m, 1H, H_{15a}), 3.18 (m, 2H, H₁₂), 3.11 (m, 1H, H_{4a}), 3.09 (m, 1H, H_{15b}), 2.98 (dd, 1H, J= 13.9 and 7.3 Hz, H_{4b}); **^{13}C NMR (CDCl₃, 100 MHz)** δ 172.1 (C₂), 171.2 (C₁₃), 169.5 (C₁₁), 156.9 (C₂₄), 136.2 (C₁₈), 136.1 (C₂₃), 136.0 (C₂₆), 135.9 (C₅), 129.1 (C₆, C₁₀), 128.6 (C₇, C₉), 128.5 (C₈), 128.2 (C₂₇, C₃₁), 127.2 (C₂₉), 123.6 (C₁₇), 122.2 (C₂₈, C₃₀), 118.6 (C₂₁, C₂₀), 111.4 (C₁₉, C₂₂), 109.6 (C₁₆), 67.1 (C₂₅), 54.3 (C₁₂), 53.0 (C₃, C₁₄), 52.4 (C₁), 37.5 (C₄), 28.7 (C₁₅); **IR (cm⁻¹):** 3300 (N-H), 1652 (C=O), 1506 (C=C), 1234 (C-O); **ESI⁺ MS m/z :** 594 [M+Na]⁺; **Anal.** Calcd for C₃₁H₃₃N₅O₆ + 1H₂O: C, 63.14; H, 6.00; N, 11.88; found C, 63.17; H, 5.79; N, 11.81

Methyl (2S)-2-[[2-[2-[(2S)-2-amino-3-(1H-indol-3-yl)propanoyl]hydrazino]acetyl]amino]-3-phenyl-propanoate hydrochloride **133**



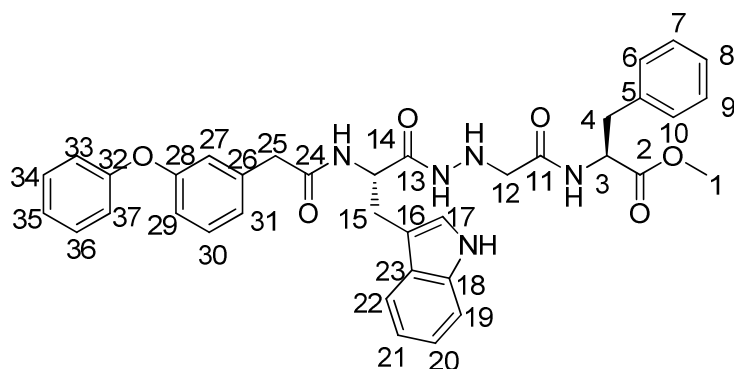
C₂₃H₂₈ClN₅O₄

MW= 473.95 g/mol

A solution of **132** (866 mg, 1.5 mmol, 1 eq) in HCl 4M in dioxane (15 ml) was stirred for 2 h at room temperature. The solvent was evaporated under vacuum to afford the amine **133** as an hydrochloride salt in quantitative yield as yellow oil, which was used without further purification. **1H NMR (CDCl₃, 300 MHz)** δ 8.51 (bs, 3H, NH₃), 8.32 (bs, 1H, NH-C₁₈), 7.51 (m, 2H, H₂₀, H₂₁), 7.25 (d, 1H, J= 7.5 Hz, H₁₉), 7.13-6.97 (m, 7H, H₇, H₈, H₉, H₆, H₁₀, H₂₂, NH-C₁₁), 6.91 (s, 1H, H₁₇), 4.76 (dd, 1H, J= 6.9 and 13.2 Hz, H₃), 3.60 (s, 3H, H₁), 3.53 (m, 1H, H₁₄), 3.11-2.98 (m, 6H, H₁₅, H₁₂, H₄); **^{13}C NMR (CDCl₃, 75 MHz)** δ 174.5 (C₂), 172.1 (C₁₃), 170.0 (C₁₁), 136.3 (C₁₈), 136.1 (C₂₃), 129.7 (C₆, C₁₀), 129.1 (C₇, C₉), 127.5 (C₅), 127.1

(C₈), 123.4 (C₂₀), 122.1 (C₂₁), 119.5 (C₂₂), 118.7 (C₁₉), 114.4 (C₁₇), 110.8 (C₁₆), 54.8 (C₃), 54.7 (C₁₂), 52.9 (C₁₄), 52.4 (C₁), 37.6 (C₄), 30.7 (C₁₅); **ESI⁺ MS** *m/z*: 460 [M+Na⁺];

Methyl (2*S*)-2-[[2-[2-[(2*S*)-3-(1*H*-indol-3-yl)-2-[[2-(3-phenoxyphenyl)acetyl]amino]propanoyl]hydrazino]acetyl]amino]-3-phenyl-propanoate **134**



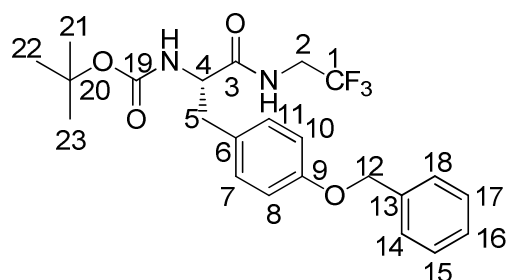
C₃₇H₃₇N₅O₆

MW= 647.72 g/mol

To a solution of **133** (616 mg, 1.3 mmol, 1.0 eq) in dry DMF (15ml) was added 3-phenoxyphenylacetic acid (356 mg, 1.56 mmol, 1.3 eq), DIPEA (672 mg, 5.22 mmol, 4.0 eq), HBTU (595 mg, 1.56 mmol, 1.2 eq), and HOBt (211 mg, 1.56 mmol, 1.2 eq) in this order. The mixture was stirred overnight at room temperature under argon atmosphere. The solvent was evaporated under vacuum and the obtained residue was dissolved in EtOAc (20 ml). The organic layer was washed successively with 10% aqueous solution of citric acid (2 x 15 ml), water (15 ml), 10% aqueous solution of K₂CO₃ (2 x 15 ml) and brine (15 ml) and dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated. The crude product was purified by column chromatography (EtOA) to afford the compound **134** (407 mg, 0.63 mmol, 48%) as a white foam: **Rf: 0.5** (SiO₂, EtOAc/MeOH: 9/1); **¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz)** δ 8.34 (bs, 1H, NH-C₁₈), 7.69 (bs, 1H, NH-C₁₃), 7.50 (d, 1H, J= 7.5 Hz, H₈), 7.43 (d, 1H, J= 7.9 Hz, NH-C₁₁), 7.49 (m, 2H, H₃₃, H₃₅), 7.43 (m, 2H, H₇, H₉), 7.22 (m, 2H, H₂₁, H₂₀), 7.19 (m, 1H, H₃₅), 7.17 (m, 1H, H₁₉), 7.15 (m, 1H, H₂₂) 7.13 (m, 1H, H₃₀), 7.03 (m, 2H, H₆, H₁₀), 6.96 (d, 2H, J= 8.1 Hz, H₃₃, H₃₇), 6.87 (m, 2H, H₂₇, H₂₉), 6.76 (m, 1H, H₃₁), 6.71 (s, 1H, H₁₇), 6.39 (d, 1H, J= 7.4 Hz, NH-C₂₄) 4.65 (dd, 1H, J= 6.2 and 13.4 Hz, H₃), 4.50 (dd, 1H, J= 6.7 and 13.7 Hz, H₁₄), 3.53 (s, 3H, H₁), 3.38 (s, 2H, H₂₅), 3.08 (m, 2H, H₁₂), 3.06 (m, 1H, H_{15a}), 3.03 (m, 1H, H_{4a}), 2.94 (m, 1H, H_{15b}), 2.91 (dd, 1H, J= 13.9 and 7.3 Hz, H_{4b}); **¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz)** δ 172.3 (C₂), 171.1 (C₁₃), 170.7 (C₂₄), 170.0 (C₁₁), 157.6 (C₂₈), 156.9 (C₃₂), 136.4 (C₂₆), 136.1 (C₁₈, C₅), 136.0 (C₂₃), 130.1 (C₂₂), 129.8 (C₂₁, C₂₀, C₁₉), 129.0 (C₆, C₁₀), 128.6 (C₇, C₉), 127.1 (C₃₀), 124.1 (C₈), 123.4 (C₁₇), 119.7 (C₃₃, C₃₇), 119.0 (C₃₁), 118.7 (C₃₆), 118.0 (C₃₄), 117.4 (C₂₇, C₂₉), 114.4

(C₃₄), 109.8 (C₁₆), 54.4 (C₁₂), 53.1 (C₃), 52.6 (C₁₄), 52.4 (C₁), 43.0 (C₂₅), 37.5 (C₄), 28.2 (C₁₅); **IR** (cm⁻¹): 3300 (N-H), 1643 (C=O), 1506 (C=C), 1234 (C-O); **ESI⁺ MS** *m/z*: 670 [M+Na⁺]; **Anal.** Calcd for C₃₇H₃₇N₅O₆: C, 68.61; H, 5.76; N, 10.81; found C, 68.29; H, 6.03; N, 10.73

tert-butyl N-[(1S)-1-[(4-benzyloxyphenyl)methyl]-2-oxo-2-(2,2,2-trifluoroethylamino)ethyl]carbamate 137

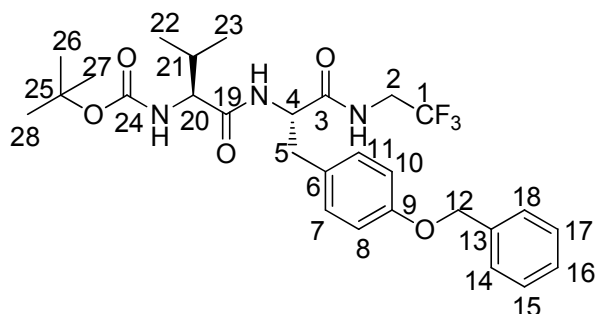


C₂₃H₂₇F₃N₂O₄

MW= 452.47 g/mol

To a solution of 2,2,2-trifluoroethylamine hydrochloride (3 g, 8.07 mmol, 1 eq) in dry DMF (30 ml) was added Boc-tyr(Bzl)-OH (1.3 g, 9.69 mmol, 1.2 eq), DIPEA (4.1 g, 32.28 mmol, 4 eq), EDCI (1.8 g, 9.69 mmol, 1.2 eq) and HOBT (1.3 g, 9.69 mmol, 1.2 eq) in this order. The mixture was stirred overnight at room temperature under argon atmosphere. The solvent was evaporated under vacuum and the residue obtained was dissolved in EtOAc (30 ml). The organic layer was washed successively with 10% aqueous solution of citric acid (2 x 30 ml), water (30 ml), 10% aqueous solution of K₂CO₃ (2 x 30 ml) and brine (30 ml), and dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated. The crude product was purified by column chromatography (EtOAc /cyclohexane, 2:8) to give the compound **137** (3.4 g, 7.00 mmol, 95%) as a white solid. **m.p.** 148°-150°C; **Rf:** 0.25 (S_iO₂, EtOAc/cyclohexane: 2/8); **¹H NMR** (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.35 (m, 5H, H₁₄, H₁₅, H₁₆, H₁₇, H₁₈), 7.15 (d, 2H, J= 8.7 Hz, H₇, H₁₁), 6.91 (d, 2H, J= 8.7 Hz, H₈, H₁₀), 6.51 (bs, 1H, NH-C₁₉), 5.07 (s, 2H, H₁₂), 4.28 (m, 1H, H₄), 3.82 (m, 2H, H₂), 3.04 (m, 1H, H_{5a}), 3.02 (m, 1H, H_{5b}), 1.38 (s, 9H, H₂₁, H₂₂, H₂₃); **¹³C NMR** (CDCl₃, 75 MHz) δ 172.0 (C₃), 157.9 (C₁₉), 156.6 (C₉), 137.0 (C₁₃), 130.3 (C₇, C₁₁), 128.6 (C₁₅, C₁₇), 128.4 (C₆), 128.0 (C₁₆), 127.5 (C₁₄, C₁₈), 123.8 (q, J= 278.4 Hz, C₁), 115.1 (C₈, C₁₀), 70.0 (C₂₀), 65.8 (C₁₂), 54.1 (C₄), 40.5 (q, J= 35.3 Hz, C₂), 37.2 (C₅), 28.1 (C₂₁, C₂₂, C₂₃); **¹⁹F** (CDCl₃, 188 MHz) δ -72.63 (t, J= 8.9 Hz); **IR** (cm⁻¹): 3330 (N-H), 1670 (C=O), 1512 (N-H), 1395 (C-H); **ESI⁺ MS** *m/z*: 475 [M+Na⁺]; **Anal.** Calcd for C₂₃H₂₇F₃N₂O₄: C, 61.05; H, 6.01; N, 6.19; found C, 61.25; H, 6.04; N, 6.16

tert-butyl N-[1-[[[(1S)-1-[(4-benzyloxyphenyl)methyl]-2-oxo-2-(2,2,2-trifluoroethylamino)ethyl]carbamoyl]-2-methyl-propyl]carbamate **138**



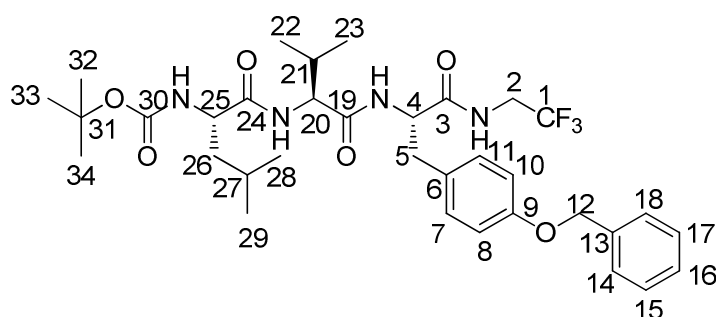
$C_{28}H_{36}F_3N_3O_5$

MW= 551.60 g/mol

A solution of **137** (2.0 g, 4.42 mmol, 1 eq) in HCl 4M in dioxane (50 ml) was stirred for 2 h at room temperature. The solvent was evaporated under vacuum to afford free amine as the hydrochloride salt in quantitative yield as yellow oil, which was used without further purification. $^1\text{H NMR}$ (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 9.33 (t, 1H, J= 5.6 Hz, NH), 8.39 (bs, 3H, NH₃), 7.46-7.29 (m, 5H), 7.18 (d, 2H, J= 8.6 Hz), 6.95 (d, 2H, J= 8.6 Hz), 5.08 (s, 2H), 4.08 (m, 1H), 3.95 (m, 2H), 2.98 (m, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ 169.0, 157.5, 137.1, 130.6, 127.8, 127.7, 127.6, 126.3, 123.8 (q, J= 278.4 Hz), 114.7, 69.4, 53.5, 41.0 (q, J= 35.3 Hz), 35.8; ^{19}F (DMSO-*d*₆, 188 MHz) δ -70.77 (t, J= 8.9 Hz); ESI⁺ MS *m/z*: 353 [M+H⁺]. To a solution of obtained free amine (4.42 mmol, 1 eq) in dry DMF (30 ml) was added Boc-Val-OH (1.2 g, 5.30 mmol, 1.2 eq), DIPEA (2.3 g, 17.68 mmol, 4 eq), EDCI (1.0 g, 5.30 mmol, 1.2 eq) and HOBt (716 mg, 5.30 mmol, 1.2 eq) in this order. The mixture was stirred overnight at room temperature under argon atmosphere. The solvent was evaporated under vacuum and the residue obtained dissolved in EtOAc (30 ml). The organic layer was washed successively with 10% aqueous solution of citric acid (2 x 30 ml), water (30 ml), 10% aqueous solution of K₂CO₃ (2 x 30 ml) and brine (30 ml), dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated. The crude product was purified by column chromatography (EtOAc /cyclohexane, 2:8) to give the compound **X** (2.3 g, 4.16 mmol, 94%) as a white solid. **m.p.** 182°-184°C; **Rf**: 0.2 (SiO₂, EtOAc/cyclohexane: 2/8); $^1\text{H NMR}$ (CDCl₃, 300 MHz) δ , 7.42-7.30 (m, 5H, H₁₄, H₁₅, H₁₆, H₁₇, H₁₈), 7.08 (d, 2H, J= 8.6 Hz, H₇, H₁₁), 6.94 (d, 2H, J= 8.6 Hz, H₈, H₁₀), 6.47 (d, 1H, J= 5.9 Hz, NH-C₄), 5.04 (s, 2H, H₁₂), 4.80 (d, 1H, J= 5.4 Hz, NH-C₂₀), 4.69 (dd, 1H, J= 14.2 and 6.7 Hz, H₄), 3.96 (m, 1H, H_{2a}), 3.83 (t, 1H, J= 52 Hz, H₂₀), 3.70 (m, 1H, H_{2b}), 3.18 (dd, 1H, J= 14.2 and 5.4 Hz, H_{5a}), 2.99 (dd, 1H, J= 14.2 and 6.6 Hz, H_{5b}), 2.16 (m, 1H, H₂₁), 1.37 (s, 9H, H₂₆, H₂₇, H₂₈), 0.92 (d, 3H, J= 6.9 Hz, H₂₂), 0.82 (d, 3H, J= 6.7 Hz, H₂₃); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl₃, 75 MHz) δ 171.5 (C₃), 171.3 (C₁₉), 158.0 (C₉), 156.6 (C₂₄), 136.9

(C₁₃), 130.2 (C₇, C₁₁), 128.6 (C₁₅, C₁₇), 128.1 (C₆), 128.0 (C₁₆), 127.4 (C₁₄, C₁₈), 123.9 (q, J= 278.4 Hz, C₁), 115.2 (C₈, C₁₀), 80.9 (C₂₅), 70.0 (C₁₂), 60.9 (C₂₀), 53.9 (C₄), 40.7 (q, J= 35.3 Hz, C₂), 36.6 (C₅), 29.9 (C₂₁), 28.1 (C₂₆, C₂₇, C₂₈), 19.2 (C₂₂), 17.3 (C₂₃); ¹⁹F (CDCl₃, 188 MHz) δ -72.24 (t, J= 8.8 Hz); IR (cm⁻¹): 3310 (C-H aromatic), 2963 (C-H), 1684 (C=O), 1649 (C=C), 1519 (N-H); ESI⁺ MS m/z: 574 [M+Na⁺]; Anal. Calcd for C₂₈H₃₆F₃N₃O₅: C, 60.97; H, 6.58; N, 7.62; found C, 60.95; H, 6.57; N, 7.63

tert-butyl N-[(1S)-1-[[[(1S)-1-[[[(1S)-1-(4-benzyloxyphenyl)methyl]-2-oxo-2-(2,2,2-trifluoroethylamino)ethyl]carbamoyl]-2-methyl-propyl]carbamoyl]-3-methyl-butyl] carbamate 139



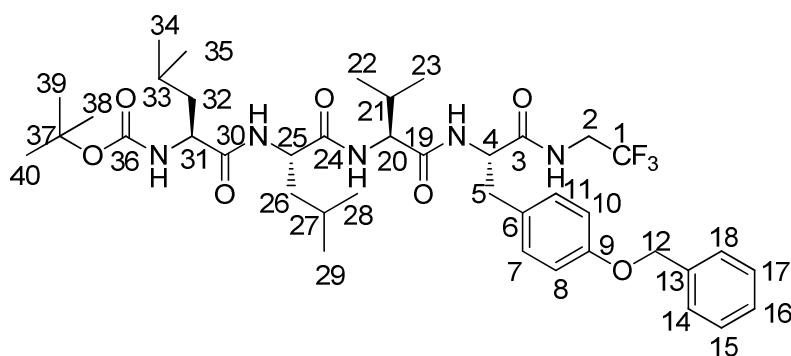
C₃₄H₄₇F₃N₄O₆

MW= 664.76 g/mol

A solution of **138** (2.2 g, 3.81 mmol, 1 eq) in HCl 4M in dioxane (30 ml) was stirred for 2 h at room temperature. The solvent was evaporated under vacuum to afford free amine in quantitative yield as a yellow oil, which was used without further purification. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 8.88 (t, 1H, J= 5.6 Hz, NH), 8.76 (d, 1H, J= 5.9 Hz, NH), 8.15 (bs, 3H, NH₃), 7.45-7.23 (m, 5H), 7.22 (d, 2H, J= 8.7 Hz), 6.94 (d, 2H, J= 8.7 Hz), 5.06 (s, 2H), 4.55 (m, 1H), 3.95 (m, 1H), 3.61 (m, 1H), 2.95 (m, 1H), 2.81 (m, 1H), 2.14 (m, 1H), 0.86 (d, 3H, J= 6.7 Hz), 0.56 (d, 3H, J= 6.9 Hz); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ 171.5, 167.8, 158.0, 157.0, 137.2, 130.2, 129.3, 128.4, 127.7, 127.6, 124.6 (q, J= 278.4 Hz), 114.4, 69.0, 57.0, 54.5, 41.4 (q, J= 35.3 Hz), 36.4, 29.8, 18.2, 17.4; ¹⁹F (DMSO-*d*₆, 188 MHz) δ -71.06 (t, J= 8.9 Hz); ESI⁺ MS m/z: 452 [M+H]⁺. To a solution of **the free amine** (3.81 mmol, 1 eq) in dry DMF (20 ml) was added Boc-Leu-OH (1.02 g, 4.44 mmol, 1.2 eq), DIPEA (1.9 g, 14.80 mmol, 4 eq), EDCI (852 mg, 4.44 mmol, 1.2 eq) and HOBt (600 mg, 4.44 mmol, 1.2 eq) in this order. The mixture was stirred overnight at room temperature under argon atmosphere. The solvent was evaporated under vacuum and the residue dissolved in EtOAc (20 ml). The organic layer was washed with 10% aqueous solution of citric acid (2 x 20 ml), water (20 ml), 10% aqueous solution of K₂CO₃ (2 x 20 ml) and brine (20 ml), dried over

Na₂SO₄, filtered and evaporated. The crude product was purified by column chromatography (EtOAc) to give the compound **139** (762 mg, 1.14 mmol, 31%) as a white foam. **Rf: 0.6** (SiO₂, EtOAc/cyclohexane: 7/3); **¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz)** δ 7.46-7.34 (m, 5H, H₁₄, H₁₅, H₁₆, H₁₇, H₁₈), 7.14 (d, 2H, J= 8.6 Hz, H₇, H₁₁), 7.03 (m, 1H, NH-C₂₀), 6.90 (d, 2H, J= 8.6 Hz, H₈, H₁₀), 6.90 (m, 1H, NH-C₄), 5.06 (s, 2H, H₁₂), 5.01 (d, 1H, J= 5.3 Hz, NH-C₂₅) 4.90 (dd, 1H, J= 13.9 and 8.2 Hz, H₄), 4.19 (m, 1H, H₂₀), 4.11 (m, 1H, H₂₅), 4.07 (m, 2H, H₂), 3.34 (dd, 1H, J= 14.2 and 4.4 Hz, H_{5a}), 2.95 (dd, 1H, J= 14.2 and 9.0 Hz, H_{5b}), 2.16 (m, 1H, H₂₁), 1.71 (m, 1H, H₂₇), 1.65 (m, 1H, H_{26a}), 1.54 (m, 1H, H_{26b}), 1.45 (s, 9H, H₃₂, H₃₃, H₃₄), 0.98 (d, 3H, J= 6.3 Hz, H₂₈), 0.95 (d, 3H, J= 6.4 Hz, H₂₉), 0.89 (d, 3H, J= 6.9 Hz, H₂₂), 0.77 (d, 3H, J= 6.7 Hz, H₂₃); **¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz)** δ 173.9 (C₃), 171.8 (C₁₉), 170.9 (C₂₄), 157.7 (C₉), 156.4 (C₃₀), 137.0 (C₁₃), 129.9 (C₇, C₁₁), 128.9 (C₆), 128.5 (C₁₅, C₁₇), 127.9 (C₁₆), 127.4 (C₁₄, C₁₈), 124.0 (q, J= 278.3 Hz, C₁), 115.0 (C₈, C₁₀), 81.0 (C₃₁), 70.0 (C₁₂), 59.5 (C₂₀), 54.1 (C₄), 54.0 (C₂₅), 40.6 (q, J= 44.0 Hz, C₂), 36.5 (C₅), 29.8 (C₂₁), 29.7 (C₂₆), 28.2 (C₃₂, C₃₃, C₃₄), 24.8 (C₂₇), 23.0 (C₂₈), 21.7 (C₂₉), 19.2 (C₂₂), 17.2 (C₂₃); **¹⁹F (CDCl₃, 188 MHz)** δ -72.35 (t, J= 8.8 Hz); **IR (cm⁻¹)**: 3308 (N-H), 2959 (C-H), 1678 (C=O), 1644 (C=C), 1528 (N-H); **ESI⁺ MS m/z**: 687.7 [M+Na⁺]; **Anal.** Calcd for C₃₄H₄₇F₃N₄O₈: C, 61.43; H, 7.13; N, 8.43; found C, 61.79; H, 7.19; N, 8.14

tert-butyl N-[(1S)-1-[[[(1S)-1-[[[(1S)-1-[(4-benzyloxyphenyl)methyl]-2-oxo-2-(2,2,2-trifluoroethylamino)ethyl]carbamoyl]-2-methyl-propyl]carbamoyl]-3-methyl-butyl]carbamoyl]-3-methyl-butyl]carbamate **140**



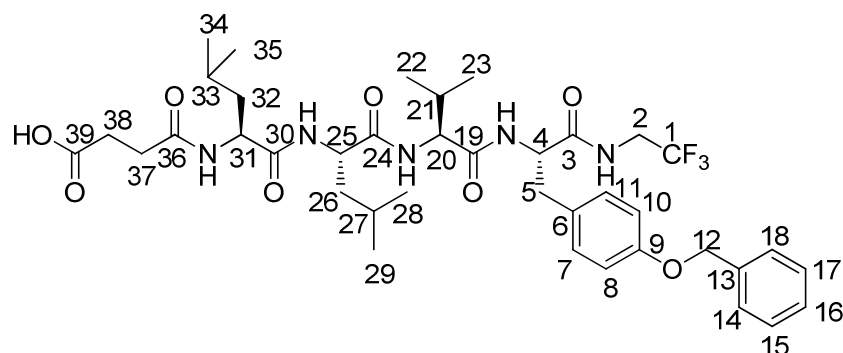
C₄₀H₅₈F₃N₅O₇

MW= 777.91 g/mol

A solution of **139** (662 mg, 1.00 mmol, 1 eq) in HCl 4M in dioxane (15 ml) was stirred for 2 h at room temperature. The solvent was evaporated in vacuum to afford free amine with quantitative yield as yellow oil, which was used without further purification. **¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz)** δ 8.71 (t, 1H, J= 5.6 Hz, NH), 8.45 (d, 1H, J= 5.9 Hz, NH), 8.25 (bs,

3H, NH₃), 7.44-7.29 (m, 5H), 7.16 (d, 2H, J= 8.6 Hz), 6.88 (d, 2H, J= 8.6 Hz), 5.04 (s, 2H), 4.56 (m, 1H), 4.21 (m, 1H), 3.92 (m, 1H), 3.90 (m, 2H), 2.89 (m, 1H), 2.76 (m, 1H), 1.97 (m, 1H), 1.71 (m, 1H), 1.49 (m, 2H), 0.98 (d, 3H, J= 6.3 Hz), 0.96 (d, 3H, J= 6.4 Hz), 0.91 (d, 3H, J= 6.9 Hz), 0.88 (d, 3H, J= 6.7 Hz); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ 171.9, 170.2, 168.7, 157.0, 137.1, 130.0, 129.5, 128.3, 127.7, 127.5, 124.6 (q, J= 278.3 Hz), 114.3, 69.1, 57.7, 54.0, 50.1, 40.6 (q, J= 44.0 Hz), 36.5, 30.8, 29.7, 23.4, 22.6, 22.0, 19.0, 18.2; ¹⁹F (DMSO-*d*₆, 188 MHz) δ -71.03 (t, J= 8.8 Hz); ESI⁺ MS *m/z*: 565 [M+H]⁺. To a solution of the free amine (1.00 mmol, 1 eq) in dry DMF (15 ml) was added Boc-Leu-OH (273 mg, 1.20 mmol, 1.2 eq), DIPEA (520 mg, 4.00 mmol, 4 eq), HBTU (456 mg, 1.20 mmol, 1.2 eq) and HOBt (162 mg, 1.20 mmol, 1.2 eq) in this order. The mixture was stirred overnight at room temperature under argon atmosphere. The solvent was evaporated under vacuum and the residue was precipitated in EtOAc. The white precipitate was filtered washed with 10% aqueous solution of citric acid (2 x 20 ml), water (20 ml), 10% aqueous solution of K₂CO₃ (2 x 20 ml) and Et₂O (20 ml) to give the compound **140** (500 mg, 0.64 mmol, 64%) as a white solid. **m.p.**: 236°-238°C; **Rf**: 0.6 (SiO₂, EtOAc/cyclohexane: 6/4); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 7.41-7.32 (m, 6H, H₁₄, H₁₅, H₁₆, H₁₇, H₁₈, NH-C₃), 7.14 (m, 1H, NH-C₄), 7.13 (d, 2H, J= 8.4 Hz, H₇, H₁₁), 6.87 (d, 2H, J= 8.4 Hz, H₈, H₁₀), 5.04 (s, 2H, H₁₂), 4.50 (dd, 1H, J= 7.7 and 5.7 Hz, H₄), 4.34 (dd, 1H, J= 8.6 and 5.0 Hz, H₃₁), 4.12 (d, 1H, J= 6.5 Hz, H₂₀), 3.95 (m, 1H, H₂₅), 3.88 (m, 2H, H₂), 2.88 (dd, 1H, J= 14.0 and 5.3 Hz, H_{5a}), 2.76 (dd, 1H, J= 13.7 and 8.8 Hz, H_{5b}), 1.91 (m, 1H, H₂₁), 1.58 (m, 2H, H₂₇, H₃₃), 1.44 (m, 2H, H₃₂), 1.38 (m, 2H, H₂₆), 1.36 (s, 9H, H₃₈, H₃₉, H₄₀), 0.85 (m, 6H, H₂₈, H₂₉), 0.82 (m, 6H, H₃₄, H₃₅), 0.74 (m, 6H, H₂₂, H₂₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 172.4 (C₃₀), 171.8 (C₃), 171.6 (C₂₄), 170.5 (C₁₉), 157.0 (C₉), 155.2 (C₃₆), 137.2 (C₁₃), 130.0 (C₇, C₁₁), 129.5 (C₆), 128.4 (C₁₅, C₁₇), 127.7 (C₁₆), 127.6 (C₁₄, C₁₈), 124.6 (q, J= 278.3 Hz, C₁), 114.4 (C₈, C₁₀), 78.0 (C₃₇), 69.1 (C₁₂), 57.3 (C₂₀), 53.9 (C₄), 52.8 (C₂₅), 50.8 (C₃₁), 40.6 (C₂₆, C₃₂), 39.4 (q, J= 44.0 Hz, C₂), 36.6 (C₅), 30.7 (C₂₁), 28.1 (C₃₈, C₃₉, C₄₀), 24.2 (C₂₇, C₃₃), 23.0 (C₂₈, C₂₉), 21.7 (C₃₄, C₃₅), 19.2 (C₂₂), 17.8 (C₂₃); ¹⁹F (DMSO-*d*₆, 188 MHz) δ -71.60 (t, J= 8.8 Hz); IR (cm⁻¹): 3344 (N-H), 2959 (C-H), 1676 (C=O), 1644 (C=C), 1541 (N-H); ESI⁻ MS *m/z*: 776.6 [M-H]⁻; **Anal. Calcd** for C₄₀H₅₈F₃N₅O₇ + 2.5 H₂O: C, 58.37; H, 7.73; N, 8.51; found C, 58.21; H, 7.12; N, 8.44.

4-[[[(1S)-1-[[[(1S)-1-[[[(1S)-1-[[[(1S)-1-[(4-benzyloxyphenyl)methyl]-2-oxo-2-(2,2,2-trifluoroethylamino)ethyl]carbonyl]-2-methyl-propyl]carbonyl]-3-methyl-butyl]carbonyl]-3-methyl-butyl]amino]-4-oxo-butanoic acid **141**



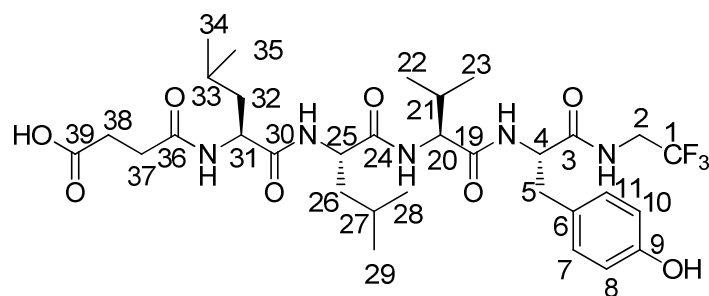
$C_{39}H_{54}F_3N_5O_8$

MW = 777.87 g/mol

A solution of **140** (438 mg, 0.56 mmol, 1 eq) in HCl 4M in dioxane (10 ml) was stirred for 2 h at room temperature. The solvent was evaporated under vacuum to afford free amine as an hydrochloride salt in quantitative yield as a yellow oil, which was used without further purification. 1H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 8.66 (m, 1H, NH), 8.23 (sl, 3H, NH₃), 8.11 (m, 1H, NH), 7.95 (d, 1H, J = 7.8 Hz, NH), 7.44-7.29 (m, 5H), 7.13 (d, 2H, J = 8.6 Hz), 6.87 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 5.04 (s, 2H), 4.50 (m, 1H), 4.40 (m, 1H), 4.14 (m, 1H), 3.90 (m, 1H), 3.80 (m, 2H), 2.90 (dd, 1H, J = 14.0 and 5.3 Hz), 2.78 (dd, 1H, J = 13.7 and 8.8 Hz), 1.95 (m, 1H), 1.60 (m, 2H), 1.49 (m, 2H), 1.40 (m, 2H), 0.85 (m, 6H), 0.82 (m, 6H), 0.75 (m, 6H); ^{13}C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ 177.0, 176.4, 175.8, 173.8, 162.2, 142.4, 135.3, 134.7, 133.6, 133.0, 131.7, 124.6 (q, J = 278.3 Hz), 119.6, 74.3, 62.8, 59.2, 56.4, 55.9, 45.6, 44.4 (q, J = 44.0 Hz), 41.0, 35.9 (C₂₁), 29.2, 28.7, 28.3, 27.8, 27.4, 27.0, 24.2, 23.0; ^{19}F (DMSO-*d*₆, 188 MHz) δ -71.03 (t, J = 8.7 Hz); ESI⁺ MS *m/z*: 678 [M+H]⁺. To a solution of the free amine (300 mg, 0.42 mmol, 1.0 eq) in dry DMF (10 ml) was added anhydride succinic (46 mg, 0.46 mmol, 1.1 eq) and then DIPEA (109 mg, 0.84 mmol, 2 eq). The mixture was stirred at room temperature overnight. The solution was brought at pH5 using 10% of aqueous solution of citric acid. The precipitate formed was filtered and washed with Et₂O (20 ml) to give X (279 mg, 0.36 mmol, 85%) as a white solid. **m.p.:** 250°-252°C; 1H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 11.88 (bs, 1H, COOH), 8.55 (t, 1H, J = 6.1 Hz, NH-C₂), 7.95 (d, 1H, J = 7.9 Hz, NH-C₂₅), 7.49 (d, 1H, J = 8.8 Hz, NH-C₂₀), 7.48-7.30 (m, 5H, H₁₄, H₁₅, H₁₆, H₁₇, H₁₈), 7.13 (d, 2H, J = 8.4 Hz, H₇, H₁₁), 6.88 (d, 2H, J = 8.4 Hz, H₈, H₁₀), 5.04 (s, 2H, H₁₂), 4.50 (dd, 1H, J = 13.9 and 8.3 Hz, H₄), 4.27 (m, 2H, H₂₅, H₃₁), 4.11 (dd, 1H, J = 8.3 and 7.0 Hz, H₂₀), 3.87 (m, 2H, H₂), 2.88 (m, 1H, H_{5a}), 2.74 (m, 1H, H_{5b}), 2.41 (m, 2H, H₃₈), 2.37 (m, 2H, H₃₇), 1.91 (m, 1H, H₂₁), 1.58 (m, 2H, H₂₇, H₃₃), 1.44 (m, 4H, H₂₆, H₃₂), 0.86 (m, 6H, H₂₈, H₂₉), 0.81 (m, 6H, H₃₄, H₃₅), 0.73 (m, 6H, H₂₂, H₂₃);

^{13}C NMR (DMSO-*d*6, 100 MHz) δ 173.8 (C₃₉), 172.2 (C₃₀), 171.8 (C₃), 171.8 (C₂₄), 171.1 (C₃₆), 170.5 (C₁₉), 157.0 (C₉), 137.2 (C₁₃), 130.0 (C₇, C₁₁), 129.4 (C₆), 128.4 (C₁₅, C₁₇), 127.7 (C₁₆), 127.6 (C₁₄, C₁₈), 124.6 (q, J= 280.0 Hz, C₁), 114.4 (C₈, C₁₀), 69.1 (C₁₂), 57.4 (C₂₀), 53.9 (C₄), 51.1 (C₂₅, C₃₁), 40.1 (C₂₆, C₃₂), 39.4 (q, J= 44.0 Hz, C₂), 36.6 (C₅), 30.6 (C₂₁), 29.9 (C₃₈), 29.2 (C₃₇), 24.8 (C₂₇, C₃₃), 23.0 (C₂₈, C₂₉), 21.6 (C₃₄, C₃₅), 19.0 (C₂₂), 17.8 (C₂₃); ^{19}F (DMSO-*d*6, 188 MHz) δ -71.35 (t, J= 8.8 Hz); IR (cm⁻¹): 3310 (C-H aromatic), 2960 (C-H), 1678 (C=O), 1626 (C=C), 1543 (N-H); ESI⁺ MS *m/z*: 800 [M+Na⁺]; Anal. Calcd for C₃₉H₅₄F₃N₅O₈ + 1.5 H₂O: C, 58.12; H, 7.15; N, 8.70; found C, 58.12; H, 6.96; N, 9.24

4-[[[(1S)-1-[[[(1S)-1-[[[(1S)-1-[[[(1S)-1-[(4-hydroxyphenyl)methyl]-2-oxo-2-(2,2,2-trifluoroethylamino)ethyl]carbamoyl]-2-methyl-propyl]carbamoyl]-3-methyl-butyl]carbamoyl]-3-methyl-butyl]amino]-4-oxo-butanoic acid 142



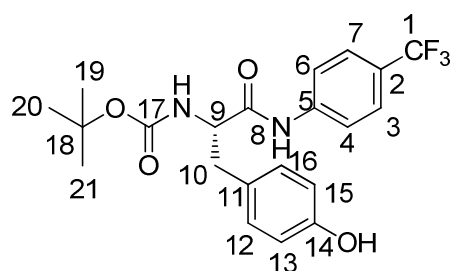
C₃₂H₄₈F₃N₅O₈

MW= 687.75 g/mol

To a solution of **141** (140 mg, 0.18 mmol, 1 eq) in acetic acid 100% (10 ml) was added palladium on activated charcoal 10% (14 mg, 10% m/m). The mixture was stirred overnight under hydrogen atmosphere at RT. The catalyst was filtered on a celite pad and the solvent was evaporated under vacuum to afford **142** as a brown foam (88 mg, 0.13 mmol, 71%); ^1H NMR (MeOD, 300 MHz) δ 7.06 (d, 2H, J= 8.4 Hz, H₇, H₁₁), 6.88 (d, 2H, J= 8.4 Hz, H₈, H₁₀), 4.57 (m, 1H, H₄), 4.25 (m, 2H, H₂₅, H₃₁), 3.95 (m, 1H, H₂₀), 3.86 (m, 2H, H₂), 2.86 (m, 1H, H_{5a}), 2.73 (m, 1H, H_{5b}), 2.50 (m, 2H, H₃₈), 2.48 (m, 2H, H₃₇), 1.81 (m, 1H, H₂₁), 1.51 (m, 2H, H₂₇, H₃₃), 1.42 (m, 4H, H₂₆, H₃₂), 0.96 (m, 6H, H₂₈, H₂₉), 0.86 (m, 6H, H₃₄, H₃₅), 0.70 (m, 6H, H₂₂, H₂₃); ^{13}C NMR (MeOD, 75 MHz) δ 174.4 (C₃₉), 172.6 (C₃₀), 172.0 (C₃), 172.0 (C₂₄), 171.8 (C₃₆), 171.0 (C₁₉), 157.4 (C₉), 137.8 (C₁₃), 131.3 (C₇, C₁₁), 129.0 (C₆), 123.6 (q, J= 280.0 Hz, C₁), 116.2 (C₈, C₁₀), 61.8 (C₂₀), 56.9 (C₄), 54.9 (C₂₅, C₃₁), 41.4 (C₂₆, C₃₂), 40.4 (q, J= 44.0 Hz, C₂), 37.8 (C₅), 31.5 (C₂₁), 26.1 (C₃₈), 26.0 (C₃₇), 23.5 (C₂₇, C₃₃), 23.0 (C₂₈, C₂₉), 21.7 (C₃₄, C₃₅), 19.5 (C₂₂), 19.4 (C₂₃); ^{19}F (MeOD, 188 MHz) δ -73.96 (t, J= 8.8 Hz); IR (cm⁻¹

¹): 2973 (C-H), 1678 (C=O), 1628 (C=C), 1543 (N-H); **ESI MS** *m/z*: 686 [M-H⁻]; **Anal.** Calcd for C₃₂H₄₈F₃N₅O₈ + 5 H₂O: C, 49.41; H, 7.53; N, 9.01; found C, 48.67; H, 7.00; N, 8.24

tert-butyl N-[(1*S*)-1-[(4-hydroxyphenyl)methyl]-2-oxo-2-[4-(trifluoromethyl) anilino] ethyl]carbamate **145**

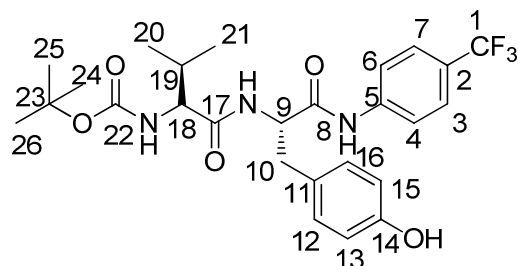


C₂₁H₂₃F₃N₂O₄

MW= 424.41 g/mol

To a solution of Boc-Tyr-OH (4 g, 14.2 mmol, 1 eq) in dry DMF (50 ml) was added 4-(trifluoromethyl)aniline (2.75 g, 17.06 mmol, 1.2 eq), EDCI (3.27 g, 17.06 mmol, 1.2 eq) and HOBt (2.30 g, 17.06 mmol, 1.2 eq) in this order. The mixture was stirred overnight at room temperature under argon atmosphere. The solvent was evaporated under vacuum and the residue obtained was dissolved in EtOAc (40 ml). The organic layer was washed with 10% aqueous solution of citric acid (2 x 30 ml), water (30 ml), 10% aqueous solution of K₂CO₃ (2 x 30 ml) and brine (30 ml), dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated. The crude product was purified by column chromatography (DCM/ether: 9/1) to give the compound **145** (2.53 g, 6.10 mmol, 43%) as a white solid. **m.p.** 196°-198°C; **Rf:** 0.4 (SiO₂, DCM/Et₂O: 9/1); **¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz)** δ 10.36 (s, 1H, NH-C₈), 9.16 (s, 1H, OH), 7.79 (d, 2H, J= 8.5 Hz, H₃, H₇), 7.67 (d, 2H, J= 8.5 Hz, H₄, H₆), 7.09 (d, 2H, J= 8.6 Hz, H₁₂, H₁₆), 6.67 (d, 2H, J= 8.6 Hz, H₁₃, H₁₅), 4.26 (m, 1H, H₉), 2.86 (m, 1H, H_{10a}), 2.73 (m, 1H, H_{10b}), 1.35 (s, 9H, H₁₉, H₂₀, H₂₁); **¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz)** δ 171.6 (C₈), 155.8 (C₁₇), 155.4 (C₁₄), 142.5 (C₅), 130.1 (C₁₂, C₁₆), 127.7 (C₁₁), 126.0 (C₃, C₇), 125.5 (C₂), 123.4 (q, J= 274.8 Hz, C₁), 119.1 (C₄, C₆), 114.8 (C₁₃, C₁₅), 78.1 (C₁₈), 57.0 (C₉), 36.5 (C₁₀), 28.1 (C₁₉, C₂₀, C₂₁); **¹⁹F (DMSO-*d*₆, 188 MHz)** δ -60.71 (s); **IR (cm⁻¹):** 2987 (C-H), 1669 (C=O), 1601 (C=C), 1516 (N-H), 1448 (C-H); **ESI⁺ MS** *m/z*: 447 [M+Na]⁺; **Anal.** Calcd for C₂₁H₂₃F₃N₂O₅: C, 59.43; H, 5.46; N, 6.60; found C, 59.41; H, 5.56; N, 6.59

tert-butyl N-[(1S)-1-[(1S)-1-[(4-hydroxyphenyl)methyl]-2-oxo-2-[4-(trifluoromethyl)anilino]ethyl]carbamoyl]-2-methyl-propyl]carbamate **146**



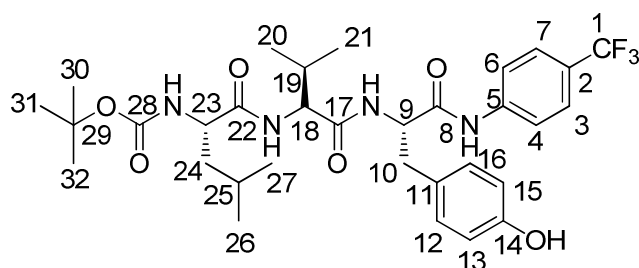
$C_{26}H_{32}F_3N_3O_5$

MW= 523.54 g/mol

A solution of **145** (2.53 g, 6.10 mmol, 1 eq) in HCl 4M in dioxane (20 ml) was stirred for 2 h at room temperature. The solvent was evaporated under vacuum to afford free amine in quantitative yield as a yellow oil, which was used without further purification. **1H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz)** δ 11.21 (s, 1H, NH), 9.40 (s, 1H, OH), 8.41 (s, 3H, NH₃) 7.83 (d, 2H, J= 8.5 Hz), 7.66 (d, 2H, J= 8.5 Hz), 7.10 (d, 2H, J= 8.6 Hz), 6.69 (d, 2H, J= 8.6 Hz), 4.35 (m, 1H, H₉), 3.10 (m, 1H, H_{10a}), 3.04 (m, 1H, H_{10b}); **^{13}C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz)** δ 167.6, 156.6, 141.7, 130.5, 127.8, 126.1, 124.5, 123.8 (q, J= 274.8 Hz), 119.4, 115.3, 54.5, 36.0; **^{19}F (DMSO-*d*₆, 188 MHz)** δ -60.82 (s); **ESI⁺ MS *m/z***: 325 [M+H]⁺; To a solution of obtained amine (6.10 mmol, 1 eq) in dry DMF (30 ml) was added Boc-Val-OH (1.6 g, 7.32 mmol, 1.2 eq), DIPEA (3.15 g, 24.4 mmol, 4 eq), EDCI (1.4 g, 7.32 mmol, 1.2 eq) and HOBT (990 mg, 7.32 mmol, 1.2 eq) in this order. The mixture was stirred overnight at room temperature under argon atmosphere. The solvent was evaporated under vacuum and the residue obtained was dissolved in EtOAc (30 ml). The organic layer was washed with 10% aqueous solution of citric acid (2 x 30 ml), water (30 ml), 10% aqueous solution of K₂CO₃ (2 x 30 ml) and brine (30 ml), dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated. The crude product was purified by column chromatography (DCM/Et₂O: 8/2) to give the compound **146** (1.72 g, 3.3 mmol, 54%) as white foam. **Rf: 0.25** (SiO₂, DCM/Et₂O: 9/1); **1H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz)** δ 10.36 (s, 1H, NH-C₈), 9.14 (s, 1H, OH), 8.06 (d, 1H, J= 7.9 Hz, NH-C₉), 7.76 (d, 2H, J= 8.5 Hz, H₃, H₇), 7.66 (d, 2H, J= 8.5 Hz, H₄, H₆), 7.05 (d, 2H, J= 8.6 Hz, H₁₂, H₁₆), 6.67 (d, 1H, J= 9.0 Hz, NH-C₁₈), 6.62 (d, 2H, J= 8.6 Hz, H₁₃, H₁₅), 4.63 (dd, 1H, J= 13.7 and 7.8 Hz, H₉), 3.78 (t, 1H, J= 7.9 Hz, H₁₈), 2.93 (m, 1H, H_{10a}), 2.81 (m, 1H, H_{10b}), 1.87 (m, 1H, H₁₉), 1.37 (s, 9H, H₂₄, H₂₅, H₂₆), 0.76 (m, 3H, H₂₀), 0.74 (m, 3H, H₂₁); **^{13}C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz)** δ 171.3 (C₁₇), 170.7 (C₈), 155.9 (C₂₂), 155.4 (C₁₄), 142.3 (C₅), 130.1 (C₁₂, C₁₆), 127.2 (C₁₁), 126.0 (C₃, C₇), 125.7 (C₂), 123.1 (q, J= 274.8 Hz, C₁), 119.2 (C₄, C₆), 114.9 (C₁₃, C₁₅), 78.1

(C₂₃), 59.9 (C₁₈), 55.0 (C₉), 36.9 (C₁₀), 30.5 (C₁₉), 28.1 (C₂₄, C₂₅, C₂₆), 19.0 (C₂₀), 18.1 (C₂₁); ¹⁹F (DMSO-*d*₆, 188 MHz) δ -60.75 (s); IR (cm⁻¹): 3300 (N-H), 2959 (C-H), 1647 (C=O), 1609 (C=C), 1515 (N-H); MS (ESI⁺) m/z: 546 [M+Na⁺]; Anal. Calcd for C₂₆H₃₂F₃N₃O₅: C, 59.65; H, 6.16; N, 8.03; found C, 59.31; H, 6.38; N, 7.81

tert-butyl N-[(1*S*)-1-[[[(1*S*)-1-[[[(1*S*)-1-[(4-hydroxyphenyl)methyl]-2-oxo-2-[4-(trifluoromethyl)anilino]ethyl]carbamoyl]-2-methyl-propyl]carbamoyl]-3-methyl-butyl]carbamate **147**



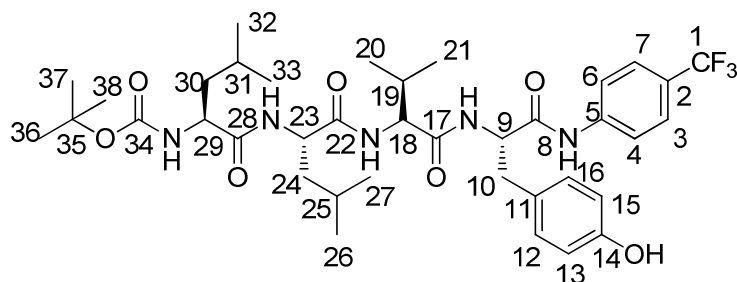
C₃₂H₄₃F₃N₄O₆

MW= 636.70 g/mol

A solution of **146** (1.62 g, 3.05 mmol, 1 eq) in HCl 4M in dioxane (15 ml) was stirred for 2 h at room temperature. The solvent was evaporated under vacuum to afford free amine as an hydrochloride salt in quantitative yield as a yellow oil, which was used without further purification. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 10.68 (s, 1H, NH), 9.27 (s, 1H, OH), 8.81 (d, 1H, J= 7.9 Hz), 7.82 (d, 2H, J= 8.5 Hz), 7.67 (d, 2H, J= 8.5 Hz), 7.14 (d, 2H, J= 8.6 Hz), 6.66 (d, 2H, J= 8.6 Hz), 4.65 (m, 1H), 3.65 (m, 1H), 2.96 (m, 1H), 2.89 (m, 1H), 2.15 (m, 1H), 0.94 (m, 3H), 0.91 (m, 3H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ 170.3, 168.0, 156.0, 142.3, 130.1, 127.0, 126.0, 125.7, 123.1 (q, J= 274.8 Hz), 119.2, 115.0, 57.0, 55.6, 36.6, 29.8, 18.3, 17.4; ¹⁹F (DMSO-*d*₆, 188 MHz) δ -60.73 (s); ESI⁺ MS m/z: 424 [M+H]⁺. To a solution of **amine** (3.05 mmol, 1 eq) in dry DMF (20 ml) was added Boc-Leu-OH (849 mg, 3.67 mmol, 1.2 eq), DIPEA (1.6 g, 12.2 mmol, 4 eq), EDCI (703 mg, 3.67 mmol, 1.2 eq) and HOBt (496 mg, 3.67 mmol, 1.2 eq) in this order. The mixture was stirred overnight at room temperature under argon atmosphere. The solvent was evaporated under vacuum and the residue obtained was dissolved in EtOAc (20 ml). The organic layer was washed successively with 10% aqueous solution of citric acid (2 x 20 ml), water (20 ml), 10% aqueous solution of K₂CO₃ (2 x 20 ml) and brine (20 ml), dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated. The crude product was purified by column chromatography (DCM/ether: 7/3) to give the compound **147** (1.40 g, 2.2 mmol, 72%) as a white solid. m.p. 152°-154°C; Rf: 0.3 (S₁O₂, DCM/Et₂O: 7/3); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.24 (s, 1H, NH-C₈), 9.09 (s, 1H, OH), 8.18 (d, 1H, J= 6.8 Hz,

NH-C₉), 7.75 (d, 2H, J= 8.7 Hz, H₃, H₇), 7.64 (d, 2H, J= 8.7 Hz, H₄, H₆), 7.47 (d, 1H, J= 8.6 Hz, NH-C₁₈), 7.03 (d, 2H, J= 8.4 Hz, H₁₂, H₁₆), 6.98 (d, 1H, J= 7.7 Hz, NH-C₂₃), 6.63 (d, 2H, J= 8.4 Hz, H₁₃, H₁₅), 4.59 (m, 1H, H₉), 4.23 (m, 1H, H₁₈), 3.97 (m, 1H, H₂₃), 2.94 (dd, 1H, J= 14.0 and 6.3 Hz, H_{10a}), 2.82 (dd, 1H, J= 14.0 and 8.2 Hz, H_{10b}), 1.93 (m, 1H, H₁₉), 1.57 (m, 1H, H₂₅), 1.41 (m, 2H, H₂₄), 1.37 (s, 9H, H₃₀, H₃₁, H₃₂), 0.84 (m, 6H, H₂₆, H₂₇), 0.82 (m, 3H, H₂₀), 0.79 (m, 3H, H₂₁); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 172.1 (C₂₂), 170.8 (C₁₇), 170.4 (C₈), 155.8 (C₁₄), 155.2 (C₂₈), 142.3 (C₅), 129.8 (C₁₂, C₁₆), 127.0 (C₁₁), 125.8 (C₃, C₇), 125.7 (C₂), 123.3 (q, J= 274.8 Hz, C₁), 119.1 (C₄, C₆), 114.9 (C₁₃, C₁₅), 78.0 (C₂₉), 57.0 (C₁₈), 55.1 (C₉), 52.9 (C₂₃), 40.2 (C₂₄), 36.5 (C₁₀), 30.9 (C₁₉), 28.1 (C₃₀, C₃₁, C₃₂), 24.2 (C₂₅), 22.8 (C₂₆), 21.5 (C₂₇), 19.0 (C₂₀), 17.7 (C₂₁); ¹⁹F (DMSO-*d*₆, 188 MHz) δ -60.74 (s); IR (cm⁻¹): 3381 (N-H), 2959 (C-H), 1678 (C=O), 1643 (C=C), 1515 (N-H); ESI⁺ MS *m/z*: 659 [M+Na]⁺; Anal. Calcd for C₃₂H₄₃F₃N₄O₆ + 0.15 H₂O: C, 60.11; H, 6.84; N, 8.76; found C, 59.78; H, 7.06; N, 8.54

tert-butyl N-[(1S)-1-[[[(1S)-1-[[[(1S)-1-[[[(1S)-1-[(4-hydroxyphenyl)methyl]-2-oxo-2-[4-(trifluoromethyl)anilino]ethyl]carbamoyl]-2-methyl-propyl]carbamoyl]-3-methyl-butyl]carbamoyl]-3-methyl-butyl]carbamate 148



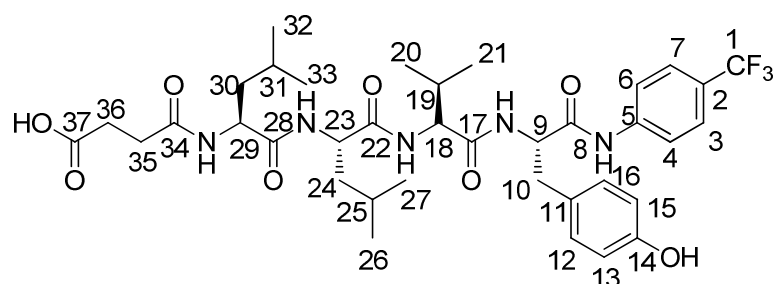
C₃₈H₅₄F₃N₅O₇

MW= 749.86 g/mol

A solution of **147** (1.38 g, 2.16 mmol, 1 eq) in HCl 4M in dioxane (15 ml) was stirred for 2 h at room temperature. The solvent was evaporated under vacuum to afford free amine as an hydrochlorite salt in quantitative yield as a yellow oil, which was used without further purification. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 10.52 (s, 1H, NH), 9.19 (s, 1H, OH), 8.48 (d, 1H, J= 6.8 Hz, NH), 8.41 (d, 1H, J= 8.6 Hz, NH), 8.21 (bs, 3H, NH₃), 7.83 (d, 2H, J= 8.7 Hz), 7.65 (d, 2H, J= 8.7 Hz), 7.06 (d, 2H, J= 8.4 Hz), 6.63 (d, 2H, J= 8.4 Hz), 4.60 (m, 1H), 4.25 (m, 1H), 3.86 (m, 1H), 2.51 (m, 1H), 2.49 (m, 1H), 1.98 (m, 1H), 1.57 (m, 1H), 1.37 (m, 2H), 0.85 (m, 6H), 0.83 (m, 3H), 0.81 (m, 3H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ 170.7,

170.4, 168.7, 155.9, 142.4, 129.9, 127.1, 126.0, 125.7, 123.0 (q, J= 274.8 Hz), 119.0, 114.8, 57.8, 55.3, 50.7, 40.3, 36.5, 30.8, 23.4, 22.5, 22.0, 19.0, 18.3; ¹⁹F (DMSO-*d*6, 188 MHz) δ -60.71 (s); **ESI⁺ MS** *m/z*: 537 [M+H]⁺. To a solution of **free amine** (2.17 mmol, 1 eq) in dry DMF (20 ml) was added Boc-Leu-OH (601 mg, 2.60 mmol, 1.2 eq), DIPEA (1.12 g, 8.68 mmol, 4 eq), EDCI (498 mg, 2.60 mmol, 1.2 eq) and HOBt (351 mg, 2.60 mmol, 1.2 eq) in this order. The mixture was stirred overnight at room temperature under argon atmosphere. The solvent was evaporated under vacuum and the residue obtained was dissolved in EtOAc (20 ml). The organic layer was washed successively with 10% aqueous solution of citric acid (2 x 20 ml), water (20 ml), 10% aqueous solution of K₂CO₃ (2 x 20 ml) and brine (20 ml), dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated. The crude product was purified by column chromatography (DCM/ether: 1/1) to give the compound **148** (1.17 g, 1.6 mmol, 74%) as white foam. **Rf**: 0.5 (SiO₂, DCM/Et₂O: 1/1); ¹H NMR (DMSO-*d*6, 400 MHz) δ 10.28 (s, 1H, NH-C₈), 9.14 (s, 1H, OH), 8.15 (d, 1H, J= 6.8 Hz, NH-C₉), 7.83 (d, 1H, J= 8.6 Hz, NH-C₁₈), 7.75 (d, 2H, J= 8.7 Hz, H₃, H₇), 7.64 (d, 2H, J= 8.7 Hz, H₄, H₆), 7.63 (m, 1H, NH-C₂₃), 7.03 (d, 2H, J= 8.4 Hz, H₁₂, H₁₆), 6.91 (d, 1H, J= 7.7 Hz, NH-C₂₉), 6.62 (d, 2H, J= 8.4 Hz, H₁₃, H₁₅), 4.58 (m, 1H, H₉), 4.37 (m, 1H, H₂₃), 4.17 (m, 1H, H₁₈), 3.95 (m, 1H, H₂₉), 2.93 (dd, 1H, J= 14.0 and 6.3 Hz, H_{10a}), 2.81 (dd, 1H, J= 14.0 and 8.2 Hz, H_{10b}), 1.93 (m, 1H, H₁₉), 1.58 (m, 2H, H₂₅, H₃₁), 1.41 (m, 2H, H₂₄), 1.37 (s, 9H, H₃₆, H₃₇, H₃₈), 1.36 (m, 2H, H₃₀), 0.85 (m, 6H, H₃₂, H₃₃), 0.84 (m, 6H, H₂₆, H₂₇), 0.82 (m, 3H, H₂₀), 0.79 (m, 3H, H₂₁); ¹³C NMR (DMSO-*d*6, 100 MHz) δ 172.4 (C₂₈), 171.7 (C₁₇), 170.8 (C₂₂), 170.6 (C₈), 155.8 (C₁₄), 155.2 (C₃₄), 142.3 (C₅), 129.9 (C₁₂, C₁₆), 127.1 (C₁₁), 126.0 (C₃, C₇), 125.7 (C₂), 123.3 (q, J= 274.8 Hz, C₁), 119.1 (C₄, C₆), 114.9 (C₁₃, C₁₅), 78.0 (C₂₉), 57.4 (C₁₈), 55.2 (C₉), 52.8 (C₂₉), 50.7 (C₂₃), 40.1 (C₂₄, C₃₀), 36.6 (C₁₀), 30.9 (C₁₉), 28.1 (C₃₆, C₃₇, C₃₈), 24.2 (C₃₁), 23.9 (C₂₅), 23.1 (C₃₂), 22.7 (C₃₃), 21.6 (C₂₆, C₂₇), 19.0 (C₂₀), 17.8 (C₂₁); ¹⁹F (DMSO-*d*6, 188 MHz) δ -60.74 (s); **IR** (cm⁻¹): 3308 (N-H), 2959 (C-H), 1678 (C=O), 1635 (C=C), 1515 (N-H); **ESI⁺ MS** *m/z*: 772.5 [M+Na⁺]; **Anal.** Calcd for C₃₈H₅₄F₃N₅O₇: C, 60.87; H, 7.26; N, 9.34; found C, 60.62; H, 7.35; N, 9.04

4-[[[(1S)-1-[[[(1S)-1-[[[(1S)-1-[[[(1S)-1-[(4-hydroxyphenyl)methyl]-2-oxo-2-[4-(trifluoromethyl)anilino]ethyl]carbamoyl]-2-methyl-propyl]carbamoyl]-3-methyl-butyl]carbamoyl]-3-methyl-butyl]amino]-4-oxo-butanoic acid **149**



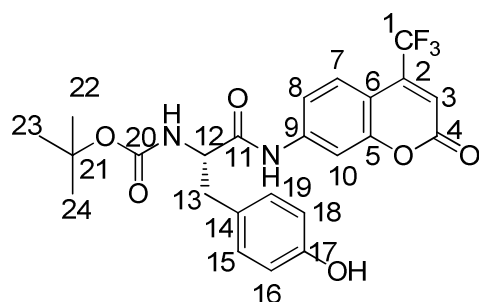
$C_{37}H_{50}F_3N_5O_8$

MW= 749.82 g/mol

A solution of **148** (738 mg, 0.98 mmol, 1 eq) in HCl 4M in dioxane (15 ml) was stirred for 2 h at room temperature. The solvent was evaporated under vacuum to afford free amine as an hydrochloride salt in quantitative yield as a yellow oil, which was used without further purification. 1H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 10.49 (s, 1H, NH), 9.20 (s, 1H, OH), 8.61 (d, 1H, J= 6.8 Hz, NH), 8.21 (bs, 3H, NH₃), 8.20 (m, 1H, NH), 7.96 (d, 1H, J= 7.7 Hz, NH), 7.76 (d, 2H, J= 8.7 Hz), 7.65 (d, 2H, J= 8.7 Hz), 7.03 (d, 2H, J= 8.4 Hz), 6.63 (d, 2H, J= 8.4 Hz), 4.60 (m, 1H), 4.45 (m, 1H), 4.14 (m, 1H), 3.78 (m, 1H), 2.93 (dd, 1H, J= 14.0 and 6.3 Hz), 2.78 (dd, 1H, J= 14.0 and 8.2 Hz), 1.95 (m, 1H), 1.56 (m, 2H), 1.42 (m, 2H), 1.23 (m, 2H), 0.85 (m, 6H), 0.84 (m, 6H), 0.76 (m, 6H); ^{13}C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ 171.1, 170.7, 170.6, 168.6, 155.9, 142.4, 129.9, 127.1, 125.9, 125.7, 123.4 (q, J= 274.8 Hz), 119.0, 114.9, 57.7, 55.3, 51.2, 50.7, 40.1, 36.6, 30.6, 24.0, 23.4, 23.0, 22.5, 22.1, 19.0, 18.0; ^{19}F (DMSO-*d*₆, 188 MHz) δ -60.72 (s); ESI MS *m/z*: 684 [M-H]⁻. To a solution of free amine (650 mg, 0.95 mmol, 1.0 eq) in dry DMF (20 ml) was added anhydride succinic (105 mg, 1.04 mmol, 1.1 eq) and DIPEA (244 mg, 0.84 mmol, 2 eq). The mixture was stirred at room temperature overnight. The solution was brought at pH5 using 10% of aqueous solution of citric acid. The solvent was evaporated and the residue was crystallized in MeOH/Et₂O to give **149** (500 mg, 0.67 mmol, 70%) as white solid. **m.p.:** 206°-208°C; **Rf:** 0.3 (S_iO₂, EtOAc/MeOH/AcOH: 8/2/1); 1H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.42 (bs, 1H, COOH), 10.31 (s, 1H, NH-C₈), 9.18 (s, 1H, OH), 8.14 (d, 1H, J= 6.8 Hz, NH-C₉), 8.04 (d, 1H, J= 6.9 Hz, NH-C₂₉), 7.94 (d, 1H, J= 8.6 Hz, NH-C₂₃), 7.78 (d, 2H, J= 8.7 Hz, H₃, H₇), 7.65 (d, 2H, J= 8.7 Hz, H₄, H₆), 7.57 (m, 1H, NH-C₁₈), 7.04 (d, 2H, J= 8.4 Hz, H₁₂, H₁₆), 6.62 (d, 2H, J= 8.4 Hz, H₁₃, H₁₅), 4.58 (m, 1H, H₉), 4.28 (m, 2H, H₂₉, H₂₃), 4.15 (m, 1H, H₁₈), 2.95 (dd, 1H, J= 14.0 and 6.3 Hz, H_{10a}), 2.82 (dd, 1H, J= 14.0 and 8.2 Hz, H_{10b}), 2.42 (m, 2H, H₃₆), 2.37 (m, 2H, H₃₅), 1.94 (m, 1H, H₁₉), 1.58 (m, 2H, H₂₅, H₃₁), 1.46 (m, 2H, H₂₄), 1.44 (m, 2H, H₃₀), 0.86 (m, 6H, H₃₂, H₃₃),

0.81 (m, 6H, H₂₆, H₂₇), 0.78 (m, 3H, H₂₀), 0.77 (m, 3H, H₂₁); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 173.8 (C₃₇), 172.8 (C₂₈), 171.8 (C₂₂), 171.1 (C₃₄), 170.7 (C₈), 170.6 (C₁₇), 155.9 (C₁₄), 142.4 (C₅), 129.9 (C₁₂, C₁₆), 127.1 (C₁₁), 126.0 (C₃, C₇), 125.9 (C₂), 123.3 (q, J= 274.8 Hz, C₁), 119.1 (C₄, C₆), 114.9 (C₁₃, C₁₅), 57.5 (C₁₈), 55.3 (C₉), 53.0 (C₂₉), 51.1 (C₂₃), 40.7 (C₃₀), 40.1 (C₂₄), 36.6 (C₁₀), 30.6 (C₁₉), 29.9 (C₃₅), 29.2 (C₃₆), 24.2 (C₃₁, C₂₅), 23.0 (C₃₂, C₃₃), 21.6 (C₂₆, C₂₇), 19.0 (C₂₀), 17.9 (C₂₁); ¹⁹F (DMSO-*d*₆, 188 MHz) δ -60.73 (s); IR (cm⁻¹): 3650 (OH), 2972 (C-H), 1678 (C=O), 1628 (C=C), 1516 (N-H), 1408 (O-H); ESI MS *m/z*: 748 [M-H]⁻; Anal. Calcd for C₃₇H₅₀F₃N₅O₈ + 1.5 H₂O: C, 57.20; H, 6.89; N, 9.02; found C, 57.43; H, 7.31; N, 9.34

tert-butyl N-[(1*S*)-1-[(4-hydroxyphenyl)methyl]-2-oxo-2-[[2-oxo-4-(trifluoromethyl)chromen-7-yl]amino]ethyl]carbamate **151**



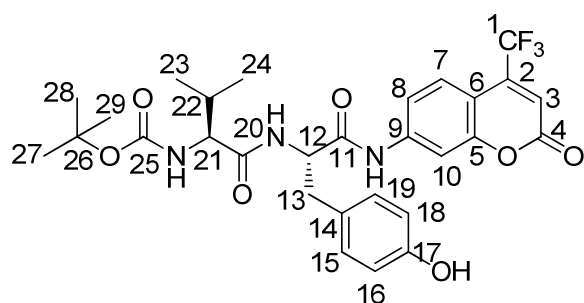
C₂₄H₂₃F₃N₂O₆

MW= 492.44 g/mol

To a solution of 7-amino-4-(trifluoromethyl)coumarin **150** (2 g, 8.73 mmol, 1 eq) and Boc-Tyr-OH (2.45 g, 8.73 mmol, 1 eq), in dry pyridine (60 ml) was added phosphoryl chloride (814 μl, 8.73 mmol, 1 eq) at -15°C, and the solution was stirred at -15°C for 15 min. the solution was poured into water and the solution was extracted with EtOAc. The EtOAc layer was separated, washed with saturated aqueous NaHCO₃, 10% aqueous citric acid, brine, and dried over Na₂SO₄. Filtration, concentration in vacuo and purification by silica gel flash column chromatography (DCM/Et₂O: 8/2) gave **151** (2.0 g, 4.06 mmol, 46%) as a white solid. **m.p.:** 224-226°C; **Rf:** 0.4 (SiO₂, DCM/Et₂O: 8/2); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.58 (s, 1H, NH-C₁₁), 9.17 (s, 1H, OH), 7.90 (d, 1H, J= 2.0 Hz, H₁₀), 7.68 (d, 1H, J= 8.9 Hz, H₇), 7.53 (dd, J= 8.9 and 2.0 Hz, 1H, H₈), 7.15 (d, 1H, J= 7.8 Hz, NH-C₁₂), 7.09 (d, 2H, J= 8.6 Hz, H₁₅, H₁₉), 6.90 (s, 1H, H₃), 6.65 (d, 2H, J= 8.6 Hz, H₁₆, H₁₈), 4.26 (m, 1H, H₁₂), 2.88 (m, 1H, H_{13a}), 2.76 (m, 1H, H_{13b}), 1.34 (s, 9H, H₂₂, H₂₃, H₂₄); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 172.1 (C₁₁), 158.6 (C₄), 155.8 (C₁₇), 154.7 (C₅), 155.4 (C₂₀), 143.1 (C₉), 139.2 (q, J= 31.7 Hz, C₂), 130.1 (C₁₅, C₁₉), 127.5 (C₁₄), 125.4 (C₇), 121.8 (q, J= 274.5 Hz, C₁), 116.1 (C₈), 114.9

(C₁₆, C₁₈), 114.4 (C₃), 108.3 (C₆), 106.3 (C₁₀), 78.2 (C₂₁), 57.1 (C₁₂), 36.4 (C₁₃), 28.1 (C₂₂, C₂₃, C₂₄); ¹⁹F (DMSO-*d*₆, 188 MHz) δ -63.99 (s); IR (cm⁻¹): 3400 (N-H), 2959 (C-H), 1678 (C=O), 1644 (C=C), 1528 (N-H); ESI⁺ MS *m/z*: 515 [M+Na]⁺; Anal. Calcd for C₂₄H₂₃F₃N₂O₆: C, 58.54; H, 4.71; N, 5.69; found C, 58.20; H, 5.14; N, 6.07

tert-butyl N-[(1S)-1-[[[(1S)-1-[(4-hydroxyphenyl)methyl]-2-oxo-2-[[2-oxo-4-(trifluoromethyl)chromen-7-yl]amino]ethyl]carbamoyl]-2-methyl-propyl]carbamate **152**



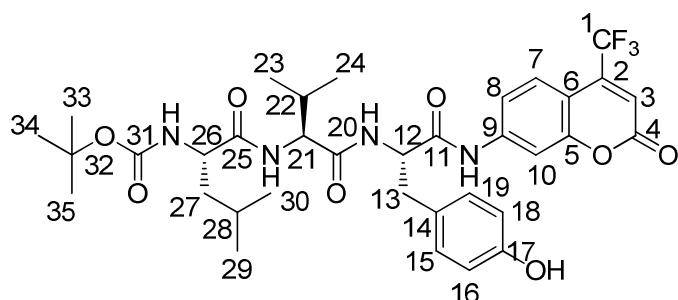
C₂₉H₃₂F₃N₃O₇

MW= 591.58 g/mol

A solution of **151** (1.3 g, 2.64 mmol, 1 eq) in HCl 4M in dioxane (15 ml) was stirred for 2 h at room temperature. The solvent was evaporated in vacuum to afford free amine with quantitative yield as yellow oil, which was used without further purification. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 11.58 (s, 1H, NH), 8.86 (s, 1H, OH), 8.46 (sl, 3H, NH₃), 7.91 (d, J= 2.1 Hz, 1H), 7.70 (d, J= 9.0 Hz, 1H), 7.60 (dd, J= 9.0 and 2.1 Hz), 7.10 (d, 2H, J= 8.6 Hz), 6.93 (s, 1H), 6.68 (d, 2H, J= 8.6 Hz), 4.30 (m, 1H), 3.12 (dd, 1H, J= 13.8 and 6.2 Hz), 3.07 (dd, 1H, J= 13.8 and 7.3 Hz); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ 168.0, 158.5, 156.6, 154.5, 143.2, 139.2 (q, J= 31.7 Hz), 130.5, 126.6, 124.4, 120.2 (q, J= 274.5 Hz), 116.2, 115.3, 114.9, 108.9, 106.6, 54.6, 36.0; ¹⁹F (DMSO-*d*₆, 188 MHz) δ -64.02 (s); ESI⁺ MS *m/z*: 393 [M+H]⁺. To a solution of **amine** (2.64 mmol, 1 eq) in dry DMF (20 ml) was added Boc-Val-OH (642 mg, 2.95 mmol, 1.2 eq), DIPEA (1.36 g, 10.56 mmol, 4 eq), EDCI (566 mg, 2.95 mmol, 1.2 eq) and HOBt (397 mg, 2.95 mmol, 1.2 eq) in this order. The mixture was stirred overnight at room temperature under argon atmosphere. The solvent was evaporated under vacuum and the residue obtained was dissolved in EtOAc (20 ml). The organic layer was washed successively with 10% aqueous solution of citric acid (2 x 20 ml), water (20 ml), 10% aqueous solution of K₂CO₃ (2 x 20 ml) and brine (20 ml), dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated. The crude product was purified by column chromatography (DCM/ether: 7/3) to give the compound **152** (1.0 g, 1.7 mmol, 64%) as white foam. Rf: 0.3 (SiO₂, DCM/Et₂O:

7/3); $^1\text{H NMR}$ (**DMSO-*d*₆**, **400 MHz**) δ 10.51 (s, 1H, NH-C₁₁), 9.16 (s, 1H, OH), 8.12 (d, 1H, J= 7.8 Hz, NH-C₁₂), 7.87 (d, 1H, J= 2.0 Hz, H₁₀), 7.67 (d, 1H, J= 8.7 Hz, H₇), 7.49 (dd, 1H, J= 8.7 and 2.0 Hz, H₈), 7.05 (d, 2H, J= 8.6 Hz, H₁₅, H₁₉), 6.90 (s, 1H, H₃), 6.68 (d, 1H, J= 7.8 Hz, NH-C₂₁), 6.65 (d, 2H, J= 8.6 Hz, H₁₆, H₁₈), 4.65 (m, 1H, H₁₂), 3.79 (m, 1H, H₂₁), 2.94 (m, 1H, H_{13a}), 2.88 (m, 1H, H_{13b}), 1.88 (m, 1H, H₂₂), 1.27 (s, 9H, H₂₇, H₂₈, H₂₉), 0.77 (m, 3H, H₂₃), 0.75 (m, 3H, H₂₄); $^{13}\text{C NMR}$ (**DMSO-*d*₆**, **100 MHz**) δ 171.4 (C₂₀), 171.2 (C₁₁), 158.6 (C₄), 155.9 (C₁₇), 155.4 (C₂₅), 154.6 (C₅), 142.9 (C₉), 139.2 (q, J= 32.3 Hz, C₂), 130.3 (C₁₅, C₁₉), 127.0 (C₁₄), 125.4 (C₇), 121.6 (q, J= 274.5 Hz, C₁), 116.1 (C₈), 114.6 (C₁₆, C₁₈), 114.5 (C₃), 108.3 (C₆), 106.3 (C₁₀), 78.1 (C₂₆), 59.8 (C₂₁), 57.1 (C₁₂), 36.8 (C₁₃), 30.5 (C₂₂), 28.1 (C₂₇, C₂₈, C₂₉), 19.1 (C₂₃), 18.2 (C₂₄); ^{19}F (**DMSO-*d*₆**, **188 MHz**) δ -64.02 (s); **IR** (**cm⁻¹**): 3308 (N-H), 2959 (C-H), 1678 (C=O), 1644 (C=C), 1528 (N-H); **ESI MS** *m/z*: 590 [M-H]⁻; **Anal.** Calcd for C₂₄H₂₃F₃N₂O₆: C, 58.54; H, 4.71; N, 5.69; found C, 58.20; H, 5.14; N, 6.07

tert-butyl N-[(1S)-1-[[[(1S)-1-[[[(1S)-1-(4-hydroxyphenyl)methyl]-2-oxo-2-[[2-oxo-4-(trifluoromethyl)chromen-7-yl]amino]ethyl]carbamoyl]-2-methyl-propyl]carbamoyl]-3-methyl-butyl]carbamate 153



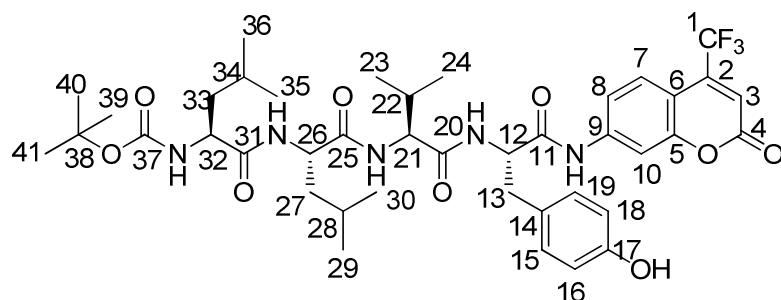
C₃₅H₄₃F₃N₄O₈

MW= 704.73 g/mol

A solution of **152** (965 mg, 1.63 mmol, 1 eq) in HCl 4M in dioxane (15 ml) was stirred for 2 h at room temperature. The solvent was evaporated under vacuum to afford free amine as an hydrochloride salt in quantitative yield as yellow oil, which was used without further purification. $^1\text{H NMR}$ (**DMSO-*d*₆**, **300 MHz**) δ 11.01 (s, 1H, NH-C₁₁), 8.96 (s, 1H, OH), 8.20 (bs, 3H, NH₃), 8.09 (d, 1H, J= 7.8 Hz, NH), 7.90 (d, 1H, J= 2.0 Hz), 7.69 (d, 1H, J= 8.8 Hz), 7.42 (dd, 1H, J= 8.8 and 2.0 Hz), 7.15 (d, 2H, J= 8.4 Hz), 6.89 (s, 1H), 6.65 (d, 2H, J= 8.4 Hz), 4.70 (m, 1H), 3.69 (m, 1H), 3.01 (dd, 1H, J= 13.8 and 6.2 Hz), 2.89 (m, 1H), 2.10 (m, 1H), 0.93 (d, 3H, J= 6.9 Hz), 0.91 (d, 3H, J= 6.9 Hz); $^{13}\text{C NMR}$ (**DMSO-*d*₆**, **75 MHz**) δ 170.8, 168.0, 158.4, 156.0, 154.6, 155.4, 143.0, 139.0 (q, J= 32.3 Hz), 130.1, 127.1, 125.4, 123.4 (q, J= 274.5 Hz), 116.1, 115.0, 114.5, 108.3, 106.3, 57.0, 55.8, 36.7, 29.8, 18.3, 17.4;

¹⁹F (DMSO-*d*₆, 188 MHz) δ -64.01 (s); **MS (ESI-)** m/z: 492 [M+H]⁺. To a solution of **free amine** (1.63 mmol, 1 eq) in dry DMF (20 ml) was added Boc-Leu-OH (453 mg, 1.96 mmol, 1.2 eq), DIPEA (843 mg, 6.52 mmol, 4 eq), EDCI (376 mg, 1.96 mmol, 1.2 eq) and HOBt (265 mg, 1.96 mmol, 1.2 eq) in this order. The mixture was stirred overnight at room temperature under argon atmosphere. The solvent was evaporated under vacuum and the residue obtained was dissolved in EtOAc (20 ml). The organic layer was washed with 10% aqueous solution of citric acid (2 x 20 ml), water (20 ml), 10% aqueous solution of K₂CO₃ (2 x 20 ml) and brine (20 ml), dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated. The crude product was purified by column chromatography (DCM/Et₂O: 6/4) to give the compound **153** (526 g, 0.75 mmol, 46%) as white foam. **Rf: 0.4** (SiO₂, DCM/ether: 6/4); **¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz)** δ 10.55 (s, 1H, NH-C₁₁), 9.16 (s, 1H, OH), 8.31 (d, 1H, J= 7.2 Hz, NH-C₁₂), 7.86 (d, 1H, J= 2.0 Hz, H₁₀), 7.67 (d, 1H, J= 8.7 Hz, H₇), 7.51 (dd, 1H J= 8.7 and 2.0 Hz, H₈), 7.50 (m, 1H, NH-C₂₅), 7.05 (d, 2H, J= 8.2 Hz, H₁₅, H₁₉), 7.03 (m, 1H, NH-C₃₀), 6.89 (s, 1H, H₃), 6.63 (d, 1H, J= 7.8 Hz, NH-C₂₁), 6.65 (d, 2H, J= 8.2 Hz, H₁₆, H₁₈), 4.58 (dd, 1H, J= 14.2 and 7.2 Hz, H₁₂), 4.23 (m, 1H, H₂₁), 3.97 (m, 1H, H₂₆), 2.94 (dd, 1H, J= 14.0 and 6.5 Hz, H_{13a}), 2.83 (dd, 1H, J= 14.0 and 8.2 Hz, H_{13b}), 1.96 (m, 1H, H₂₂), 1.57 (m, 1H, H₂₈), 1.40 (m, 2H, H₂₇), 1.37 (s, 9H, H₃₃, H₃₄, H₃₅), 0.86 (m, 6H, H₂₉, H₃₀), 0.77 (m, 3H, H₂₃), 0.75 (m, 3H, H₂₄); **¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz)** δ 172.7 (C₂₅), 171.5 (C₁₁), 171.4 (C₂₀), 159.1 (C₄), 156.4 (C₁₇), 155.9 (C₃₁), 155.1 (C₅), 143.5 (C₉), 139.6 (q, J= 32.3 Hz, C₂), 130.4 (C₁₅, C₁₉), 127.4 (C₁₄), 125.9 (C₇), 122.2 (q, J= 274.5 Hz, C₁), 116.6 (C₈), 115.4 (C₁₆, C₁₈), 114.9 (C₃), 108.8 (C₆), 106.8 (C₁₀), 78.6 (C₂₆), 57.4 (C₂₁), 55.8 (C₁₂), 53.4 (C₂₆), 40.9 (C₂₇), 37.0 (C₁₃), 31.5 (C₂₂), 28.6 (C₃₃, C₃₄, C₃₅), 24.7 (C₂₈), 23.4 (C₂₉), 22.0 (C₃₀), 19.5 (C₂₃), 18.3 (C₂₄); **¹⁹F (DMSO-*d*₆, 188 MHz)** δ -64.01 (s); **IR (cm⁻¹):** 3320 (N-H), 2972 (C-H), 1678 (C=O), 1645 (C=C), 1516 (N-H), 1407 (OH); **MS (ESI+)** m/z: 727 [M+Na]⁺; **Anal.** Calcd for C₃₅H₄₃F₃N₄O₈ + 0.15 H₂O: C, 59.42; H, 6.18; N, 7.92; found C, 59.03; H, 6.19; N, 7.70

tert-butyl N-[(1S)-1-[[[(1S)-1-[[[(1S)-1-[(4-hydroxyphenyl)methyl]-2-oxo-2-[[2-oxo-4-(trifluoromethyl)chromen-7-yl]amino]ethyl]carbamoyl]-2-methyl-propyl]carbamoyl]-3-methyl-butyl]carbamoyl]-3-methyl-butyl]carbamate **154**



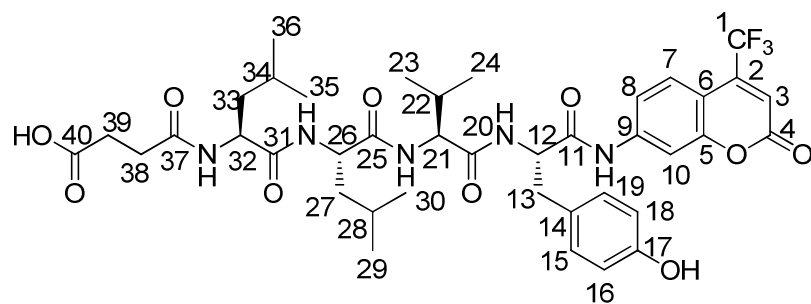
$C_{41}H_{54}F_3N_5O_9$

MW= 817.89 g/mol

A solution of **153** (500 mg, 0.70 mmol, 1 eq) in HCl 4M in dioxane (10 ml) was stirred for 2 h at room temperature. The solvent was evaporated under vacuum to afford free amine as an hydrochloride salt in quantitative yield as a yellow oil, which was used without further purification. 1H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.80 (s, 1H, NH), 9.20 (s, 1H, OH), 8.47 (d, 1H, J= 7.2 Hz, NH), 8.41 (m, 1H, NH), 8.29 (bs, 3H, NH₃), 7.90 (d, 1H, J= 1.9 Hz), 7.67 (d, 1H, J= 8.7 Hz), 7.53 (dd, 1H, J= 8.7 and 1.9 Hz), 7.06 (d, 2H, J= 8.2 Hz), 6.89 (s, 1H), 6.63 (d, 2H, J= 8.2 Hz), 4.61 (dd, 1H, J= 14.2 and 7.2 Hz), 4.24 (m, 1H), 3.86 (m, 1H), 2.97 (dd, 1H, J= 14.0 and 6.5 Hz), 2.83 (dd, 1H, J= 14.0 and 8.2 Hz), 1.98 (m, 1H), 1.57 (m, 1H), 1.48 (m, 2H), 0.83 (m, 6H), 0.82 (m, 6H) ; ^{13}C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 171.1, 170.5, 168.5, 158.6, 156.0, 154.6, 143.1, 139.0 (q, J= 32.3 Hz), 129.9, 127.0, 125.4, 123.5 (q, J= 274.5 Hz), 116.1, 114.9, 114.4 (C₃), 108.2, 106.2, 57.8, 55.4, 50.7, 40.8, 36.5, 30.8, 23.6, 22.6 (C₂₉), 22.0, 19.0, 18.3; ^{19}F (DMSO-*d*₆, 188 MHz) δ -64.00 (s); ESI MS *m/z*: 603 [M-H]. To a solution of free amine (0.62 mmol, 1 eq) in dry DMF (10 ml) was added Boc-Leu-OH (173 mg, 0.75 mmol, 1.2 eq), DIPEA (321 mg, 2.48 mmol, 4 eq), EDCI (143 mg, 0.75 mmol, 1.2 eq) and HOBT (101 mg, 1.96 mmol, 1.2 eq) in this order. The mixture was stirred overnight at room temperature under argon atmosphere. The solvent was evaporated under vacuum and the residue obtained was dissolved in EtOAc (10 ml). The organic layer was washed successively with 10% aqueous solution of citric acid (2 x 10 ml), water (10 ml), 10% aqueous solution of K₂CO₃ (2 x 10 ml) and brine (10 ml), dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated. The crude product was purified by column chromatography (DCM/Et₂O: 6/4) to give the compound **154** (300 mg, 0.37 mmol, 59%) as white foam. Rf: 0.5 (S₁O₂, DCM/ether: 6/4); 1H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 10.53 (s, 1H, NH-C₁₁), 9.15 (s, 1H, OH), 8.20 (d, 1H, J= 7.2 Hz, NH-C₁₂), 7.86 (s, 1H, H₁₀), 7.84 (d, 1H, J= 7.4 Hz, NH-C₃₂), 7.67 (d, 1H, J= 8.7 Hz, H₇), 7.66 (m, 1H, NH-C₂₁), 7.49 (d, 1H, J= 8.7 Hz, H₈), 7.03 (d, 2H, J= 8.2 Hz, H₁₅, H₁₉), 6.91 (m, 1H, NH-

C₂₆), 6.89 (s, 1H, H₃), 6.62 (d, 2H, J= 8.2 Hz, H₁₆, H₁₈), 4.59 (dd, 1H, J= 14.2 and 7.2 Hz, H₁₂), 4.37 (m, 1H, H₃₂), 4.17 (m, 1H, H₂₁), 3.95 (m, 2H, H₂₆), 2.93(dd, 1H, J= 14.0 and 6.5 Hz, H_{13a}), 2.82 (dd, 1H, J= 13.9 and 8.2 Hz, H_{13b}), 1.94 (m, 1H, H₂₂), 1.58 (m, 2H, H₂₈, H₃₄), 1.44 (m, 2H, H₃₃), 1.38 (m, 2H, H₂₇), 1.36 (s, 9H, H₃₉, H₄₀, H₄₁), 0.86 (m, 6H, H₂₉, H₃₀), 0.81 (m, 6H, H₃₅, H₃₆), 0.78 (m, 3H, H₂₃), 0.76 (m, 3H, H₂₄) ; ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 172.4 (C₃₁), 171.7 (C₂₅), 171.1 (C₁₁), 170.8 (C₂₀), 158.6 (C₄), 155.9 (C₁₇), 155.2 (C₃₇), 154.6 (C₅), 143.0 (C₉), 139.1 (q, J= 33.3 Hz, C₂), 129.9 (C₁₅, C₁₉), 126.9 (C₁₄), 125.4 (C₇), 121.7 (q, J= 276.0 Hz, C₁), 116.1 (C₈), 114.9 (C₁₆, C₁₈), 114.5 (C₃), 108.3 (C₆), 106.3 (C₁₀), 78.0 (C₃₈), 57.3 (C₂₁), 55.3 (C₁₂), 52.8 (C₂₆), 50.8 (C₃₂), 40.6 (C₂₇, C₃₃), 36.5 (C₁₃), 30.7 (C₂₂), 28.1 (C₃₉, C₄₀, C₄₁), 24.2 (C₂₈), 23.9 (C₃₄), 23.0 (C₂₉, C₃₀), 21.6 (C₃₅, C₃₆), 19.0 (C₂₃), 17.9 (C₂₄); ¹⁹F NMR (DMSO-*d*₆, 188 MHz) δ -64.01 (s); IR (cm⁻¹): 3340 (N-H), 2971 (C-H), 1678 (C=O), 1637 (C=C), 1515 (N-H), 1407 (OH); MS (ESI⁺) m/z: 841 [M+Na]⁺; Anal. Calcd for C₄₁H₅₄F₃N₅O₉ + 0.15 H₂O: C, 60.04; H, 6.69; N, 8.54; found C, 59.72; H, 6.82; N, 8.25

4-[[[(1S)-1-[[[(1S)-1-[[[(1S)-1-[[4-hydroxyphenyl)methyl]-2-oxo-2-[[2-oxo-4-(trifluoromethyl)chromen-7-yl]amino]ethyl]carbamoyl]-2-methyl-propyl]carbamoyl]-3-methyl-butyl]carbamoyl]-3-methyl-butyl]amino]-4-oxo-butanoic acid 155



C₄₀H₅₀F₃N₅O₁₀

MW= 817.85 g/mol

A solution of **154** (270 mg, 0.33 mmol, 1 eq) in HCl 4M in dioxane (5 ml) was stirred for 2 h at room temperature. The solvent was evaporated under vacuum to afford free amine as an hydrochloride salt in quantitative yield as a yellow oil, which was used without further purification. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ 10.77 (s, 1H, NH), 9.22 (s, 1H, OH), 8.62 (d, 1H, J= 7.2 Hz, NH), 8.27 (d, 1H, J= 7.4 Hz, NH), 8.20 (bs, 3H, NH₃), 8.01 (m, 1H, NH), 7.89 (d, 1H, J= 1.9 Hz), 7.67 (d, 1H, J= 8.8 Hz), 7.51 (dd, 1H, J= 8.8 and 1.9 Hz), 7.08 (d, 2H, J= 8.2 Hz), 6.90 (s, 1H), 6.63 (d, 2H, J= 8.2 Hz), 4.60 (m, 1H), 4.47 (m, 1H), 4.17 (m, 1H), 3.79

(m, 2H), 2.93(m, 1H), 2.87 (m, 1H), 1.96 (m, 1H), 1.59 (m, 2H), 1.47 (m, 2H), 1.40 (m, 2H), 0.86 (m, 6H), 0.81 (m, 6H), 0.79 (m, 3H), 0.60 (m, 3H) ; ^{13}C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ 172.0, 171.2, 170.8, 168.6, 158.6, 155.9, 154.6, 143.0, 139.2 (q, J= 33.3 Hz), 129.9, 127.0, 125.4, 121.8 (q, J= 276.0 Hz), 116.0, 114.9, 114.6, 108.3, 106.2, 57.6, 55.3, 51.1, 50.6, 40.6, 36.5, 30.6, 23.9, 23.4, 23.0, 22.1, 21.8, 19.0, 17.9; ^{19}F (DMSO-*d*₆, 188 MHz) δ -64.0 (s); **ESI⁺ MS** *m/z*: 718 [M+H]⁺. To a solution of **free amaine** (228 mg, 0.30 mmol, 1.0 eq) in dry DMF (10 ml) was added anhydride succinic (33 mg, 0.33 mmol, 1.1 eq) and DIPEA (77 mg, 0.60 mmol, 2 eq). The mixture was stirred at room temperature overnight. The solution was brought at pH5 using 10% of aqueous solution of citric acid. The precipitate formed was filtered and washed with Et₂O (20 ml) to give **155** (138 mg, 0.17 mmol, 56%) as a white solid. **m.p.:** 230°-232°C; ^1H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 12.10 (bs, 1H, COOH), 10.50 (s, 1H, NH-C₁₁), 9.15 (s, 1H, OH), 8.16 (d, 1H, J= 7.2 Hz, NH-C₁₂), 8.02 (d, 1H, J= 7.4 Hz, NH-C₃₂), 7.93 (m, 1H, NH-C₂₆), 7.86 (d, 1H, J= 1.9 Hz, H₁₀), 7.67 (d, 1H, J= 8.9 Hz, H₇), 7.56 (m, 1H, NH-C₂₁), 7.49 (dd, 1H, J= 8.9 and 1.9 Hz, H₈), 7.03 (d, 2H, J= 8.2 Hz, H₁₅, H₁₉), 6.90 (s, 1H, H₃), 6.62 (d, 2H, J= 8.2 Hz, H₁₆, H₁₈), 4.59 (dd, 1H, J= 14.2 and 7.2 Hz, H₁₂), 4.28 (m, 2H, H₂₆, H₃₂), 4.15 (m, 1H, H₂₁), 2.94 (dd, 1H, J= 14.0 and 6.5 Hz, H_{13a}), 2.83 (dd, 1H, J= 13.9 and 8.2 Hz, H_{13b}), 2.70 (m, 2H, H₃₉), 2.61 (m, 2H, H₃₈), 1.93 (m, 1H, H₂₂), 1.58 (m, 2H, H₂₈, H₃₄), 1.48 (m, 2H, H₃₃), 1.43 (m, 2H, H₂₇), 0.86 (m, 6H, H₂₉, H₃₀), 0.81 (m, 6H, H₃₅, H₃₆), 0.78 (m, 3H, H₂₃), 0.77 (m, 3H, H₂₄) ; ^{13}C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 173.8 (C₄₀), 172.2 (C₃₁), 172.1 (C₂₅), 171.1 (C₃₇), 171.0 (C₂₀), 170.8 (C₁₁), 158.6 (C₄), 155.9 (C₁₇), 154.6 (C₅), 143.0 (C₉), 139.1 (q, J= 33.3 Hz, C₂), 130.0 (C₁₅, C₁₉), 127.0 (C₁₄), 125.4 (C₇), 121.7 (q, J= 274.5 Hz, C₁), 116.1 (C₈), 114.9 (C₁₆, C₁₈), 114.5 (C₃), 108.4 (C₆), 106.3 (C₁₀), 57.5 (C₂₁), 55.3 (C₁₂), 51.1 (C₂₆, C₃₂), 40.8 (C₂₇), 40.1 (C₃₃), 30.0 (C₃₉), 29.1 (C₃₈), 36.6 (C₁₃), 30.6 (C₂₂), 24.1 (C₂₈, C₃₄), 23.0 (C₂₉, C₃₀), 21.6 (C₃₅, C₃₆), 19.0 (C₂₃), 17.9 (C₂₄); ^{19}F (DMSO-*d*₆, 188 MHz) δ -64.01 (s); **IR** (cm⁻¹): 2959 (C-H), 1678 (C=O), 1644 (C=C), 1528 (N-H); **MS** (ESI⁻) *m/z*: 816 [M-H]⁻; **Anal.** Calcd for C₄₀H₅₀F₃N₅O₁₀ + 3 H₂O: C, 55.10; H, 6.49; N, 8.03; found C, 55.35; H, 6.38; N, 7.49

Determination of Michael-Menten's constant K_m :

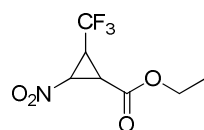
Michael-Menten's constant (K_m) of the fluorogenic substrates Suc-LLVY-AMC or fluorinated substrate 3 (10-90 μM) of CT-L site was determined by monitoring the hydrolysis ($\lambda_{\text{exc}} = 360$ and $\lambda_{\text{em}} = 480$ nm) for 2 h at 37°C in the presence of proteasome. Substrates were previously dissolved in DMSO, with the final solvent concentration kept constant at 2% (v/v). The buffers were (pH 7.5) 20 mM Tris, 1 mM DTT, 10% glycerol, 0.02% (w/v) SDS or 100 mM Tris. Initial rate (V_i) for each concentration was determined. The K_m value was obtained by plotting the initial rate against inhibitor concentration.

Enzyme and inhibition Assays:

Enzyme activities of CT-L site were determined by monitoring the hydrolysis of the fluorogenic substrate Suc-LLVY-AMC ($\lambda_{\text{exc}} = 360$ and $\lambda_{\text{em}} = 480$ nm) for 2 h at 37°C in the presence of untreated (control) or proteasome that had been incubated with 0.1-100 μM test compounds. Substrates and compounds were previously dissolved in DMSO, with the final solvent concentration kept constant at 2% (v/v). The buffers were (pH 7.5) 20 mM Tris, 1 mM DTT, 10% glycerol, 0.02% (w/v) SDS or 100 mM Tris. Initial rates determined in control experiments (V_0) were considered to be 100% of the peptidase activity; initial rates (V_i) that were above 100% in the presence of a test compound were considered to be activations (expressed as activation factor), while initial rates below 100% were considered to be inhibitions. The IC_{50} values (inhibitor concentrations giving 50% inhibition) were obtained by plotting the percent inhibition (obtained by fitting experimental data to the equation 1) against inhibitor.

$$\% \text{ inhibition} = 100 \times \left(1 - \frac{V_i}{V_0}\right) \quad \text{Equation 1}$$

Ethyl 2-nitro-3-(trifluoromethyl)cyclopropanecarboxylate **199**

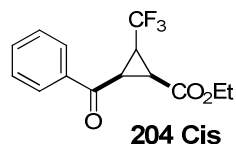


C₇H₈F₃NO₄

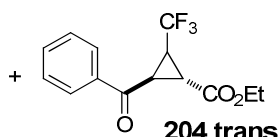
MW= 227.14 g/mol

To a solution of ethyl trifluorocrotonate (2 g, 11.9 mmol, 1 equiv) in DMF (20 mL) was added potassium carbonate (1.63 g, 11.9 mmol, 1 equiv) and then bromonitromethane (1.67 g, 11.9 mmol, 1 equiv). The reaction was stirred at room temperature and monitored by ¹⁹F NMR. During the process of the reaction 11.9 mmol (1.67 g) of bromonitromethane was added every 2 hours, two times, until overall amount of ethyl trifluorocrotonate. After 7 hours the reaction was quenched carefully with H₂O and extracted with ether (2x20 ml), dried over Na₂SO₄, filtrated and evaporated. The crude nitrocyclopropane derivated was purified by flash chromatography (pentane/ether, 9:1) affording two diastereoisomers **199M/199m** (2.11 g, 78%) as colorless oil. *Major diastereomer 199M*: ¹H NMR (500 MHz, C₆D₆) δ 0.785 (t, 3H, ³J = 7.1 Hz), 1.82 (dd, 1H, ³J = 9.2 Hz, ³J = 7.3 Hz), 2.97 (dq, 1H, ³J = 7.3 Hz, ³J_{HF} = 6.4 Hz, ³J = 4.5 Hz), 3.64 (dd, 1H, ³J = 9.3 Hz, ³J = 4.5 Hz), 3.76–3.69 (ABX₃, 2H); ¹⁹F (376.5 MHz, C₆D₆) □ = -66.7 (d, ³J_{HF} = 6.3 Hz); ¹³C NMR (125 MHz, C₆D₆) □ = 13.7, 26.3, 27.1 (q, ²J_{CF} = 39 Hz), 58.8, 62.5, 122.8 (q, ¹J_{CF} = 273 Hz), 163.4. ¹⁹F NMR (188 MHz, CDCl₃): □□□ = -67.10 (d, ³J_{HF} = 6.1). *Minor diastereomer 199m*: ¹H NMR (500 MHz, C₆D₆) □ = 0.77 (t, 3H, ³J = 7.1 Hz), 1.94 (d quint., 1H, ³J = 9.1 Hz, ³J = 6.9 Hz, ³J_{HF} = 6.9 Hz), 3.02 (dd, 1H, ³J = 7.3 Hz, ³J = 4.5 Hz), 3.67 (ABX₂, 2H), 3.83 (ddq, 1H, ³J = 9.1 Hz, ³J = 4.4 Hz, ⁴J_{HF} = 0.9 Hz); ¹⁹F (376.5 MHz, C₆D₆) □ = -61.0 (d, ³J_{HF} = 6.9 Hz); ¹³C NMR (125 MHz, C₆D₆) □ = 13.7, 24.6, 29.0 (q, ²J_{CF} = 40 Hz), 60.5, 62.3, 122.9 (q, ¹J_{CF} = 274 Hz), 166.0. IR (cm⁻¹): 2970 (CH), 1735 (C=O), 1470 (CH), 1310 (CO). MS (APCI): m/z 226 (M-H)⁻. Anal. Calcd for C₇H₈F₃NO₄: C, 37.01; H, 3.55; N, 6.17; found C, 37.13; H, 3.78; N, 5.71.

Ethyl 2-benzoyl-3-(trifluoromethyl)cyclopropanecarboxylate **204**



204 Cis



204 trans

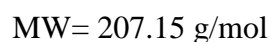
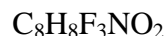
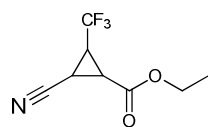
C₁₄H₁₃F₃O₃

MW= 286 g/mol

In a sealed flask, Phenacyl Chloride **203** (135 mg, 1.5 mmol, 1.5 equiv) was added to a stirred solution of ethyl trifluorocrotonate (100 mg, 0.59 mmol, 1.0 equiv) and K₂CO₃ (204 mg, 1.47 mmol, 2.5 equiv) in dry DMF (2.5 ml) and stirred at 80°C for 16 hours. The reaction was

quenched with a saturated aqueous Ammonium Chloride solution and extracted with Et₂O (2 x 10 ml). The combined organic phases were dried (MgSO₄) and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (Pentane/Ether: 8/2) to give **204-cis** and **204-trans**, as two colorless oil (in 7/3 ratio), (115 mg, 0.40 mmol, 68%). *Major diastereomer 204-cis*. Rf: 0.5 (Cyclohexane/EtOAc:8/2). Mp: 78-80 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.08 (t, ³J_{H,H}= 7.1 Hz, 3H, CH₃ ester), 2.65 (dd, ³J = 10.1, 5.8 Hz, 1H, CH_{Cyclopropane}), 3.02 (m, 1H, CH_{Cyclopropane}), 3.13 (dd, ³J_{H,H}= 10.1, 6.3 Hz, 1H, CH_{Cyclopropane}), 4.03 (q, ³J = 7.1 Hz, 2H, CH₂ ester), 7.66 – 7.42 (m, 3H, CH_{Phenyl}), 8.01 (d, ³J_{H,H}= 7.5 Hz, 2H, CH_{Phenyl}); ¹³C NMR_a (75 MHz, CDCl₃) δ 13.8 (CH₃ ester), 24.8 (q, ²J_{C,F}= 38.4Hz, CH_{Cyclopropane}), 25.3 (CH_{Cyclopropane}), 28.2 (CH_{Cyclop}), 61.7 (CH₂ ester), 124.3 (q, ¹J_{C,F}= 270Hz, CF₃), 128.4 (CH_{Phenyl}), 128.8 (CH_{Phenyl}), 133.9 (CH_{Phenyl}), 136.0 (C_{Phenyl}), 166.8 (CO_{ester}), 190.8 (CO_{ketone}), ¹⁹F NMR_a (188 MHz, CDCl₃) δ -66.98 (d, ³J_{H,F}= 6.2 Hz, CF₃). *Minor diastereomer 204-trans*. Rf: 0.60 (Cyclohexane/EtOAc:8/2). mp: 78-80 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.31 (t, ³J_{H,H}= 7.1 Hz, 3H, CH₃ ester), 2.81-2.61 (m, 1H, CH_{Cyclopropane}), 3.07 (t, ³J_{H,H}= 5.8 Hz, 1H, CH_{Cyclopropane}), 3.23 (dd, ³J_{H,H}= 10.2, 5.9 Hz, 1H, CH_{Cyclopropane}), 4.23 (q, ³J = 7.1 Hz, 2H, CH₂ ester), 7.51 (t, ³J_{H,H}= 7.7 Hz, 2H, CH_{Phenyl}), 7.62 (t, ³J_{H,H}= 7.7 Hz, 1H, CH_{Phenyl}) 8.06 (d, ³J_{H,H}= 7.8 Hz, 2H, CH_{Phenyl}); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 14.0 (CH₃ ester), 21.4 (CH_{Cyclopropane}), 30.0 (q, ²J_{C,F}= 38.4Hz, CH_{Cyclopropane}), 30.5 (CH_{Cyclop}), 61.68 (CH₂ ester), 124.27 (q, ¹J_{C,F}= 271.5 Hz, CF₃), 128.6 (CH_{Phenyl}), 128.8 (CH_{Phenyl}), 133.9 (CH_{Phenyl}), 136.1 (C_{Phenyl}), 170.1 (CO_{ester}), 190.2 (CO_{ketone}); ¹⁹F NMR (188 MHz, CDCl₃) δ -61.26 (d, ³J_{H,F}= 6.2 Hz, CF₃). IR (cm⁻¹): 1739 (C=O), 1138 (C-O), 693 (CF₃). Anal. Calcd for C₁₄H₁₃F₃O₃: C, 58.74; H, 4.58; found C, 58.88; H, 4.70.

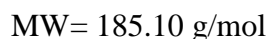
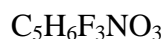
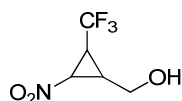
Ethyl 2-cyano-3-(trifluoromethyl)cyclopropanecarboxylate **208**



In a sealed flask, chloroacetonitrile **207** (66 mg, 0.88 mmol, 1.5 equiv) was added to a stirred solution of ethyl trifluorocrotonate (100 mg, 0.39 mmol, 1.0 equiv) and K₂CO₃ (204 mg, 1.47 mmol, 2.5 equiv) in dry DMF (2 ml) and stirred at 80°C for 5 hours. The reaction was quenched with a saturated aqueous Ammonium Chloride solution and extracted with Et₂O (2 x 10 ml). The combined organic phases were dried (MgSO₄) and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (Pentane/Ether :8/2) to give **208-**

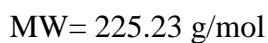
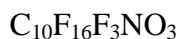
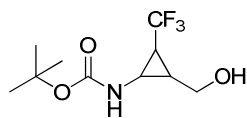
cis and **208-trans**, as two colorless oil (in 5/5 ratio), (60 mg, 0.29 mmol, 50%). *diastereomer 208-cis*. Rf: 0.5 (Pentane/Ether :8/2); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 1.33 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$ Hz, 3H, CH_3 ester) 2.32 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 9.1$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.5$ Hz, 1H, $\text{CH}_{\text{cyclopropane}}$), 2.52 (m, 1H, $\text{CH}_{\text{cyclopropane}}$), 2.65 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.6$ Hz, 1H, $\text{CH}_{\text{cyclopropane}}$), 4.24 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$ Hz, 2H, CH_2 ester); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 8.5 ($\text{CH}_{\text{cyclopropane}}$), 13.9 (CH_3 ester), 23.4 ($\text{CH}_{\text{cyclopropane}}$), 26.7 (q, $^2J_{\text{C,F}} = 39.5$ Hz, $\text{CH}_{\text{cyclopropane}}$), 62.8 (CH_2 ester), 114.2 (CN), 122.7 (q, $^1J_{\text{C,F}} = 273.9$ Hz, CF_3), 167.4 (CO_{ester}); $^{19}\text{F NMR}$ (CDCl_3 , 188 MHz) δ -64.68 (d, $^3J_{\text{F,H}} = 6.1$ Hz, CF_3). *Minor diastereomer 208-trans*. Rf: 0.4 (Pentane/Ether :8/2); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 1.33 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$ Hz, 3H, CH_3 ester) 2.25 (ddd, $^3J_{\text{H,H}} = 9.1$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 0.6$ Hz, 1H, $\text{CH}_{\text{cyclopropane}}$), 2.48 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 9.1$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$ Hz, 1H, $\text{CH}_{\text{cyclopropane}}$), 2.81 (sextuplet, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$ Hz, 1H, $\text{CH}_{\text{cyclopropane}}$), 4.30 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$ Hz, 2H, CH_2 ester); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 8.4 ($\text{CH}_{\text{cyclopropane}}$), 14.0 (CH_3 ester), 22.6 ($\text{CH}_{\text{cyclopropane}}$), 26.7 (q, $^2J_{\text{C,F}} = 39.5$ Hz, $\text{CH}_{\text{cyclopropane}}$), 62.9 (CH_2 ester), 114.1 (CN), 122.7 (q, $^1J_{\text{C,F}} = 273.9$ Hz, CF_3), 165.7 (CO_{ester}); $^{19}\text{F NMR}$ (CDCl_3 , 188 MHz) δ -64.68 (d, $^3J_{\text{H,F}} = 6.4$ Hz, CF_3). IR (cm^{-1}): 2988 (CH), 2185 (CN), 1736 (C=O), 1471 (CH); MS (ESI $^+$): m/z 230 (M+Na) $^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_8\text{H}_8\text{F}_3\text{NO}_2$: C, 46.38; H, 3.89; N, 6.76 found C, 46.15; H, 4.05; N, 6.59.

[2-nitro-3-(trifluoromethyl)cyclopropyl]methanol **210**



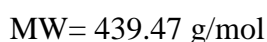
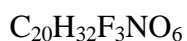
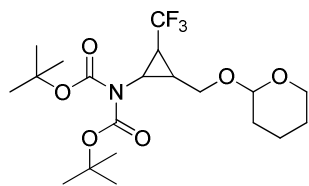
To a suspension of LiAlH_4 (191 mg, 5.04 mmol, 1.5 equiv) and aluminium chloride (314 mg, 2.35 mmol, 0.7 equiv) was added dropwise at 0°C , a solution of **199M** (764 mg, 3.36 mmol, 1 equiv) in ether (10 ml). The mixture was stirred at 0°C and monitored by TLC. After 2 hours the reaction was quenched carefully with H_2O (10 ml) and extracted with ether (2x15 ml), dried over Na_2SO_4 , filtrated and evaporated. The crude product was purified by column chromatography (pentane/ether: 6/4) to give **210** (720 mg, 84%) as a colorless oil. Rf: 0.3 (SiO_2 , pentane/ether: 6/4). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 1.73 (s, 1H, OH), 2.25 (dd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.9$, 14.1 Hz, $\text{CH}_{\text{cyclopropane}}$), 2.91 (m, 1H, $\text{CH}_{\text{cyclopropane}}$), 3.88 (m, 2H, CH_2 ester), 4.11 (dd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 5.5$, 12.1 Hz, $\text{CH}_{\text{cyclopropane}}$); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 27.2 (q, $^2J_{\text{C,F}} = 39.0$ Hz, $\text{CH}_{\text{cyclopropane}}$), 27.4 ($\text{CH}_{\text{cyclopropane}}$), 57.1 (CH_2), 59.0 ($\text{CH}_{\text{cyclopropane}}$), 122.9 (q, $^1J_{\text{C,F}} = 274.0$ Hz, CF_3); $^{19}\text{F NMR}$ (376 MHz, CDCl_3): δ -66.5 (d, $^3J_{\text{H,F}} = 6.2$ Hz, CF_3). Anal. Calcd for $\text{C}_5\text{H}_6\text{F}_3\text{NO}_3 + 0.15 \text{ H}_2\text{O}$: C, 32.44; H, 3.39; N, 7.46 found C, 31.77; H, 3.19; N, 7.41

tert-butyl N-[2-(hydroxymethyl)-3-(trifluoromethyl)cyclopropyl]carbamate **211**



To a solution of **210** (100 mg, 0.54 mmol, 1 equiv) in dry methanol (5 mL) was added palladium on activated charcoal 10% (10 mg). The mixture was stirred during 6 hours under hydrogen atmosphere at room temperature. After overall amount of **210**, di-tert-butyl dicarbonate (129 mg, 0.59 mmol, 1.1 equiv) and then triethylamine (82 μL , 0.59 mmol, 1.1 equiv) were added. After stirring over night at room temperature the solvent was evaporated under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography (pentane/ether, 5/5) to give 109 mg of **211** (79%) as white foam. Rf: 0.3 (SiO₂, pentane/ether: 5/5). IR (cm⁻¹): 3283 (OH), 2986 (CH), 1688 (C=O), 1540 (NH), 1469 (CH), 1394 (C-N). Anal. Calcd for C₁₀H₁₆F₃NO₃: C, 47.06; H, 6.32; N, 5.45 ; found C, 47.14 ; H, 6.08 ; N, 5.44 ; MS (ESI⁺): m/z 278 (M+Na)⁺. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) ppm 1.45 (m, 1H, CH_{cyclopropane}), 1.46 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.84 (br s, 1H, CH_{cyclopropane}), 2.98 (dd, *J* = 7.6 Hz, 3.5 Hz, 1H CH_{cyclopropane}), 3.30 (br t, 1H), 3.45 (br s, 1H), 3.99 (dd, *J* = 11.8 Hz, 3.6 Hz, 1H, CH₂), 4.99 (br s, 1H); ¹⁹F (376.5 MHz, CDCl₃) ppm -65.5 (d, ³*J*_{H,F} = 6.9 Hz); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) ppm 24.5 (m, ²*J*_{CF} = 40 Hz), 24.8, 28.3, 29.9, 59.4, 81.6, 125.0 (q, ¹*J*_{CF} = 271 Hz), 157.7.

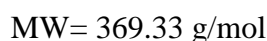
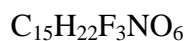
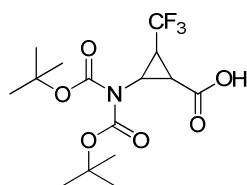
tert-butyl N-tert-butoxycarbonyl-N-[2-(tetrahydropyran-2-ylloxymethyl)-3-(trifluoromethyl)cyclopropyl]carbamate **212**



To a solution of **211** (160 mg, 0.62 mmol, 1 equiv), in dry DCM (3 ml) was added 3,4-Dihydro-2*H*-pyran (114 μL , 1.25 mmol, 2 equiv) and then Pyridinium *p*-toluenesulfonate (47 mg, 0.18 mg, 0.3 equiv). The mixture was stirred at room temperature and monitored by TLC. The reaction was quenched with ether (10 ml) and washed with brine (10 mL). The crude product was dissolved in MeCN (3 mL) and then Di-*tert*-butyl dicarbonate (203 mg, 0.93 mmol, 1.5 equiv) and 4-(Dimethylamino)pyridine (38 mg, 0.31 mmol, 0.5 equiv) were added. The mixture was stirred at room temperature overnight. The reaction was concentrated under vacuum and the crude product was purified by flash chromatography (pentane/ether, 5/5) to

give pure **212** (179 mg, 60%) as white solid. m.p. 76-78°C. Rf: 0.5 (SiO₂, pentane/ether: 8/2).
Diastereomer A: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) □ 1.48 (s, 18H, CH₃ Boc), 1.58 (m, 2H, CH₂ THP), 1.59 (m, 1H, CH_{2b} THP), 1.68 (m, 1H, CH_{2a} THP), 1.81 (m, 2H, CH₂ THP), 1.85 (m, 1H, CH_{cyclopropane}), 1.91 (m, 1H, CH_{cyclopropane}), 3.11 (m, 1H, CH_{cyclopropane}), 3.46 (m, 1H, CH-CH_{2b}-O), 3.50 (m, 2H, O-CH₂ THP), 3.79 (m, 1H, CH-CH_{2a}-O), 4.61 (m, 1H, CH_{acetal}); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) □ 19.2 (CH₂ THP), 23.0 (CH_{cyclopropane}), 25.4 (CH₂ THP), 26.4 (q, ²J_{C,F} = 36.7 Hz, CH_{cyclopropane}), 27.9 (CH₃ Boc), 30.5 (CH₂ THP), 35.1 (CH_{cyclopropane}), 62.0 (O-CH₂ THP), 63.1 (CH₂ THP), 83.1 (C_{quater} Boc), 83.2 (C_{quater} Boc), 98.2 (CH_{acetal}), 125.1 (q, ¹J_{C,F} = 274.0 Hz, CF₃), 152.4 (CO_{Boc}), 152.5 (CO_{Boc}); ¹⁹F NMR (188 MHz, CDCl₃): -66.05 (d, ³J_{H,F} = 6.3 Hz, CF₃).
Diastereomer B: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) □ 1.50 (s, 18H, CH₃ Boc), 1.51 (m, 2H, CH₂ THP), 1.52 (m, 1H, CH_{2b} THP), 1.59 (m, 1H, CH_{2a} THP), 1.68 (m, 2H, CH₂ THP), 1.79 (m, 1H, CH_{cyclopropane}), 1.99 (m, 1H, CH_{cyclopropane}), 3.09 (m, 1H, CH_{cyclopropane}), 3.31 (dd, ³J_{H,H} = 7.3, 10.8 Hz, 1H, CH-CH_{2b}-O), 3.81 (m, 2H, O-CH₂ THP), 4.06 (dd, ³J_{H,H} = 4.6, 10.9 Hz, 1H, CH-CH_{2a}-O), 4.61 (m, 1H, CH_{acetal}); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) 19.2 (CH₂ THP), 22.9 (CH_{cyclopropane}), 25.3 (CH₂ THP), 26.3 (q, ²J_{C,F} = 36.7 Hz, CH_{cyclopropane}), 27.9 (CH₃ Boc), 30.4 (CH₂ THP), 34.5 (CH_{cyclopropane}), 62.1 (O-CH₂ THP), 63.1 (CH₂ THP), 83.1 (C_{quater} Boc), 83.2 (C_{quater} Boc), 98.1 (CH_{acetal}), 125.0 (q, ¹J_{C,F} = 274.0 Hz, CF₃), 152.4 (CO_{Boc}), 152.5 (CO_{Boc}); ¹⁹F NMR (188 MHz, CDCl₃): -65.97 (d, ³J_{H,F} = 6.3 Hz, CF₃).

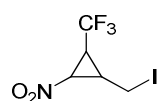
2-[bis(tert-butoxycarbonyl)amino]-3-(trifluoromethyl)cyclopropanecarboxylic acid **213**



To a solution of **212** (139 mg, 0.33 mmol, 1 equiv) in toluene (5 mL) were added molecular sieves 3Å (13.9 mg, 10% m/m) and then Pyridinium chlorochromate (2.11 g, 9.8 mmol, 30 equiv) at room temperature. After stirring overnight the reaction was quenched with H₂O (10 mL) and extracted with ether (2x10 mL). The crude product obtained after concentration was dissolved in MeCN and cooled at 0°C, then NaH₂PO₄ 0.1 M aqueous solution (1.8 mL, 0.18 mmol, 1.4 equiv) and H₂O₂ 30% (32 µL, 0.30 mmol, 2.4 eq) were added at 0°C. An aqueous solution of NaClO₂ 0.65 M (500 µL) was added via a syringe pump over 30 min. The mixture was stirred at 0°C and monitored by TLC during 2 hours and then reaction was brought at pH 4 and extracted with EtOAc (2x10 mL) to give **213** (15 mg, 10%) as a white foam. MS (ESI⁺-

): m/z 408 (M+K)⁺. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) □ 1.40 (s, 9H, CH₃ Boc) 1.47 (s, 9H, CH₃ Boc), 2.39 (t, ³J_{H,H} = 7.3 Hz, 1H, CH_{cyclopropane}), 2.77 (sext., ³J_{H,H} and ³J_{H,F} = 6.4, 1H, CH_{cyclopropane}), 3.71 (m, 1H, CH_{cyclopropane}), 7.40 (bs, 1H, COOH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) 25.0 (q, ²J_{C,F} = 36.7 Hz, CH_{cyclopropane}), 27.4 (CH₃ Boc), 27.8 (CH₃ Boc), 29.7 (CH_{cyclopropane}), 40.0 (CH_{cyclopropane}), 84.1 (C_{quater} Boc), 86.0 (C_{quater} Boc), 123.5 (q, ¹J_{C,F} = 273.9 Hz, CF₃), 152.4 (CO_{Boc}), 153.8 (CO_{Boc}), 171.1 (CO_{acid}); ¹⁹F NMR (188 MHz, CDCl₃): -66.70 (d, ³J_{F,H} = 6.2 Hz, CF₃).

1-(iodomethyl)-2-nitro-3-(trifluoromethyl)cyclopropane **214**

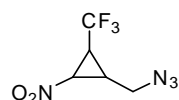


C₅H₅INO₂

MW = 295.0 g/mol

Iodine (274 mg, 1.08 mmol, 1.9 equiv) was added in small portions to a solution of alcohol **210** (100 mg, 0.54 mmol, 1 equiv), Ph₃P (254 mg, 0.97 mmol, 1.8 equiv) and imidazole (69 mg, 1.02 mmol, 1.9 equiv) in a mixture of anhydrous MeCN (1 mL) and Et₂O (1.7 mL) under argon. Stirring was continued at 0 °C for 2 h, then the reaction mixture was diluted with Et₂O (20 mL) and washed with a 20 % aq. solution of Na₂S₂O₃ (2 × 10 mL), brine (10 mL), dried and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography (pentane/ether, 95/5) to give **214** (82%) as colorless oil. Rf: 0.6 (SiO₂, pentane/ether: 9.5/0.5). IR (cm⁻¹): 3283, 2986, 1688, 1540, 1469, 1394. Anal. Calcd for C₅H₅F₃INO₂: C, 20.36; H, 1.71; N, 4.75; found C, 19.92; H, 1.74; N, 4.50; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) □ 2.44 (quint., ³J_{H,H} = 8.1 Hz, 1H, CH_{cyclopropane}), 2.88 (m, 1H, CH_{cyclopropane}), 3.34 (dd, ³J_{H,H} = 8.34, 10.2 Hz, 1H, CH₂-I), 3.47 (dd, ³J_{H,H} = 7.9 and 10.7 Hz, 1H, CH₂-I), 4.73 (dd, ³J_{H,H} = 3.9 and 8.6 Hz, 1H, CH-NO₂). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) □ -6.4 (CH₂-I), 28.9 (CH_{cyclopropane}), 32.2 (q, ²J_{C,F} = 39.0 Hz, CH_{cyclopropane}), 62.9 (CH_{cyclopropane}), 123.1 (q, ¹J_{C,F} = 274.5 Hz, CF₃). ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃): -67.0 (d, ³J_{H,F} = 6.2 Hz, CF₃).

1-(azidomethyl)-2-nitro-3-(trifluoromethyl)cyclopropane **215**

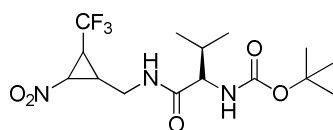


C₅H₅N₄O₂

MW = 210.4 g/mol

To a solution of **214** (198 mg, 0.67 mmol 1 equiv) in dry DMSO (2 mL) was added sodium azide (48 mg, 0.74 mmol, 1.1 equiv) at room temperature. After 1h of stirring the reaction was quenched with H₂O (10 mL) and extracted with ether (2x10 mL). The organic layer was dried and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography (pentane/ether, 95/5) to yield **215** (72%) as colorless oil. Rf: 0.4 (SiO₂, pentane/ether: 9.5/0.5). IR (cm⁻¹): 3283, 2986, 1688, 1540, 1469, 1394. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) 2.20 (quint., ³J_{H,H}= 8.4 Hz, 1H, CH_{cyclopropane}), 2.95 (m, 1H, CH_{cyclopropane}), 3.61 (dd, ³J_{H,H}= 8.5, 13.5 Hz, 1H, CH_{2b-N₃}), 3.80 (dd, ³J_{H,H}= 6.5, 13.5 Hz, CH_{2a-N₃}), 4.67 (dd, ³J_{H,H}= 3.8, 8.5 Hz, 1H, CH_{cyclopropane}); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) 27.8 (CH_{cyclopropane}), 28.0 (q, ²J_{C,F}= 38.6 Hz, CH_{cyclopropane}), 46.2 (CH_{2-N₃}), 58.6 (CH_{cyclopropane}), 122.6 (q, ³J_{C,F}= 274.6 Hz, CF₃); ¹⁹F NMR (188 MHz, CDCl₃): -66.8 (d, ³J_{H,F}= 6.1 Hz, CF₃). Anal. Calcd for C₅H₅F₃N₄O₂ + 0.15 H₂O: C, 28.22; H, 2.52; N, 26.11; found C, 28.11; H, 2.02; N, 25.89.

tert-butyl N-[(1R)-2-methyl-1-[[2-nitro-3-(trifluoromethyl)cyclopropyl]methylcarbamoyl]propyl]carbamate **216**



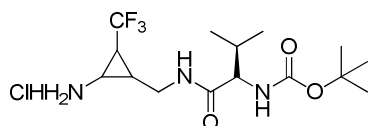
C₁₅H₂₄F₃NO₅

MW= 383.36 g/mol

To a solution of **215** (317 mg, 1.51 mmol, 1 equiv) in THF/H₂O: (6/0.6) was added triphenylphosphine and the mixture was stirred at rt for 1h. Then reaction was diluted in H₂O and extracted with ether (2x15 mL). A solution of HCl 4M in methanol was added to the organic layer before concentrated in vacuum. To a solution of the free amine (1.51 mmol, 1 equiv) in dry DMF (10 ml) was added Boc-Val-OH (393 mg, 1.81 mmol, 1.2 equiv), DIPEA (781 mg, 6.04 mmol, 4 equiv), EDCi (348 mg, 1.81 mmol, 1.2 equiv), and then HOBt (245 mg, 1.81 mmol, 1.2 equiv). The mixture was stirred overnight at room temperature under argon atmosphere. The solvent was evaporated over vacuum and the residue dissolved in EtOAc (10 ml). The organic layer was washed with 10% aqueous solution of citric acid (2 x 10 ml), water (10 ml), 10% aqueous solution of K₂CO₃ (2 x 10 ml) and brine (10 ml), dried over Na₂SO₄, filtrated and evaporated. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/EtOAc: 7/3) to afford the compound **216** (247 mg, 42%) as a white foam. Rf: 0.4 (SiO₂, cyclohexane/EtOAc: 7/3). IR (cm⁻¹): 3283, 2986, 1688, 1540,

1469, 1394. MS (ESI⁺): m/z 406 (M+Na)⁺. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) □ 0.91 (d, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 3H, CH₃), 0.94 (d, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 3H, CH₃), 1.43 (s, 9H, CH₃), 2.11 (m, 1H, CH), 2.32 (m, 1H, CH_{cyclopropane}), 2.92 (m, 1H, CH_{cyclopropane}), 3.40 (m, 1H, CH_{2b}-NH), 3.49 (m, 1H, CH_{2a}-NH-CO), 3.86 (dd, ³J_{H,H} = 8.3, 14.8 Hz, 1H, CH), 4.56 (dd, ³J_{H,H} = 3.7 and 8.8 Hz, 1H, CH_{cyclopropane}), 5.05 (d, ³J_{H,H} = 6.5, 1H, NH), 6.66 (m, 1H, NH); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) 17.8 (CH), 19.2 (CH₃ valine), 25.5/25.4 (CH_{cyclopropane}), 28.1 (q, ²J_{C,F} = 38 Hz, CH_{cyclopropane}), 28.2 (CH_{3Boc}), 30.4 (CH), 35.2/35.1 (CH₂-NH), 59.3 (CH_{cyclopropane}), 60.1 (CH), 80.2 (C), 122.8 (q, ³J_{C,F} = 274.6 Hz, CF₃), 156.0 (CO), 172.6 (CO). ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃): -66.8 (d, ³J_{H,F} = 6.1 Hz, CF₃), -67.8 (d, ³J_{H,F} = 6.1 Hz, CF₃). Anal. Calcd for C₁₅H₂₄F₃N₃O₅: C, 46.99; H, 6.31; N, 10.96; found C, 46.63; H, 6.50; N, 11.02.

tert-butyl N-[(1R)-1-[[2-amino-3-(trifluoromethyl)cyclopropyl]methylcarbamoyl]-2-methyl-propyl]carbamate **217**



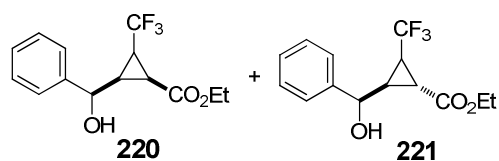
C₁₅H₂₇ClF₃N₃O₃

MW= 389.84 g/mol

In a round-bottomed flask was dissolved **216** (290 mg, 0.76 mmol, 1 equiv) in 4 mL THF at room temperature, aqueous HCl 2N was added (13.7 mL, 27.36 mmol, 36 equiv) followed by Indium powder (1.73 g, 15.12 mmol, 20 equiv) in one portion. After 4h the gray heterogenous solution became clear and a metallic precipitate appeared. The resulting mixture was dissolved in EtOAc (20 ml) and 20 ml of sat. NaHCO_{3(aq)} was added slowly. The phases were separated and the aqueous layer was extracted with EtOAc (2x10 ml). Combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtrated and evaporated. The crude product was dissolved in MeOH (5 ml) and then a solution of HCl 4N in methanol was added until pH 4-5 and concentrated to give **217** (42%) as white foam. IR (cm⁻¹): 3300, 2987, 1688, 1540, 1469, 1384. Anal. Calcd for C₁₅H₂₇ClF₃N₃O₃ + 1.5 H₂O: C, 43.21; H, 7.27; N, 10.08; found C, 43.44; H, 7.15; N, 10.69. MS (ESI⁺): m/z 416 (M+Na)⁺. *One diastereomer* : ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) □ □ 0.85 (d, ³J_{H,H} = 7.2 Hz, 3H, CH₃), 0.95 (d, ³J_{H,H} = 7.2 Hz, 3H, CH₃), 1.38 (s, 9H, CH₃), 1.61 (m, 1H, CH_{cyclopropane}), 2.11 (m, 1H, CH), 2.50 (m, 1H, CH_{cyclopropane}), 3.06 (m, 1H, CH_{cyclopropane}), 3.28 (m, 1H, CH₂-NH-), 3.52 (m, 1H, CH₂-NH), 3.76 (m, 1H, CH), 6.73 (d, ³J_{H,H} = 6.4 Hz, 1H, NH-Boc), 8.52 (1H, m, NH-CO), 9.16 (3H, NH₃); ¹³C NMR (100

MHz, DMSO-*d*₆) □ 17.9 (CH₃), 18.2 (CH₃), 19.5 (CH_{cyclopropane}), 21.9 (q, ²J_{C,F}= 30 Hz, CH_{cyclopropane}), 28.0 (CH_{cyclopropane}), 28.1 (CH₃), 29.4 (CH), 34.7 (CH₂-NH-), 60.0 (CH_{α-Val}), 78.0 (C_{quater Boc}), 124.7 (q, ¹J_{C,F}= 271 Hz, CF₃), 156.0 (CO_{Boc}), 172.2 (CO_{valine}); ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) □ -68.3 (d, ³J_{F,H}= 6.1 Hz, CF₃). *Second diastereomer*: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) □ 0.83 (d, ³J_{H,H}= 7.2 Hz, 3H, CH_{3 valine}), 0.95 (d, ³J_{H,H}= 7.2 Hz, 3H, CH_{3 valine}), 1.38 (s, 9H, CH_{3Boc}), 1.68 (m, 1H, CH_{cyclopropane}), 1.95 (m, 1H, CH_{valine}), 2.50 (m, 1H, CH_{cyclopropane}), 3.06 (m, 1H, CH_{cyclopropane}), 3.39 (m, 1H, CH₂-NH), 3.59 (m, 1H, CH_{α-Val}), 3.69 (m, 1H, CH₂-NH), 6.73 (m, 1H, NH-Boc), 8.45 (1H, m, NH-CO), 9.15 (3H, NH₃). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) 18.0 (CH_{3 valine}), 18.3 (CH_{3 valine}), 19.1 (CH_{cyclopropane}), 21.9 (q, ²J_{C,F}= 30 Hz, CH_{cyclopropane}), 28.0 (CH_{cyclopropane}), 28.1 (CH_{3Boc}), 30.1 (CH_{valine}), 34.7 (CH₂-NH-), 57.7 (CH_{α-Val}), 78.0 (C_{Boc}), 124.7 (q, ¹J_{C,F}= 271 Hz, CF₃), 155.4 (CO_{Boc}), 172.4 (CO_{valine}). ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO) -68.4 (d, ³J_{H,F}= 6.1 Hz, CF₃).

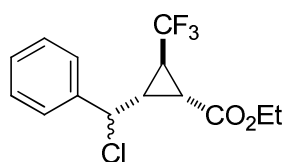
Ethyl 2-[hydroxy(phenyl)methyl]-3-(trifluoromethyl)cyclopropanecarboxylate **220/221**



CeCl₃·7H₂O (64 mg, 0.17 mmol, 1 equiv) was added to a solution of **204-cis/204-trans** (7:3) (50 mg, 0.17 mmol, 1 equiv) in a solution of EtOH:H₂O (0.5ml:0.75ml). Then NaBH₄ (16 mg, 0.425 mmol, 2.5 equiv) was added to a stirred solution at 0°C. The reaction was stirred at room temperature over night. The reaction was quenched with saturated Ammonium Chloride solution and extracted with Et₂O (10 ml). The combined organic phases were dried (MgSO₄) and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography [TLC (Cyclohexane/EtOAc:8/2)] to give **220** and **221** as yellow liquids, difficult to separate (25.0 mg, 0.087 mmol, 41% of **220**, 10% of **221**). IR (cm⁻¹): 3506 (OH), 1703 (C=O), 1140 (C-O). Anal. Calcd for C₁₄H₁₅F₃O₃: C, 58.33; H, 5.24; found C, 58.81; H, 5.61. Diastereomer **221**: Rf: 0.20 (Cyclohexane/EtOAc:8/2). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.20 (t, ³J_{H,H}= 7.1 Hz, 3H, CH_{3 ester}), 2.02 (ddd, ³J_{H,H}= 6.2; 6.4; 9.2 Hz, 1H, CH_{cyclopropane}), 2.25 (dd, ³J_{H,H}= 5.2 Hz; 9.6 Hz, 1H, CH_{cyclopropane}), 2.37 (sext., ³J_{H,H}= 6.0 Hz, 1H, CH_{cyclopropane}), 4.15 (q, ³J_{H,H}= 7.1 Hz, 2H, CH_{2 ester}), 4.73 (d, ²J_{H,H}= 9.6 Hz, 1H, CH-OH), 7.37 – 7.28 (m, 5H, CH_{phenyl}); ¹³C NMR_a (75 MHz, CDCl₃) δ 14.0 (CH_{3 ester}), 22.0 (CH_{cyclopropane}), 26.2 (q, ²J_{C,F}= 36.7 Hz,

CH_{cyclopropane}), 30.5 (CH_{cyclopropane}), 61.8 (CH₂ ester), 70.4 (CH-OH), 124.7 (q, ¹J_{C,F} = 271.5 Hz, CF₃), 125.7 (CH_{phenyl}), 128.2 (CH_{phenyl}), 128.7 (CH_{phenyl}), 142.5 (C_{phenyl}), 170.2 (CO); ¹⁹F NMR_a (188 MHz, CDCl₃) δ -67.32 (d, ³J_{H,F} = 6.2 Hz, CF₃). Diastereomer **220**: Rf: 0.16 (Cyclohexane/EtOAc:8/2). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.12 (t, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, 3H, CH₃ ester), 1.92-2.05 (m, 2H, CH_{cyclopropane}), 2.30 (m, 1H, CH_{cyclopropane}), 4.03 (q, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, 2H, CH₂ ester), 4.49 (d, ²J_{H,H} = 9.1 Hz, 1H, CH-OH), 7.36 – 7.27 (m, 5H, CH_{phenyl}). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 14.0 (CH₃ester), 22.4 (CH_{cyclopropane}), 26.5 (q, ²J_{C,F} = 36.75 Hz, CH_{cyclopropane}), 26.7 (CH_{cyclopropane}), 61.5 (CH₂ ester), 71.6 (CH-OH), 125.3 (q, ¹J_{C,F} = 271.5 Hz, CF₃), 125.7 (CH_{phenyl}), 128.2 (CH_{phenyl}), 128.8 (CH_{phenyl}), 142.3 (C_{phenyl}), 170.2 (CO). ¹⁹F NMR (188 MHz, CDCl₃) δ -60.21 (d, ³J_{H,F} = 7.5 Hz, CF₃).

Ethyl 2-[chloro(phenyl)methyl]-3-(trifluoromethyl)cyclopropanecarboxylate **222**



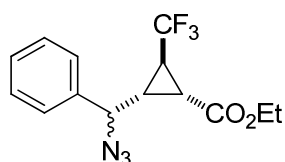
C₁₄H₁₄ClF₃O₂

MW = 306.71 g/mol

Triethylamine (137 mg, 1.36 mmol, 3 equiv) was added to a stirred solution of **220** (130.0 mg, 0.45 mmol, 1equiv) in dry CH₂Cl₂ (5ml) and stirred at room temperature for 5 min. Then SOCl₂ (162 mg, 1.36 mmol, 3 equiv) was added at 0°C and then warm at room temperature. The reaction was quenched with saturated ammonium chloride solution (10 ml) and extracted with CH₂Cl₂. The combined organic phases were dried (MgSO₄) and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography [TLC (Cyclohexane/EtOAc:9.5/0.5)] to give mixture of diastereoisomers (dr 6/4) of **222** as transparent liquid (88.0 mg, 0.287 mmol, 64%). IR (cm⁻¹): 1713 (C=O), 1138 (C-O). Anal. Calcd for C₁₄H₁₄ClF₃O₂: C, 54.82; H, 4.60; found C, 55.04; H, 5.10. Mixture of isomers (a/b): ¹H NMR_{a+b} (300 MHz, CDCl₃) δ 1.03 (t, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, 1.8H, CH₃^b ester), 1.28 (t, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, 1.2H, CH₃^a ester), 2.20 (dd, ³J_{H,H} = 9.7, 5.3 Hz, 0.6H, CH_{cyclopropane}), 2.40 – 2.26 (m, 2H, CH_{cyclopropane}), 2.50 (qd, ³J_{H,F} = 6.2, ³J_{H,H} = 12.3 Hz, 0.4H, CH_{cyclopropane}), 3.99 (q, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, 1.2H, -CH₂^b ester), 4.22 (m, 0.8H, -CH₂^a ester), 4.99 (m, 1H, -CH-Cl), 7.42 – 7.20 (m, 5H, CH_{phenyl}); ¹³C NMR_{a+b} (75 MHz, CDCl₃) δ 14.33/14.53 (CH₃ester), 23.68/24.68 (CH_{cyclopropane}), 29.03 (q, ²J_{H,H} = 38.4 Hz, CH_{cyclopropane}^a), 30.14 (q, ²J_{H,H} = 37.9 Hz, CH_{cyclopropane}^b), 31.49/31.60 (CH_{cyclopropane}), 58.66/58.83 (CH-Cl), 62.05/62.34 (CH₂ ester), 124.35 (q, ¹J_{C,F} =

271.7 Hz, CF₃^a), 124.63 (q, ¹J_{C,F}= 272.24 Hz, CF₃^b), 127.28/127.33 (CH_{phenyl}), 129.20/129.32 (CH_{phenyl}), 139.80/140.21 (C_{phenyl}), 169.22/170.02 (CO); ¹⁹F NMR_a (188 MHz, CDCl₃) δ -67.46 (d, ³J_{H,F}= 5.5 Hz, CF₃), -67.31 (d, ³J_{H,F}= 6.2 Hz, CF₃).

Ethyl 2-(2-azido-1-phenyl-ethyl)-3-(trifluoromethyl)cyclopropanecarboxylate **223**

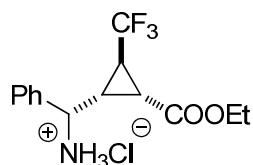


C₁₄H₁₄F₃N₃O₂

MW= 313.28 g/mol

Sodium azide (78.01 mg, 1.2 mmol, 6 equiv) was added to a stirred solution of mixture of **222** (62.00 mg, 0.20 mmol, 1 equiv) in dry DMF at room temperature, with a catalytic amount of KI (20%). After, the mixture was warmed at reflux. The reaction was followed by GC analysis for 5h. The reaction was quenched with saturated ammonium chloride solution and extracted with Et₂O. The combined organic phases were dried (MgSO₄) and concentrated under reduced pressure. The residue was not purified and the compound **223** was obtained as a mixture of inseparable diastereoisomers in a 6/4 ratio (28.0 mg, 0.089 mmol, 45%). IR (cm⁻¹): 2099 (N=N), 1724 (C=O), 1131 (C-O). Anal. Calcd for C₁₄H₁₄F₃N₃O₂: C, 53.67; H, 4.50; N, 13.41; found C, 54.09; H, 4.89; N, 13.07. Mixture of isomers : ¹H NMR_{a+b} (300 MHz, CDCl₃) δ 7.31 – 7.15 (m, 5H, CH_{phenyl}), 4.58 (d, ³J_{H,H} = 10.3 Hz, 0.6H, -CH^a-N₃), 4.54 (d, ³J_{H,H} = 9.8 Hz, 0.4H, -CH^b-N₃), 4.22 (q, ³J_{H,H} = 7.2 Hz, 0.8H, -CH₂^a_{ester}), 4.00 (q, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, 1.2H, -CH₂^b_{ester}), 2.51 (m, 0.4H, CH_{cyclopropane}), 2.37–2.22 (m, 1.6H, CH_{cyclopropane}), 2.06 (m, 1H, CH_{cyclopropane}), 1.29 (t, ³J_{H,H} = 7.2 Hz, 1.2H, CH₃^a_{ester}), 1.06 (t, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, 1.8H, CH₃^b_{ester}); ¹³C NMR_{a+b} (75 MHz, CDCl₃) δ 13.94/14.08 (CH₃_{ester}), 21.56/22.30 (CH_{cyclopropane}), 26.76 (q, ²J_{F,H} = 38.68 Hz, CH_{cyclopropane}^a), 27.29 (q, ²J_{F,H} = 37.42 Hz, CH_{cyclopropane}^b), 28.68/29.69 (CH_{cyclopropane}), 61.63/61.87 (CH-N₃), 62.08/62.75 (CH₂_{ester}), 122.49 (q, ¹J_{F,H} = 270 Hz, CF₃), 124.24 (q, ¹J_{F,H} = 272 Hz, CF₃), 126.72/126.86 (CH_{phenyl}), 128.82/128.97 (CH_{phenyl}), 129.09 (CH_{phenyl}), 137.72/138.02 (C_{phenyl}), 169.02/169.40 (CO); ¹⁹F NMR_a (188 MHz, CDCl₃) δ -67.38 (d, ³J_{H,F}= 5.6 Hz, 0.6, CF₃), -67.21 (d, ³J_{H,F}= 6.2 Hz, 0.4, CF₃).

Ethyl 2-[amino(phenyl)methyl]-3-(trifluoromethyl)cyclopropanecarboxylate hydrochloride **224**



$C_{14}H_{17}ClF_3NO_2$

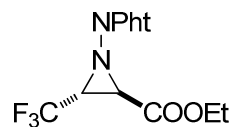
MW= 323.74 g/mol

The mixture of **223** (20 mg, 0.064 mmol, 1 equiv) was dissolved in 5 ml of EtOH, 10% of the catalyst (Pd/C) and 1 drop of HCl 1N, were added and the solution was degassed twice under vacuum (using a water pump) and refilled with hydrogen each time. The reaction mixture was left at room temperature overnight connected to a layer balloon of hydrogen. The catalyst was then filtered off, washed with EtOH, and the filtrate concentrated to give a crude product which was submitted for 1H -NMR analysis to determine the conversion; (18mg, 0.056mmol, 87%). **224** were obtained as white solid, as two diastereoisomers (6/4) that were not possible to separate, (77.0 mg, 0.30 mmol, 85%). IR (cm^{-1}): 3444 (N-H), 1724 (C=O), 1131 (C-O). Mixture of isomers : 1H NMR_{a+b} (300 MHz, MeOD) δ 1.10 (t, $^3J_{H,H}= 7.2$ Hz, 1.2H, CH_3^b ester), 1.38 (t, $^3J_{H,H}= 7.2$ Hz, 1.8H, CH_3^a ester), 2.41 (m, 2.8H, $CH_{cyclopropane}$), 2.54 (m, 1.2H, $CH_{cyclopropane}$), 2.88 (m, 0.4H, $CH_{cyclopropane}$), 4.08 (q, $^3J_{H,H}= 7.2$ Hz, 1.2H, $-CH_2^b$ ester), 4.29 (m, 0.8H, CH_2^a ester), 4.42 (d, $^3J_{H,H}= 8.9$ Hz, 0.4H, $-CH^b-NH_3^+$), 4.71 (d, $^3J_{H,H}= 9.3$ Hz, 0.6H, $-CH^a-NH_3^+$), 7.57 – 7.42 (m, 5H, CH_{phenyl}). ^{13}C NMR_{a+b} (75 MHz, MeOD) δ 14.33/14.49 (CH_3 ester), 22.43/22.65 ($CH_{cyclopropane}$), 23.68/24.68 ($CH_{cyclopropane}$), 31.49/31.60 ($CH_{cyclopropane}$), 52.39/53.66 ($-CH-NH_3^+$), 63.08/63.25 (CH_2 ester), 129.16/129.32 (CH_{phenyl}), 130.57/130.69 (C_{phenyl}), 169.02/169.40 (CO). ^{19}F NMR_a (188 MHz, MeOD) δ -69.24 (d, $^3J_{H,F}= 5.6$ Hz, 0.6, CF_3), -68.28 (d, $^3J_{H,F}= 6.2$ Hz, 0.4, CF_3).

General Procedure for the Synthesis of N-aminoaziridine compounds:

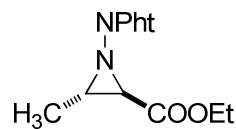
N,N-disubstitutedhydrazines (1.4 eq.) was added to a solution of alkene **188**, **225-228** (1 eq.), iodobenzene diacetate (1.5 eq.) and K_2CO_3 (2.8 eq.) in dichloromethane. The resulting solution was stirred at room temperature until the disappearance of the starting alkene (monitored by ^{19}F NMR). The reaction medium was washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered, and concentrated under reduced pressure. The resulting oil was then purified by chromatography on silica gel.

Ethyl 1-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)-3-(trifluoromethyl)aziridine-2-carboxylate 229:



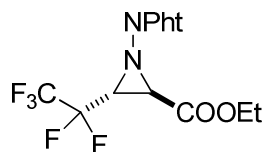
Yield: 64%. Yellow light oil. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ = 1.34 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7$ Hz, 3H, CH_3 ester), 3.61 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 4.6$ Hz, 1H, $\text{CH}_{\text{aziridine}}$), 4.20 (qd, $^3J_{\text{H,H}} = 4.6$ Hz, $^3J_{\text{H,F}} = 4.9$ Hz, 1 H, $\text{CH}_{\text{aziridine}}$), 4.22 (q, $^3J = 7$ Hz, 2H, CH_2 ester), 7.92-7.77 (m, 4H, H phthalimide) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ = 13.81 (CH_3 ester), 40.44 ($\text{CH}_{\text{aziridine}}$), 45.71 (q, $^2J_{\text{C,F}} = 41$ Hz, $\text{CH}_{\text{aziridine-CF}_3}$), 62.93 (CH_2 ester), 121.73 (q, $^1J_{\text{C,F}} = 273$ Hz, CF_3), 123.48 ($\text{CH}_{\text{phthalimide}}$), 129.83 ($\text{C}_{\text{phthalimide}}$), 134.42 ($\text{CH}_{\text{phthalimide}}$), 164.96 ($\text{C}=\text{O}_{\text{phthalimide}}$), 164.18 ($\text{C}=\text{O}_{\text{ester}}$) ppm. ^{19}F NMR (188 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ = -70.88 (d, $^3J_{\text{F,H}} = 4.9$ Hz, 3 F). $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_4$ (328): calcd. C 51.23, H 3.38, N 8.53; found C 51.62, H 3.25, N 8.64.

Ethyl 1-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)-3-(pentafluoroethyl)aziridine-2-carboxylate 230:



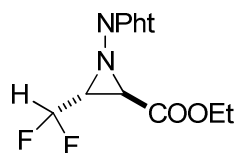
Yield: 78%. Colorless light oil. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ = 1.20 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 3H, CH_3 ester), 3.56 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 4.5$ Hz, 1H, $\text{CH}_{\text{aziridine}}$), 4.18 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 2H, CH_2 ester), 4.24 (m, 1H, $\text{CH}_{\text{aziridine}}$), 7.84-7.65 (m, 4H, $\text{H}_{\text{phthalimide}}$) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ = 13.77 (CH_3 ester), 39.29 ($\text{CH}_{\text{aziridine}}$), 42.35 (dd, $^2J_{\text{C,F}} = 24$ Hz, $^2J_{\text{C,F}} = 31$ Hz, $\text{CH}_{\text{aziridine}}$), 62.90 (CH_2 ester), 123.41 ($\text{CH}_{\text{phthalimide}}$), 129.76 ($\text{C}_{\text{phthalimide}}$), 134.38 ($\text{CH}_{\text{phthalimide}}$), 163.96 ($\text{C}=\text{O}_{\text{phthalimide}}$), 164.18 ($\text{C}=\text{O}_{\text{ester}}$) ppm. ^{19}F NMR (188 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ = -84.19 (t, $^3J_{\text{F,F}} = 1.27$ Hz, 3F, CF_3), -121.49 (ddq, $^2J_{\text{F,F}} = 276.8$ Hz, $^3J_{\text{H,F}} = 8.1$ Hz, $^3J_{\text{F,F}} = 1.27$ Hz, 1F, CF_2), -124.79 (ddq, $^2J_{\text{F,F}} = 276.8$ Hz, $^3J_{\text{H,F}} = 8.1$ Hz, $^3J_{\text{F,F}} = 1.27$ Hz, 1F, CF_2) ppm. $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{F}_5\text{N}_2\text{O}_4$ (378): calcd. C 47.63, H 2.93, N 7.41; found C 47.21, H 2.71, N 7.32

Ethyl 1-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)-3-(pentafluoroethyl)aziridine-2-carboxylate 231:



Yield: 78%. Colorless light oil. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ = 1.20 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 3H, CH_3 ester), 3.56 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 4.5$ Hz, 1H, $\text{CH}_{\text{aziridine}}$), 4.18 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 2H, CH_2 ester), 4.24 (m, 1H, $\text{CH}_{\text{aziridine}}$), 7.84-7.65 (m, 4H, $\text{H}_{\text{phthalimide}}$) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ = 13.77 (CH_3 ester), 39.29 ($\text{CH}_{\text{aziridine}}$), 42.35 (dd, $^2J_{\text{C,F}} = 24\text{Hz}$, $^2J_{\text{C,F}} = 31\text{Hz}$, $\text{CH}_{\text{aziridine}}$), 62.90 (CH_2 ester), 123.41 ($\text{CH}_{\text{phthalimide}}$), 129.76 ($\text{C}_{\text{phthalimide}}$), 134.38 ($\text{CH}_{\text{phthalimide}}$), 163.96 ($\text{C}=\text{O}_{\text{phthalimide}}$), 164.18 ($\text{C}=\text{O}_{\text{ester}}$) ppm. ^{19}F NMR (188 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ = -84.19 (t, $^3J_{\text{F,F}} = 1.27$ Hz, 3F, CF_3), -121.49 (ddq, $^2J_{\text{F,F}} = 276.8$ Hz, $^3J_{\text{H,F}} = 8.1$ Hz, $^3J_{\text{F,F}} = 1.27$ Hz, 1F, CF_2), -124.79 (ddq, $^2J_{\text{F,F}} = 276.8$ Hz, $^3J_{\text{H,F}} = 8.1$ Hz, $^3J_{\text{F,F}} = 1.27$ Hz, 1F, CF_2) ppm. $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{F}_5\text{N}_2\text{O}_4$ (378): calcd. C 47.63, H 2.93, N 7.41; found C 47.21, H 2.71, N 7.32

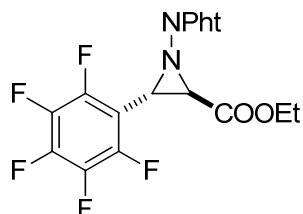
Ethyl 3-(difluoromethyl)-1-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)aziridine-2-carboxylate 232:



Yield: 58%. Yellow light oil. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ = 1.33 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7$ Hz, 3H, CH_3 ester), 3.57 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 4.8$ Hz, 1H, $\text{CH}_{\text{aziridine}}$), 3.89 (dddd, $^3J_{\text{H,H}} = 2.5\text{Hz}$, $^3J_{\text{H,H}} = 4.8\text{Hz}$, $^3J_{\text{H,F}} = 5.5\text{Hz}$, $^3J_{\text{H,F}} = 13.2$ Hz, 1H, $\text{CH}_{\text{aziridine}}$), 4.22 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7$ Hz, 2H, CH_2 ester), 6.05 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 2.5\text{Hz}$; $^2J_{\text{F,H}} = 56$ Hz, 1H, CHF_2), 6.25 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 2.5\text{Hz}$; $^2J_{\text{F,H}} = 55$ Hz, 1H, CHF_2), 7.95-7.65 (m, 4H, $\text{H}_{\text{phthalimide}}$) ppm. ^{19}F NMR (188 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ = -121.22 (ddd, $^3J_{\text{F,H}} = 5.5$ Hz, $^2J_{\text{F,H}} = 55\text{Hz}$, $^2J_{\text{F,F}} = 297$ Hz, 1F), -127.13 (ddd, $^3J_{\text{F,H}} = 13.2$ Hz; $^2J_{\text{F,H}} = 56$ Hz, $^2J_{\text{F,F}} = 297$ Hz, 1F) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ = 13.82 (CH_3 ester), 39.76 ($\text{CH}_{\text{aziridine}}$), 45.95 (dd, $^3J_{\text{C,F}} = 27$ Hz; $^3J_{\text{C,F}} = 35$ Hz, $\text{CH}_{\text{aziridine}}$), 62.56 (CH_2 ester), 111.89 (t, $^2J_{\text{C,F}} = 242$ Hz, CHF_2), 123.31 (2C, $\text{CH}_{\text{phthalimide}}$), 129.94 (C phthalimide),

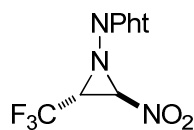
134.26 (2C, CH_{phthalimide}), 164.26 (CO_{phthalimide}), 164.92 (CO_{ester}) ppm. C₁₄H₁₂F₂N₂O₄ (310): calcd. C 54.20, H 3.90, N 9.03; found C 53.95, H 4.06, N 9.21

Ethyl 1-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)-3-(pentafluorophenyl)aziridine-2-carboxylate 233:



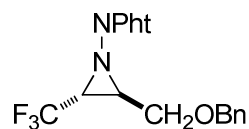
Yield: 55%. White solid, m.p. 152°C. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 1.29 (t, ³J_{H,H} = 7 Hz, 3H, CH₃_{ester}), 3.87 (d, 1H, ³J_{H,H} = 5.1 Hz, CH_{aziridine}), 4.20 (q, 2H, ³J_{H,H} = 7 Hz, CH₂_{ester}), 4.53 (d, 1H, ³J_{H,H} = 5.1 Hz, CH_{aziridine}), 7.85-7.65 (m, 4H, H_{phthalimide}) ppm. ¹⁹F NMR (188 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = -142.87 (m, 2F), -152.94 (tt, 1F, ³J_{F,F} = 2.2 Hz, ³J_{F,F} = 21 Hz), -161.75 (m, 2F) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 13.87 (CH₃_{ester}), 40.86 (CH_{aziridine}), 43.79 (CH_{aziridine}), 62.55 (CH₂_{ester}), 108.68 (C_{C6F5}), 123.51 (CH_{phthalimide}), 134.20 (C_{phthalimide}), 130.05 (CH_{phthalimide}), 136.01 (CF_{C6F5}), 139.37 (CF_{C6F5}), 143.13 (CF_{C6F5}), 164.27 (CO_{ester}), 165.51 (CO_{phthalimide}) ppm. C₁₉H₁₁F₅N₂O₄ (426): calcd. C 53.53, H 2.60, N 6.57; found C 54.13, H 2.57, N 6.61

2-[2-Nitro-3-(trifluoromethyl)aziridin-1-yl]-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-dione 236:



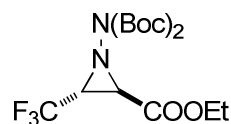
Yield: 67%. White solid, m.p. 123°C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 4.85 (broad, 1H, CH_{aziridine}-CF₃), 5.55 (broad, 1H, CH_{aziridine}-NO₂), 7.9-7.7 (m, 4H, H_{phthalimide}) ppm. ¹⁹F NMR (188 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = -69.69 (s broad, 3F, CF₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 30.89 (CH aziridine), 44.15 (q, ²J_{C,F} = 42 Hz, CH_{aziridine}), 120.55 (q, ¹J_{C,F} = 275 Hz, CF₃), 124.01 (CH_{phthalimide}), 129.42 (C_{phthalimide}), 134.96 (CH_{phthalimide}), 163.34 (C=O) ppm. C₁₁H₆F₃N₃O₄ (301) : calcd. C 43.87, H 2.01, N 13.95; found C 43.07, H 1.94, N 13.29.

2-[2-[(Benzyloxy)methyl]-3-(trifluoromethyl)aziridin-1-yl]-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-dione
237:



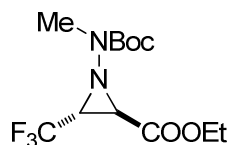
Yield: 35%. White solid, m.p. 108°C. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 3.08 (td, 1H, ³J_{H, H} = 3.9 Hz, ³J_{H, H} = 5.0 Hz, CH_{aziridine}), 3.62 (d, ³J_{H, H} = 3.9 Hz, 2H, CH₂OBn), 4.15 (qt, ³J_{H, H} = 4.9 Hz, ³J_{H, F} = 4.9 Hz, 1H, CH_{aziridine}), 4.24 (d, 1H, ³J_{H, H} = 11.7 Hz, O-CH₂-Ph), 4.32 (d, 1H, ³J_{H, H} = 11.7 Hz, O-CH₂-Ph), 7.1-6.8 (m, 5H, H_{aromatic benzyl}), 7.7-7.5 (m, 4H, H_{phthalimide}) ppm. ¹⁹F NMR (188 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = -71.09 (d, ³J_{H, F} = 4.9 Hz, 3F, CF₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 39.39 (q, ²J_{C, F} = 40Hz, CH_{aziridine}), 42.89 (CH_{aziridine}), 63.54 (CH₂), 73.23 (CH₂), 122.85 (q, ¹J_{C, F} = 273Hz, CF₃), 123.21 (2C, CH_{phthalimide}), 127.54 (CH_{benzyl}), 127.81 (CH_{benzyl}), 128.28 (CH_{benzyl}), 134.18 (CH_{phthalimide}), 130.12 (C_{phthalimide}), 136.59 (C_{benzyl}), 164.93 (C=O) ppm. C₁₉H₁₅F₃N₂O₃ (376) : calcd. C 60.64, H 4.02, N 7.44; found C 60.30, H 4.32, N 6.97.

Ethyl 1-[bis(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-3-(trifluoromethyl)aziridine-2-carboxylate **238:**



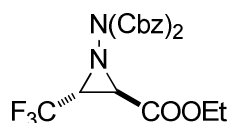
Yield 65%. Colourless oil. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 1.29 (t, ³J_{H, H} = 7 Hz, 3H, CH_{3 ester}), 1.48 (s, 18H, CH_{3 Boc}), 3.32 (d, ³J_{H, H} = 4.6 Hz, 1H, CH_{aziridine}), 3.60 (qd, ³J_{H, H} = 4.5 Hz, ³J_{H, F} = 4.9 Hz, 1H, CH_{aziridine}-CF₃), 4.30-4.05 (m, 2H, CH_{2 ester}) ppm. ¹⁹F NMR (188 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = -70.20 (d, ³J_{H, F} = 4.6 Hz, 3F, CF₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 13.86 (CH_{3 ester}), 27.77 (CH_{3 Boc}), 27.88 (CH_{3 Boc}), 43.41 (CH_{aziridine}), 48.33 (q, ³J_{C, F} = 41.4 Hz, CH_{aziridine}), 62.24 (CH_{2 ester}), 84.37 (C_{quat Boc}), 84.78 (C_{quat Boc}), 121.99 (q, ²J_{C, F} = 274 Hz, CF₃), 148.6 (CO_{Boc}), 150.41 (CO_{Boc}), 164.50 (CO_{ester}) ppm. C₁₆H₂₅F₃N₂O₆ (398): calcd. C 48.24, H 6.33, N 7.03; found C 48.61, H 5.95, N 6.87.

Ethyl 1-[(*tert*-butoxycarbonyl)(methyl)amino]-3-(trifluoromethyl)aziridine-2-carboxylate 239:



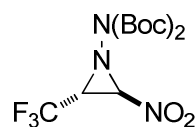
Yield 37%. Colourless oil. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ = 1.30 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7$ Hz, 3H, CH_3 ester), 1.42 (s, 9H, CH_3 Boc), 2.93 (s, 3H, CH_3 -N), 3.32 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 4.5$ Hz, 1H, $\text{CH}_{\text{aziridine}}$), 3.45 (qd, $^3J_{\text{H,H}} = 4.5$ Hz, $^3J_{\text{H,F}} = 4.9$ Hz, 1H, $\text{CH}_{\text{aziridine}}$), 4.21 (m, 2H, CH_2 ester) ppm. ^{19}F NMR (188 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ = -70.94 (d, $^3J_{\text{H,F}} = 4.9$ Hz, 3F, CF_3) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ = 13.87 (CH_3 ester), 28.11 (CH_3 Boc), 35.41 (CH_3 -N), 44.20 ($\text{CH}_{\text{aziridine}}$), 45.40 (q, $^3J_{\text{C,F}} = 40$ Hz, $\text{CH}_{\text{aziridine}}$), 62.12 (CH_2 ester), 81.58 (C_{quat} Boc), 122.13 (q, $^2J_{\text{C,F}} = 273$ Hz, CF_3), 154.83 (CO_{Boc}), 164.02 (CO_{ester}) ppm. $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_4$ (312): calcd. C 46.15, H 6.13, N 8.97; found C 46.52, H 6.54, N 8.41.

Ethyl 1-[bis(benzyloxycarbonyl)amino]-3-(trifluoromethyl)aziridine-2-carboxylate 240:



Yield 76%. Colourless oil. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ = 1.12 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.2$ Hz, 3H, CH_3 ester), 3.33 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 4.7$ Hz, 1H, $\text{CH}_{\text{aziridine}}$), 3.61 (qd, $^3J_{\text{H,H}} = 4.7$ Hz, $^3J_{\text{H,F}} = 4.8$ Hz, 1H, $\text{CH}_{\text{aziridine}}\text{-CF}_3$), 3.95 (m, 2H, CH_2 ester), 5.11 (d, $^2J_{\text{H,H}} = 12.2$ Hz, 2H, CH_2 benzyl), 5.21 (d, $^2J_{\text{H,H}} = 12.2$ Hz, 2H, CH_2 benzyl), 7.33-7.45 (m, 10H, H aromatic) ppm. ^{19}F NMR (188 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ = -70.53 (d, $^3J_{\text{H,F}} = 4.8$ Hz, 3F, CF_3) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ = 13.79 (CH_3 ester), 43.50 ($\text{CH}_{\text{aziridine}}$), 48.51 (q, $^3J_{\text{C,F}} = 40.6$ Hz, $\text{CH}_{\text{aziridine}}$), 62.43 (CH_2 ester), 69.49 (O- CH_2 -Ph), 121.95 (q, $^2J_{\text{C,F}} = 273.5$ Hz, CF_3), 128.41 (CH aromatic), 128.54 (CH aromatic), 128.57 (CH aromatic), 134.52 ($\text{C}_{\text{aromatic}}$), 151.35 (CO_{Cbz}), 164.37 (CO_{ester}) ppm. $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_6$ (466): calcd. C 56.65, H 4.54, N 6.01; found C 56.78, H 4.41, N 6.12.

Di-*tert*-butyl [2-nitro-3-(trifluoromethyl)aziridin-1-yl]imidodicarbonate 241:

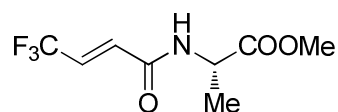


Yield 57%. White solid, m.p. 80°C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 1.52 (s, 18H, CH₃ Boc), 4.18 (qd, ³J_{H, H} = 2.8 Hz, ³J_{H, F} = 4.9 Hz, 1H, CH_{aziridine}), 5.35 (d, ³J_{H, H} = 2.8 Hz, 1H, CH_{aziridine}) ppm. ¹⁹F NMR (188 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = -68.56 (d, ³J_{H, F} = 4.9 Hz, 3F, CF₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 27.74 (CH₃ Boc), 48.08 (q, ²J_{C, F} = 41 Hz, CH_{aziridine}), 72.05 (CH_{aziridine}), 85,73 (C_{quat} Boc), 120.70 (q, ¹J_{C, F} = 275 Hz, CF₃), 149.58 (CO Boc) ppm. C₁₃H₂₀F₃N₃O₆ (371): calcd. C 42.05, H 5.43, N 11.32; found C 42.38, H 5.49, N 11.03.

General procedure for the synthesis of products 243a-c:

To a solution of trifluorocrotonic acid (1.0 eq.) in DMF, was added the amino acid methyl ester hydrochloride (1.2 eq.), DIPEA (4.0 eq.), HBTU (1.2 eq), and HOBT (1.2 eq.) in this order. The mixture was stirred overnight at room temperature under argon atmosphere. The solvent was evaporated under vacuum and the residue dissolved in ethyle acetate. The organic layer was washed with 10% citric acid aqueous solution (2 times), water, 10% K₂CO₃ aqueous solution (2 times) and brine, dried over Na₂SO₄, filtrated and evaporated. The crude product was purified by column chromatography (EtOAc/cyclohexane: 3/7) to afford the correspondind alkene.

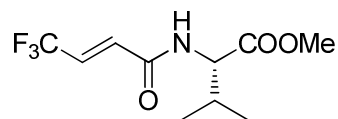
Methyl (2*S*)-2-[[*(2E)*-4,4,4-trifluorobut-2-enoyl]amino]propanoate 243a:



Yield 81%. Colourless solid, m.p. 156°C. [α]_D²⁵ = +35 (C = 1, CH₂Cl₂). ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 1.45 (d, ³J_{H, H} = 7.2 Hz, 3H, CH₃), 3.75 (s, 3H, CH₃ ester), 4.68 (qt, ³J_{H, H} = 7.2 Hz, 1H, CH_α-CH₃), 6.61 (dq, ³J_{H, H} = 15.4 Hz, ⁴J_{H, F} = 1.4 Hz, 1H, CH_{alkene}), 6.76 (dq, ³J_{H, H} = 15.4 Hz, ³J_{H, F} = 6.4 Hz, 1H, CH_{alkene}-CF₃), 7.02 (d_{broad}, ³J_{H, H} = 7.2 Hz, 1H, NH) ppm. ¹⁹F NMR (188 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = -65.56 (dd, ⁴J_{H, F} = 1.4 Hz, ³J_{H, F} = 6.4 Hz, 3F, CF₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 18.21 (CH₃), 48.44 (CH_α), 52.69 (CH₃ ester), 124.19 (q, ¹J_{C, F} = 280 Hz, CF₃), 128.86 (q, ²J_{C, F} = 36 Hz, CH-CF₃), 130.40 (q, ³J_{C, F} = 5.5 Hz, CH_{alkene}),

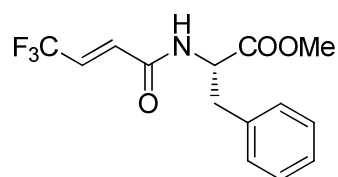
162.03 (CO_{amide}), 173.14 (CO_{ester}) ppm. C₈H₁₀F₃NO₃ (225) : calcd. C 42.67, H 4.48, N 6.22; found C 42.61, H 4.52, N 6.31.

Methyl (2S)-3-methyl-2-[[*(2E)*-4,4,4-trifluorobut-2-enoyl]amino]butanoate 243b:



Yield 78%. Colourless solid, m.p. 178°C. $[\alpha]_D^{25} = +78$ (C = 1, CH₂Cl₂). ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 0.85 (d, ³J_{H,H} = 6.1 Hz, 3H, CH₃), 0.95 (d, ³J_{H,H} = 6.1 Hz, 3H, CH₃), 2.22 (m, 1H, CH_{isopropyl}), 3.73 (s, 3H, CH₃ ester), 4.66 (dd, ³J_{H,H} = 5.2 Hz, ³J_{H,H} = 8.9 Hz, 1H, CH_α), 6.62 (dq, ³J_{H,H} = 15.3 Hz, ⁴J_{H,F} = 1.5 Hz, 1H, CH_{alkene}), 6.73 (dq, ³J_{H,H} = 15.3 Hz, ³J_{H,F} = 6.8 Hz, 1H, CH_{alkene}-CF₃), 7.15 (d_{broad}, ³J_{H,H} = 8.9 Hz, 1H, NH) ppm. ¹⁹F NMR (188 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = -65.55 (dd, ⁴J_{H,F} = 1.5 Hz, ³J_{H,F} = 6.8 Hz, 3F, CF₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25 °): δ = 17.82 (CH₃), 18.08 (CH₃), 30.15 (CH_{isopropyl}), 51.42 (CH_α), 56.34 (OCH₃), 48.44 (CH₃ester), 52.69 (CH_α), 56.03 (OCH₃ ester), 123.48 (q, ¹J_{C,F} = 278 Hz, CF₃), 128.82 (q, ²J_{C,F} = 38 Hz, CH-CF₃), 129.87 (q, ³J_{C,F} = 5.7 Hz, CH_{alkene}), 161.73 (CO_{amide}), 172.84 (CO_{ester}) ppm. C₁₀H₁₄F₃NO₃ (253) : calcd. C 47.43, H 5.57, N 5.53; found C 47.84, H 5.52, N 5.41.

Methyl (2S)-3-phenyl-2-[[*(2E)*-4,4,4-trifluorobut-2-enoyl]amino]propanoate 243c:

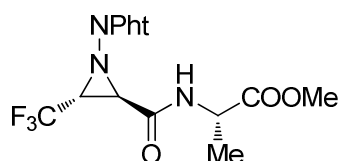


Yield 76%. White solid. M.p. 102°C. $[\alpha]_D^{25} = +128$ (C = 1, MeOH). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25°C) : δ = 3.07 (dd, ³J_{H,H} = 5.7, ²J_{H,H} = 13.9 Hz, 1H, CH_{2a}), 3.15 (dd, ³J_{H,H} = 5.7, ²J_{H,H} = 13.9 Hz, 1H, CH_{2b}), 3.69 (s, 3H, CH₃ester), 4.90 (dd, ³J_{H,H} = 5.7 Hz, ³J_{H,H} = 13.9 Hz, 1H, CH-CH₂), 6.32 (d, ³J_{H,H} = 6.6 Hz, 1H, NH), 6.42 (dq, ³J_{H,H} = 15.6 Hz, ⁴J_{H,F} = 1.2 Hz, 1H, CH=CO), 6.62 (qd, ³J_{H,F} = 6.7 Hz, ³J_{H,H} = 15.6 Hz, 1H, CH=CF₃), 7.01 (d, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, 2H, CH_{aromatic}), 7.19 (m, 3H, CH_{aromatic}) ppm. ¹⁹F NMR (188 MHz, CDCl₃, 25°C) : δ = 65.53 (dd, ³J_{H,F} = 6.7 Hz, ⁴J_{H,F} = 1.2 Hz, CF₃), ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25°C) : δ = 37.6 (CH₂), 52.6

(CH₃ester), 53.5 (CH-CH₂), 122.3 (q, ¹J_{C,F} = 270.8 Hz, CF₃), 129.1 (q, ³J_{C,F} = 35 Hz, CH-CF₃), 129.2 ; 129.7 (CH_{aromatic}), 130.1 (q, ⁴J_{C,F} = 5.7 Hz, CH-CO), 135.3 (C_{aromatic}), 161.9 (CO_{amide}), 171.5 (CO_{ester}) ppm. C₁₄H₁₄F₃NO₃ (301.26) : calcd. C 55.82, H 4.68, N 4.65 ; found C 55.98 H 4.83, N 4.63. MS : ESI + (M+Na) = 324.

Products 244a-d were synthesized using the general procedure for the synthesis of N-aminoaziridines:

Methyl (2S)-2-([1-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)-3-(trifluoromethyl)aziridin-2-yl]carbonyl)amino)propanoate 244a:

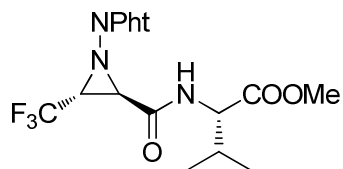


Yield 68%. C₁₆H₁₄F₃N₃O₅ (385): calcd. C 49.88, H 3.66, N 10.91; found C 50.07, H 3.65, N 10.38.

Diastereoisomer A: White solid, m.p. 198°C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 1.25 (d, ³J_{H,H} = 7.3 Hz, 3H, CH₃), 3.53 (d, ³J_{H,H} = 4.5 Hz, 1H, CH_{aziridine}), 3.76 (s, 3H, CH₃ ester), 4.35 (dq, ³J_{H,H} = 4.5 Hz, ³J_{H,H} = 4.9 Hz 1H, CH-CF₃), 4.50 (qt, ³J_{H,H} = 7.3 Hz CH_α), 7.26 (d_{broad}, ³J_{H,H} = 7.3 Hz, 1H, NH), 7.67-7.77 (m, 4H, CH_{phthalimide}) ppm. ¹⁹F NMR (188 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = -70.54 (d, ³J_{H,F} = 4.9 Hz, 3F, CF₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25 °): δ = 17.15 (CH₃), 42.43 (CH_{aziridine}), 43.15 (q, ²J_{C,F} = 40 Hz, CH_{aziridine}-CF₃), 48.87 (CH_α), 52.72 (OCH₃), 121.92 (q, ¹J_{C,F} = 272 Hz, CF₃), 123.27 (CH_{phthalimide}), 129.91 (C_{phthalimide}), 134.28 (CH_{phthalimide}), 161.09 (CO_{phthalimide}), 164.11 (CO_{amide}), 172.82 (CO_{ester}) ppm. [α]_D²⁵ = + 96 (C = 1, CH₂Cl₂).

Diastereoisomer B: : White solid, m.p. 224°C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 1.31 (d, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 3H, CH₃), 3.33 (d, ³J_{H,H} = 4.6 Hz, 1H, CH_{aziridine}), 3.65 (s, 3H, CH₃ ester), 4.28 (dq, ³J_{H,H} = 4.6 Hz, ³J_{H,H} = 4.8 Hz 1H, CH-CF₃), 4.42 (qt, ³J_{H,H} = 7.4 Hz CH_α), 7.15 (d_{broad}, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 1H, NH), 7.54-7.68 (m, 4H, CH_{phthalimide}) ppm. ¹⁹F NMR (188 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = -70.73 (d, ³J_{H,F} = 4.8 Hz, 3F, CF₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25 °): δ = 16.93 (CH₃), 41.61 (CH_{aziridine}), 42.74 (q, ²J_{C,F} = 41 Hz, CH_{aziridine}-CF₃), 48.58 (CH_α), 52.19 (OCH₃), 121.13 (q, ¹J_{C,F} = 274 Hz, CF₃), 123.17 (CH_{phthalimide}), 129.80 (C_{phthalimide}), 134.20 (CH_{phthalimide}), 161.75 (CO_{phthalimide}), 164.27 (CO_{amide}), 172.93 (CO_{ester}) ppm.

Methyl (2*S*)-2-([1-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)-3-(trifluoromethyl)aziridin-2-yl]carbonyl)amino)-3-methylbutanoate 244b:

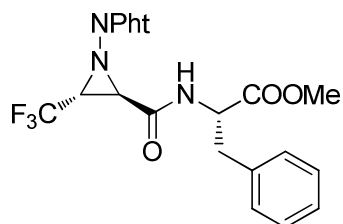


Yield 64%. C₁₈H₁₈F₃N₃O₅ (413) : calcd. C 52.30, H 4.39, N 10.17; found C 52.01, H 4.12, N 10.47.

Diastereoisomer A: Colourless oil. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 0.87 (d, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 3H, CH₃), 0.92 (d, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 3H, CH₃), 2.09 (m, 1H, CH_{isopropyl}), 3.64 (d, ³J_{H,H} = 4.6 Hz, 1H, CH_{aziridine}), 3.75 (s, 3H, CH₃ ester), 4.44 (m, 2H, CH-CF₃, CH_α), 7.45 (d_{broad}, ³J_{H,H} = 8.6 Hz, 1H, NH), 7.59-7.81 (m, 4H, CH_{phthalimide}) ppm. ¹⁹F NMR (188 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = -70.77 (d, ³J_{H,F} = 4.9 Hz, 3F, CF₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25 °): δ = 17.68 (CH₃), 18.47 (CH₃), 31.44 (CH_{isopropyl}), 42.11 (CH_{aziridine}), 42.95 (q, ²J_{C,F} = 41 Hz, CH_{aziridine}-CF₃), 52.48 (CH_α), 58.08 (OCH₃), 121.76 (q, ¹J_{C,F} = 273 Hz, CF₃), 123.26 (CH_{phthalimide}), 129.90 (C_{phthalimide}), 134.30 (CH_{phthalimide}), 161.84 (CO_{phthalimide}), 164.19 (CO_{amide}), 172.21 (CO_{ester}) ppm. [α]_D²⁵ = + 67 (c = 1, CH₂Cl₂)

Diastereoisomer B: White solid, m.p. 206 °C. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 0.92 (d, ³J_{H,H} = 7.2 Hz, 3H, CH₃), 0.96 (d, ³J_{H,H} = 7.2 Hz, 3H, CH₃), 2.15 (m, 1H, CH_{isopropyl}), 3.55 (d, ³J_{H,H} = 4.5 Hz, 1H, CH_{aziridine}), 3.72 (s, 3H, CH₃ ester), 4.38 (m, 2H, CH-CF₃ and CH_α), 7.19 (d_{broad}, ³J_{H,H} = 8.1 Hz, 1H, NH), 7.65-7.78 (m, 4H, CH_{phthalimide}) ppm. ¹⁹F NMR (188 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = -70.69 (d, ³J_{H,F} = 4.9 Hz, 3F, CF₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25 °): δ = 18.07 (CH₃), 18.72 (CH₃), 31.16 (CH_{isopropyl}), 42.08 (CH_{aziridine}), 42.10 (q, ²J_{C,F} = 40.6 Hz, CH_{aziridine}-CF₃), 52.31 (CH_α), 58.34 (OCH₃), 122.55 (q, ¹J_{C,F} = 274 Hz, CF₃), 123.33 (CH_{phthalimide}), 129.98 (C_{phthalimide}), 134.18 (CH_{phthalimide}), 162.01 (CO_{phthalimide}), 164.08 (CO_{amide}), 171.29 (CO_{ester}) ppm. [α]_D²⁵ = -51 (c = 1, CH₂Cl₂)

Methyl (2*S*)-2-([1-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)-3-(trifluoromethyl)aziridin-2-yl]carbonyl)amino)-3-phenylpropanoate 244c:

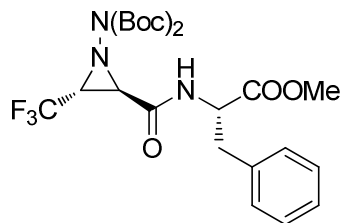


Yield 72%. White foam. The two diastereoisomers were separated.

Diastereoisomer A: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , 25°C) : δ = 2.93 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 5.9$ Hz, $^2J_{\text{H,H}} = 13.7$ Hz, 1H, $\text{CH}_{2\text{a}}$), 3.10 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 4.7$ Hz, $^2J_{\text{H,H}} = 13.9$ Hz, 1H, $\text{CH}_{2\text{b}}$), 3.43 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 4.0$ Hz, 1H, $\text{CH}_{\text{aziridine}}$), 3.68 (s, 3H, $\text{CH}_{3\text{ester}}$), 4.35 (m, 1H, $\text{CH}_{\text{aziridine}}$), 4.83 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 5.2$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 7.8$ Hz, 1H, $\underline{\text{CH}}\text{-CH}_2$), 6.92 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.3$ Hz, 1H, NH), 7.27 (m, 5H, $\text{CH}_{\text{aromatic}}$), 7.71 (m, 4H, $\text{CH}_{\text{phthalimide}}$) ppm. ^{19}F NMR (188 MHz, CDCl_3 , 25°C) : δ = 70.26 (m, CF_3) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , 25°C) : δ = 37.9 (CH_2), 41.9 ($\text{CH}_{\text{aziridine}}$), 43.0 (q, $^3J_{\text{C,F}} = 43.2$ Hz, $\underline{\text{CH}}\text{-CF}_3$), 52.4 (CH-CH_2), 53.6 ($\text{CH}_{3\text{ester}}$), 123.3 ; 123.4 ($\text{CH}_{\text{aromatic}}$), 123.8 (q, $^1J_{\text{C,F}} = 272.1$, CF_3), 128.7 ; 128.9 ($\text{CH}_{\text{phthalimide}}$), 129.4 ($\text{C}_{\text{aromatic}}$), 134.2 ($\text{CH}_{\text{phthalimide}}$), 135.1 ($\text{C}_{\text{phthalimide}}$), 163.3 ($\text{CO}_{\text{phthalimide}}$), 164.0 (CO_{ester}), 171.1 (C_{amide}) ppm.

Diastereoisomer B: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , 25°C) : δ = 3.05 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 5.6$ Hz, $^2J_{\text{H,H}} = 13.7$ Hz, 1H, $\text{CH}_{2\text{a}}$), 3.17 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 14$ Hz, 1H, $\text{CH}_{2\text{b}}$), 3.54 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 4.5$ Hz, 1H, $\text{CH}_{\text{aziridine}}$), 3.64 (s, 3H, $\text{CH}_{3\text{ester}}$), 4.38 (m, 1H, $\text{CH}_{\text{aziridine}}$), 4.72 (m, 1H, CH-CH_2), 6.83 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.9$ Hz, 1H, NH), 7.25 (m, 5H, $\text{CH}_{\text{aromatic}}$), 7.75 (m, 4H, $\text{CH}_{\text{phthalimide}}$) ppm. ^{19}F NMR (188 MHz, CDCl_3 , 25°C) : δ = 70.38 (m, CF_3) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , 25°C) : δ = 37.3 (CH_2), 41.7 ($\text{CH}_{\text{aziridine}}$), 43.4 (q, $^3J_{\text{C,F}} = 43.2$ Hz, $\underline{\text{CH}}\text{-CF}_3$), 52.6 (CH-CH_2), 54.2 ($\text{CH}_{3\text{ester}}$), 123.4 ; 127.4 ($\text{CH}_{\text{aromatic}}$), 128.6 ; 129.1 ($\text{CH}_{\text{phthalimide}}$), 130.0 ($\text{C}_{\text{aromatic}}$), 134.2 ($\text{CH}_{\text{phthalimide}}$), 135.2 ($\text{C}_{\text{phthalimide}}$), 161.5 ($\text{CO}_{\text{phthalimide}}$), 164.2 (CO_{ester}), 171.3 (CO_{amide}) ppm.

Methyl (2S)-2-([1-(bis(*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-(trifluoromethyl)aziridin-2-yl]carbonyl)amino)-3-phenylpropanoate 244d:



Yield 79%. White foam. Mixture of diastereoisomers in a 1:1 ratio. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ = 1.50 (s, 9H, CH_3 Boc), 1.52 (s, 9H, CH_3 Boc), 3.14 (m, 2H, CH_2 -CH), 3.27 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 4.5$ Hz, 1H, $\text{CH}_{\text{aziridine}}$), 3.65 (s, 1.5H, CH_3 ester dia1), 3.72 (s, 1.5H, CH_3 ester dia 2), 3.74 (m, 1H, $\text{CH}_{\text{aziridine}}$), 4.85 (m, 1H, CH - CH_2), 7.09 (m, 1H, NH), 7.27 (m, 5H, $\text{CH}_{\text{aromatic}}$) ppm. ^{19}F NMR (188 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ = 69.51 (m, CF_3 dia 1), 69.59 (m, CF_3 dia 2) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ = 27.9 ; 28.0 (CH_3 Boc), 37.9 ; 38.0 (CH_2), 44.8 ($\text{CH}_{\text{aziridine}}$), 52.2 (CH_{ester}), 52.3 (CH - CF_3), 84.3 ; 84.9 (C_{quat} Boc), 127.0 (q, $^1J_{\text{C,F}} = 272.0$ Hz, CF_3), 128.6 ; 128.7 ; 129.2 ($\text{CH}_{\text{aromatic}}$), 148.3 (CO_{boc}), 150.9 (CO_{Boc}), 164.3 (CO_{ester}), 171.2 (CO_{amide}) ppm. $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_7$ (571.52) : calcd. C 54.23, H 6.07, N 7.91 ; found C 54.68 H 6.42, N 7.62. MS : ESI + (M+Na)= 554.

Références bibliographiques

- (1) Borissenko, L.; Groll, M. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 687–717.
- (2) Milano, A.; Iaffaioli, R. V.; Caponigro, F. *Eur. J. Cancer* **2007**, *43*, 1125–1133.
- (3) Kisselev, A. F.; van der Linden, W. A.; Overkleeft, H. S. *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 99–115.
- (4) Ciechanover, A. *Cell* **1994**, *79*, 13–21.
- (5) Kisselev, A. F.; Goldberg, A. L. *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 739–758.
- (6) Verdoes, M.; Florea, B. I.; van der Marel, G. A.; Overkleeft, H. S. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *2009*, 3301–3313.
- (7) Groll, M.; Ditzel, L.; Löwe, J.; Stock, D.; Bochtler, M.; Bartunik, H. D.; Huber, R., *Nature* **1997**, *386*, 463–471.
- (8) Groll, M.; Huber, R. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1695*, 33–44.
- (9) Groll, M.; Heinemeyer, W.; Jäger, S.; Ullrich, T.; Bochtler, M.; Wolf, D. H.; Huber, R. *PNAS* **1999**, *96*, 10976–10983.
- (10) Lowe, J.; Stock, D.; Jap, B.; Zwickl, P.; Baumeister, W.; Huber, R. *Science* **1995**, *268*, 533–539.
- (11) Unno, M.; Mizushima, T.; Morimoto, Y.; Tomisugi, Y.; Tanaka, K.; Yasuoka, N.; Tsukihara, T. *Structure* **2002**, *10*, 609–618.
- (12) Gräwert, M. A.; Gallastegui, N.; Stein, M.; Schmidt, B.; Kloetzel, P.-M.; Huber, R.; Groll, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 542–544.
- (13) Groll, M.; Nazif, T.; Huber, R.; Bogoy, M. *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 655–662.
- (14) Groll, M.; Schellenberg, B.; Bachmann, A. S.; Archer, C. R.; Huber, R.; Powell, T. K.; Lindow, S.; Kaiser, M.; Dudler, R. *Nature* **2008**, *452*, 755–758.
- (15) Groll, M.; Balskus, E. P.; Jacobsen, E. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14981–14983.
- (16) Groll, M.; Huber, R.; Potts, B. C. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5136–5141.
- (17) Groll, M.; Gallastegui, N.; Maréchal, X.; Le Ravalec, V.; Basse, N.; Richy, N.; Genin, E.; Huber, R.; Moroder, L.; Vidal, J.; Reboud-Ravaux, M. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 1701–1705.
- (18) Huber, E. M.; Groll, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8708–8720.
- (19) Lander, G. C.; Estrin, E.; Matyskiela, M. E.; Bashore, C.; Nogales, E.; Martin, A. *Nature* **2012**, *482*, 186–191.
- (20) Armon, T.; Ganoth, D.; Hershko, A. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 20723–20726.
- (21) DeMartino, G. N.; Moomaw, C. R.; Zagnitko, O. P.; Proske, R. J.; Chu-Ping, M.; Afendis, S. J.; Swaffield, J. C.; Slaughter, C. A. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 20878–20884.
- (22) Hoffman, L.; Rechsteiner, M. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 16890–16895.
- (23) Köhler, A.; Cascio, P.; Leggett, D. S.; Woo, K. M.; Goldberg, A. L.; Finley, D. *Mol. Cell* **2001**, *7*, 1143–1152.
- (24) Larsen, C. N.; Finley, D. *Cell* **1997**, *91*, 431–434.
- (25) Orłowski, R. Z.; Kuhn, D. J. *Clin Cancer Res* **2008**, *14*, 1649–1657.
- (26) D’Alessandro, A.; Pierone, L.; Ronci, M.; D’Aguano, S.; Federici, G.; Urbani, nAndrea *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* **2009**, *4*, 73–82.
- (27) Orłowski, R. Z.; Eswara, J. R.; Lafond-Walker, A.; Grever, M. R.; Orłowski, M.; Dang, C. V. *Cancer Res* **1998**, *58*, 4342–4348.
- (28) Kudo, Y.; Takata, T.; Ogawa, I.; Kaneda, T.; Sato, S.; Takekoshi, T.; Zhao, M.; Miyauchi, M.; Nikai, H. *Clin Cancer Res* **2000**, *6*, 916–923.

- (29) Ma, M. H.; Yang, H. H.; Parker, K.; Manyak, S.; Friedman, J. M.; Altamirano, C.; Wu, Z.; Borad, M. J.; Frantzen, M.; Roussos, E.; Neeser, J.; Mikail, A.; Adams, J.; Sjak-Shie, N.; Vescio, R. A.; Berenson, J. R. *Clin Cancer Res* **2003**, *9*, 1136–1144.
- (30) Cusack, J. C.; Liu, R.; Xia, L.; Chao, T.-H.; Pien, C.; Niu, W.; Palombella, V. J.; Neuteboom, S. T. C.; Palladino, M. A. *Clin Cancer Res* **2006**, *12*, 6758–6764.
- (31) Hideshima, T.; Richardson, P.; Chauhan, D.; Palombella, V. J.; Elliott, P. J.; Adams, J.; Anderson, K. C. *Cancer Res* **2001**, *61*, 3071–3076.
- (32) Myung, J.; Kim, K. B.; Crews, C. M. *Med. Res. Rev.* **2001**, *21*, 245–273.
- (33) Genin, E.; Reboud-Ravaux, M.; Vidal, J. *Current Opinion in Chemical Biology* **2010**, *10*, 232–256.
- (34) Troy Pellom Jr, S.; Shanker, A. *J. Clin. Cell Immunol.* **2012**, *S5*.
- (35) Ruschak, A. M.; Slassi, M.; Kay, L. E.; Schimmer, A. D. *JNCI J Natl Cancer Inst* **2011**, *103*, 1007–1017.
- (36) Richardson, P. G.; Sonneveld, P.; Schuster, M. W.; Irwin, D.; Stadtmauer, E. A.; Facon, T.; Harousseau, J.-L.; Ben-Yehuda, D.; Lonial, S.; Goldschmidt, H.; Reece, D.; San-Miguel, J. F.; Bladé, J.; Boccadoro, M.; Cavenagh, J.; Dalton, W. S.; Boral, A. L.; Esseltine, D. L.; Porter, J. B.; Schenkein, D.; Anderson, K. C. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 2487–2498.
- (37) Orłowski, R. Z.; Zeger, E. L. *Expt. Opin. Investig. Drugs* **2006**, *15*, 117–130.
- (38) Moreau, P.; Richardson, P. G.; Cavo, M.; Orłowski, R. Z.; Miguel, J. F. S.; Palumbo, A.; Harousseau, J.-L. *Blood* **2012**, *120*, 947–959.
- (39) Molineaux, S. M. *Clin Cancer Res* **2012**, *18*, 15–20.
- (40) Rock, K. L.; Gramm, C.; Rothstein, L.; Clark, K.; Stein, R.; Dick, L.; Hwang, D.; Goldberg, A. L. *Cell* **1994**, *78*, 761–771.
- (41) Chen, P.; Hochstrasser, M. *Cell* **1996**, *86*, 961–972.
- (42) Kaffy, J.; Bernadat, G.; Onger, S. *Curr. Pharm. Design*, *accepted*.
- (43) Kisselev, A. F.; Akopian, T. N.; Woo, K. M.; Goldberg, A. L. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 3363–3371.
- (44) Heinemeyer, W.; Fischer, M.; Krimmer, T.; Stachon, U.; Wolf, D. H. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 25200–25209.
- (45) Arendt, C. S.; Hochstrasser, M. *PNAS* **1997**, *94*, 7156–7161.
- (46) Lin, K. .; Baraban, J. M.; Ratan, R. R. *Cell Death Differ.* **1998**, *5*.
- (47) Wang, K. K. W.; Po-Wai, Y. *Trends Pharmacol. Sci.* **1994**, *15*, 412–419.
- (48) Adams, J.; Behnke, M.; Chen, S.; Cruickshank, A. A.; Dick, L. R.; Grenier, L.; Klunder, J. M.; Ma, Y.-T.; Plamondon, L.; Stein, R. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 333–338.
- (49) Vivier, M.; Rapp, M.; Galmier, M.-J.; Jarrousse, A.-S.; Miot-Noirault, E.; Leal, F.; Weber, V.; Métin, J.; Sauzière, J.; Chezal, J.-M.; Madelmont, J.-C. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 5705–5710.
- (50) Mroczkiewicz, M.; Winkler, K.; Nowis, D.; Placha, G.; Golab, J.; Ostaszewski, R. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1509–1518.
- (51) Palombella, V. J.; Rando, O. J.; Goldberg, A. L.; Maniatis, T. *Cell* **1994**, *78*, 773–785.
- (52) Iqbal, M.; Messina McLaughlin, P. A.; Dunn, D.; Mallya, S.; Husten, J.; Ator, M. A.; Chatterjee, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 2362–2368.
- (53) Dunn, D.; Iqbal, M.; Husten, J.; Ator, M. A.; Chatterjee, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 3503–3505.
- (54) Gryder, B. E.; Guerrant, W.; Chen, C. H.; Oyelere, A. K. *Med. Chem. Commun.* **2011**, *2*, 1083–1086.

- (55) Dorsey, B. D.; Iqbal, M.; Chatterjee, S.; Menta, E.; Bernardini, R.; Bernareggi, A.; Cassarà, P. G.; D'Arasmo, G.; Ferretti, E.; De Munari, S.; Oliva, A.; Pezzoni, G.; Allievi, C.; Streponi, I.; Ruggeri, B.; Ator, M. A.; Williams, M.; Mallamo, J. P. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1068–1072.
- (56) Piva, R.; Ruggeri, B.; Williams, M.; Costa, G.; Tamagno, I.; Ferrero, D.; Giai, V.; Coscia, M.; Peola, S.; Massaia, M.; Pezzoni, G.; Allievi, C.; Pescalli, N.; Cassin, M.; Giovine, S. di; Nicoli, P.; Feudis, P. de; Streponi, I.; Roato, I.; Ferracini, R.; Bussolati, B.; Camussi, G.; Jones-Bolin, S.; Hunter, K.; Zhao, H.; Neri, A.; Palumbo, A.; Berkers, C.; Ovaa, H.; Bernareggi, A.; Inghirami, G. *Blood* **2008**, *111*, 2765–2775.
- (57) Achanta, G.; Modzelewska, A.; Feng, L.; Khan, S. R.; Huang, P. *Mol Pharmacol* **2006**, *70*, 426–433.
- (58) Nakamura, H.; Watanabe, M.; Ban, H. S.; Nabeyama, W.; Asai, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 3220–3224.
- (59) Watanabe, T.; Abe, H.; Momose, I.; Takahashi, Y.; Ikeda, D.; Akamatsu, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 5839–5842.
- (60) Purandare, A. V.; Wan, H.; Laing, N.; Benbatoul, K.; Vaccaro, W.; Poss, M. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4701–4704.
- (61) Sin, N.; Kim, K. B.; Elofsson, M.; Meng, L.; Auth, H.; Kwok, B. H. B.; Crews, C. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2283–2288.
- (62) Kim, K. B.; Myung, J.; Sin, N.; Crews, C. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 3335–3340.
- (63) Meng, L.; Mohan, R.; Kwok, B. H. B.; Elofsson, M.; Sin, N.; Crews, C. M. *PNAS* **1999**, *96*, 10403–10408.
- (64) Groll, M.; Kim, K. B.; Kairies, N.; Huber, R.; Crews, C. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1237–1238.
- (65) Pereira, A. R.; Kale, A. J.; Fenley, A. T.; Byrum, T.; Debonsi, H. M.; Gilson, M. K.; Valeriote, F. A.; Moore, B. S.; Gerwick, W. H. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 810–817.
- (66) Linden, W. A. van der; Willems, L. I.; Shabaneh, T. B.; Li, N.; Ruben, M.; Florea, B. I.; Marel, G. A. van der; Kaiser, M.; Kisselev, A. F.; Overkleeft, H. S. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 181–194.
- (67) Demo, S. D.; Kirk, C. J.; Aujay, M. A.; Buchholz, T. J.; Dajee, M.; Ho, M. N.; Jiang, J.; Laidig, G. J.; Lewis, E. R.; Parlatti, F.; Shenk, K. D.; Smyth, M. S.; Sun, C. M.; Vallone, M. K.; Woo, T. M.; Molineaux, C. J.; Bennett, M. K. *Cancer Res* **2007**, *67*, 6383–6391.
- (68) Palmer, J. T.; Rasnick, D.; Klaus, J. L.; Bromme, D. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3193–3196.
- (69) Bogyo, M.; Shin, S.; McMaster, J. S.; Ploegh, H. L. *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 307–320.
- (70) Nazif, T.; Bogyo, M. *PNAS* **2001**, *98*, 2967–2972.
- (71) Kessler, B. M.; Tortorella, D.; Altun, M.; Kisselev, A. F.; Fiebiger, E.; Hekking, B. G.; Ploegh, H. L.; Overkleeft, H. S. *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 913–929.
- (72) Rydzewski, R. M.; Burrill, L.; Mendonca, R.; Palmer, J. T.; Rice, M.; Tahilramani, R.; Bass, K. E.; Leung, L.; Gjerstad, E.; Janc, J. W.; Pan, L. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2953–2968.
- (73) Ovaa, H.; van Swieten, P. F.; Kessler, B. M.; Leeuwenburgh, M. A.; Fiebiger, E.; van den Nieuwendijk, A. M. C. H.; Galardy, P. J.; van der Marel, G. A.; Ploegh, H. L.; Overkleeft, H. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3626–3629.
- (74) van Swieten, P. F.; Samuel, E.; Hernández, R. O.; van den Nieuwendijk, A. M. C. H.; Leeuwenburgh, M. A.; van der Marel, G. A.; Kessler, B. M.; Overkleeft, H. S.; Kisselev, A. F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3402–3405.

- (75) Berkers, C. R.; Verdoes, M.; Lichtman, E.; Fiebiger, E.; Kessler, B. M.; Anderson, K. C.; Ploegh, H. L.; Ovaa, H.; Galardy, P. J. *Nature Methods* **2005**, *2*, 357–362.
- (76) Marastoni, M.; Baldisserotto, A.; Cellini, S.; Gavioli, R.; Tomatis, R. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5038–5042.
- (77) Baldisserotto, A.; Marastoni, M.; Trapella, C.; Gavioli, R.; Ferretti, V.; Pretto, L.; Tomatis, R. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*, 586–592.
- (78) Clerc, J.; Groll, M.; Illich, D. J.; Bachmann, A. S.; Huber, R.; Schellenberg, B.; Dudler, R.; Kaiser, M. *PNAS* **2009**, *106*, 6507–6512.
- (79) Wäspi, U.; Blanc, D.; Winkler, T.; Rüedi, P.; Dudler, R. *Mol. Plant Microbe In.* **1998**, *11*, 727–733.
- (80) Wäspi, U.; Hassa, P.; Staempfli, A. A.; Molleyres, L.-P.; Winkler, T.; Dudler, R. *Microbiol. Res.* **1999**, *154*, 89–93.
- (81) Ibarra-Rivera, T. R.; Opoku-Ansah, J.; Ambadi, S.; Bachmann, A. S.; Pirrung, M. C. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 9950–9956.
- (82) Schellenberg, B.; Bigler, L.; Dudler, R. *Environ. Microbiol.* **2007**, *9*, 1640–1650.
- (83) Fenteany, G.; Standaert, R.; Lane, W.; Choi, S.; Corey, E.; Schreiber, S. *Science* **1995**, *268*, 726–731.
- (84) Masse, C. E.; Morgan, A. J.; Adams, J.; Panek, J. S. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, *2000*, 2513–2528.
- (85) Kang, S. H.; Kang, S. Y.; Lee, H.-S.; Buglass, A. J. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 4537–4558.
- (86) Balskus, E. P.; Jacobsen, E. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6810–6812.
- (87) Fenical, W.; Jensen, P. R.; Palladino, M. A.; Lam, K. S.; Lloyd, G. K.; Potts, B. C. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2175–2180.
- (88) Macherla, V. R.; Mitchell, S. S.; Manam, R. R.; Reed, K. A.; Chao, T.-H.; Nicholson, B.; Deyanat-Yazdi, G.; Mai, B.; Jensen, P. R.; Fenical, W. F.; Neuteboom, S. T. C.; Lam, K. S.; Palladino, M. A.; Potts, B. C. M. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3684–3687.
- (89) Chauhan, D.; Catley, L.; Li, G.; Podar, K.; Hideshima, T.; Velankar, M.; Mitsiades, C.; Mitsiades, N.; Yasui, H.; Letai, A.; Ovaa, H.; Berkers, C.; Nicholson, B.; Chao, T.-H.; Neuteboom, S. T. C.; Richardson, P.; Palladino, M. A.; Anderson, K. C. *Cancer Cell* **2005**, *8*, 407–419.
- (90) Williams, P. G.; Buchanan, G. O.; Feling, R. H.; Kauffman, C. A.; Jensen, P. R.; Fenical, W. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6196–6203.
- (91) Manam, R. R.; McArthur, K. A.; Chao, T.-H.; Weiss, J.; Ali, J. A.; Palombella, V. J.; Groll, M.; Lloyd, G. K.; Palladino, M. A.; Neuteboom, S. T. C.; Macherla, V. R.; Potts, B. C. M. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6711–6724.
- (92) McGlinchey, R. P.; Nett, M.; Eustáquio, A. S.; Asolkar, R. N.; Fenical, W.; Moore, B. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7822–7823.
- (93) Asai, A.; Tsujita, T.; Sharma, S. V.; Yamashita, Y.; Akinaga, S.; Funakoshi, M.; Kobayashi, H.; Mizukami, T. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *67*, 227–234.
- (94) Nam, S.; Smith, D. M.; Dou, Q. P. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 13322–13330.
- (95) Smith, D. M.; Daniel, K. G.; Wang, Z.; Guida, W. C.; Chan, T.-H.; Dou, Q. P. *Proteins* **2004**, *54*, 58–70.
- (96) Qian, K.; Kim, S.-Y.; Hung, H.-Y.; Huang, L.; Chen, C.-H.; Lee, K.-H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 5944–5947.
- (97) Chang, T.-L.; Ding, H.-Y.; Kao, Y.-W. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 12011–12015.
- (98) García-Echeverría, C. *Int. J. Pept. Res. Therapeut.* **2006**, *12*, 49–64.
- (99) Williamson, M. J.; Blank, J. L.; Bruzzese, F. J.; Cao, Y.; Daniels, J. S.; Dick, L. R.; Labutti, J.; Mazzola, A. M.; Patil, A. D.; Reimer, C. L.; Solomon, M. S.; Stirling, M.;

- Tian, Y.; Tsu, C. A.; Weatherhead, G. S.; Zhang, J. X.; Rolfe, M. *Mol Cancer Ther* **2006**, *5*, 3052–3061.
- (100) Kohno, J.; Koguchi, Y.; Nishio, M.; Nakao, K.; Kuroda, M.; Shimizu, R.; Ohnuki, T.; Komatsubara, S. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 990–995.
- (101) Yang, Z.-Q.; Kwok, B. H. B.; Lin, S.; Koldobskiy, M. A.; Crews, C. M.; Danishefsky, S. J. *ChemBioChem* **2003**, *4*, 508–513.
- (102) Kaiser, M.; Groll, M.; Siciliano, C.; Assfalg-Machleidt, I.; Weyher, E.; Kohno, J.; Milbradt, A. G.; Renner, C.; Huber, R.; Moroder, L. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1256–1266.
- (103) Groll, M.; Koguchi, Y.; Huber, R.; Kohno, J. *J. Mol. Biol.* **2001**, *311*, 543–548.
- (104) Kaiser, M.; Groll, M.; Renner, C.; Huber, R.; Moroder, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 780–783.
- (105) Kaiser, M.; Siciliano, C.; Assfalg-Machleidt, I.; Groll, M.; Milbradt, A. G.; Moroder, L. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3435–3437.
- (106) Basse, N.; Piguel, S.; Papapostolou, D.; Ferrier-Berthelot, A.; Richy, N.; Pagano, M.; Sarthou, P.; Sobczak-Thépot, J.; Reboud-Ravaux, M.; Vidal, J. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2842–2850.
- (107) Furet, P.; Imbach, P.; Noorani, M.; Koeppler, J.; Laumen, K.; Lang, M.; Guagnano, V.; Fuerst, P.; Roesel, J.; Zimmermann, J.; García-Echeverría, C. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4810–4813.
- (108) García-Echeverría, C.; Imbach, P.; France, D.; Fürst, P.; Lang, M.; Noorani, M.; Scholz, D.; Zimmermann, J.; Furet, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1317–1319.
- (109) Furet, P.; Imbach, P.; Fuerst, P.; Lang, M.; Noorani, M.; Zimmermann, J.; García-Echeverría, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1331–1334.
- (110) Furet, P.; Imbach, P.; Fürst, P.; Lang, M.; Noorani, M.; Zimmermann, J.; García-Echeverría, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1321–1324.
- (111) Nickleit, I.; Zender, S.; Sasse, F.; Geffers, R.; Brandes, G.; Sörensen, I.; Steinmetz, H.; Kubicka, S.; Carlomagno, T.; Menche, D.; Gütgemann, I.; Buer, J.; Gossler, A.; Manns, M. P.; Kalesse, M.; Frank, R.; Malek, N. P. *Cancer Cell* **2008**, *14*, 23–35.
- (112) Basse, N.; Papapostolou, D.; Pagano, M.; Reboud-Ravaux, M.; Bernard, E.; Felten, A.-S.; Vanderesse, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3277–3281.
- (113) Ge, Y.; Kazi, A.; Marsilio, F.; Luo, Y.; Jain, S.; Brooks, W.; Daniel, K. G.; Guida, W. C.; Sebti, S. M.; Lawrence, H. R. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 1978–1998.
- (114) Xu, K.; Xiao, Z.; Tang, Y. B.; Huang, L.; Chen, C.-H.; Ohkoshi, E.; Lee, K.-H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 2772–2774.
- (115) Kazi, A.; Lawrence, H.; Guida, W. C.; McLaughlin, M. L.; Springett, G. M.; Berndt, N.; Yip, R. M.; Sebti, S. M. *Cell Cycle* **2009**, *8*, 1940–1951.
- (116) Gallastegui, N.; Beck, P.; Arciniega, M.; Huber, R.; Hillebrand, S.; Groll, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 247–249.
- (117) Bégué, J.-P.; Bonnet-Delpon, D. *Bioorganic and Medicinal Chemistry of Fluorine*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2008.
- (118) Biffinger, J. C.; Kim, H. W.; DiMugno, S. G. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 622–627.
- (119) Banks, R. E.; Fielding, H. C. *organofluorine chemicals and their industrial applications*; Chichester, UK, 1979.
- (120) Gallo, R. *Progress Phys. Org. Chem.* **1983**, *14*, 115.
- (121) Muller, N. *J. Pharm. Sci.* **1986**, *75*, 115.
- (122) Takahashi, Y.; Yamashita, T.; Ueno, A.; Mihara, H. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 7011–7018.

- (123) Tracz, S. M.; Abedini, A.; Driscoll, M.; Raleigh, D. P. *Biochemistry* **2004**, *43*, 15901–15908.
- (124) Abraham, M. H.; Grellier, P. L.; Prior, D. V.; Morris, J. J.; Taylor, P. J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1990**, 521–529.
- (125) Kiplinger, J. L.; Richmond, T. G.; Osterberg, C. E. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 373–431.
- (126) Ojima, I. *Fluorine in Medicinal Chemistry and Chemical Biology*; Wiley: Chichester, UK, 2009.
- (127) Kirk, K. L. *Org. Process Res. Dev.* **2008**, *12*, 305–321.
- (128) Hagmann, W. K. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4359–4369.
- (129) O'Hagan, D. *J. Fluor. Chem.* **2010**, *131*, 1071–1081.
- (130) Filler, R.; Saha, R. *Future Med. Chem.* **2009**, *1*, 777–791.
- (131) Berber, H.; Brigaud, T.; Lefebvre, O.; Plantier-Royon, R.; Portella, C. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 903–909.
- (132) Lee, K.; Jung, W.-H.; Hwang, S. Y.; Lee, S.-H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2483–2486.
- (133) Böhm, H.-J.; Banner, D.; Bendels, S.; Kansy, M.; Kuhn, B.; Müller, K.; Obst-Sander, U.; Stahl, M. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 637–643.
- (134) Mitch, C. H.; Brown, T. J.; Bymaster, F. P.; Calligaro, D. O.; Dieckman, D.; Merrit, L.; Peters, S. C.; Quimby, S. J.; Shannon, H. E.; Shipley, L. A.; Ward, J. S.; Hansen, K.; Olesen, P. H.; Sauerberg, P.; Sheardown, M. J.; Swedberg, M. D. B.; Suzdak, P.; Greenwood, B. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 538–546.
- (135) Bégué, J. P.; Bonnet-Delpon, D.; Crousse, B.; Ourévitch, M.; Chorki, F.; Grellepois, F. PTC FR02/03675.
- (136) Bégué, J. P.; Bonnet-Delpon, D.; Crousse, B.; Ourévitch, M.; Chorki, F.; Grellepois, F. PTC FR01/13869.
- (137) Leung, D.; Abbenante, G.; Fairlie, D. P. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 305–341.
- (138) Lin, M.; Shapiro, M. J.; Wareing, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5249–5250.
- (139) Hajduk, P. J.; Dinges, J.; Miknis, G. F.; Merlock, M.; Middleton, T.; Kempf, D. J.; Egan, D. A.; Walter, K. A.; Robins, T. S.; Shuker, S. B.; Holzman, T. F.; Fesik, S. W. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3144–3150.
- (140) Gerig, J. T. In *Nuclear Magnetic Resonance Part B Structure and Mechanism*; Academic Press, 1989; Vol. Volume 177, pp. 3–23.
- (141) Dalvit, C. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2007**, *51*, 243–271.
- (142) Dalvit, C.; Fagerness, P. E.; Hadden, D. T. A.; Sarver, R. W.; Stockman, B. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7696–7703.
- (143) Tengel, T.; Fex, T.; Emtenäs, H.; Almqvist, F.; Sethson, I.; Kihlberg, J. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 725–731.
- (144) Poppe, L.; Harvey, T. S.; Mohr, C.; Zondlo, J.; Tegley, C. M.; Nuanmanee, O.; Cheetham, J. *J. Biomol. Screen* **2007**, *12*, 301–311.
- (145) Dalvit, C.; Fasolini, M.; Flocco, M.; Knapp, S.; Pevarello, P.; Veronesi, M. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2610–2614.
- (146) Dalvit, C.; Flocco, M.; Knapp, S.; Mostardini, M.; Perego, R.; Stockman, B. J.; Veronesi, M.; Varasi, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7702–7709.
- (147) Jahnke, W.; Floersheim, P.; Ostermeier, C.; Zhang, X.; Hemmig, R.; Hurth, K.; Uzunov, D. P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3420–3423.
- (148) Siriwardena, A. H.; Tian, F.; Noble, S.; Prestegard, J. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3454–3457.
- (149) Dalvit, C.; Ardini, E.; Fogliatto, G. P.; Mongelli, N.; Veronesi, M. *Drug Discov. Today* **2004**, *9*, 595–602.

- (150) Dalvit, C.; Ardini, E.; Flocco, M.; Fogliatto, G. P.; Mongelli, N.; Veronesi, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14620–14625.
- (151) Meyer, E. A.; Castellano, R. K.; Diederich, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1210–1250.
- (152) Fattorusso, R.; Jung, D.; Crowell, K. J.; Forino, M.; Pellicchia, M. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1649–1656.
- (153) Dalvit, C.; Caronni, N.; Mongelli, N.; Veronesi, M.; Vulpetti, A. *Curr. Drug Discov. Technol* **2006**, *115*.
- (154) Fattorusso, R.; Frutos, S.; Sun, X.; Sucher, N. J.; Pellicchia, M. *Phytomedicine* **2006**, *13*, 16–22.
- (155) Frutos, S.; Tarrago, T.; Giralt, E. *Bioor. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2677–2681.
- (156) Tarrago, T.; Kichik, N.; Seguí, J.; Giralt, E. *ChemMedChem* **2007**, *2*, 354–359.
- (157) Woods, J. R.; Mo, H.; Bieberich, A. A.; Alavanja, T.; Colby, D. A. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 7934–7941.
- (158) Salgado, J.; Grage, S.; Kondejewski, L.; Hodges, R.; McElhaney, R.; Ulrich, A. *J. Biomol. NMR* **2001**, *21*, 191–208.
- (159) Wadhvani, P.; Strandberg, E. In *Fluorine in Medicinal Chemistry and Chemical Biology*; Ojima, I., Ed.; John Wiley & Sons, Ltd, 2009; pp. 463–493.
- (160) Bai, P.; Luo, L.; Peng, Z. *Biochemistry* **2000**, *39*, 372–380.
- (161) Luo, W.; Mani, R.; Hong, M. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 10825–10832.
- (162) Dürr, U. H. N.; Afonin, S.; Hoff, B.; de Luca, G.; Emsley, J. W.; Ulrich, A. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 4769–4782.
- (163) Wu, Y.-D.; Gellman, S. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1231–1232.
- (164) Grauer, A.; König, B. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *2009*, 5099–5111.
- (165) Liskamp, R. M. J.; Rijkers, D. T. S.; Kruijtzter, J. A. W.; Kemmink, J. *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1626–1653.
- (166) Adessi, C.; Soto, C. *Curr. Med. Chem* **2002**, *9*, 963–978.
- (167) Ramanathan, S. K.; Keeler, J.; Lee, H.-L.; Reddy, D. S.; Lushington, G.; Aubé, J. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1059–1062.
- (168) Sagan, S.; Karoyan, P.; Lequin, O.; Chassaing, G.; Lavielle, S. *Curr. Med. Chem* **2004**, *11*, 2799–2822.
- (169) Luthman, K.; Hacksell, U. *Textb. Drug Des. Discovery (3rd Ed)* **2002**, 459–485.
- (170) Spatola, A. F. *Chemistry and biochemistry of peptides and proteins*; Marcel Dekker: New York, 1983.
- (171) Couve-Bonnaire, S.; Cahard, D.; Pannecoucke, X. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1151.
- (172) Abraham, R. J.; Ellison, S. L. R.; Schonholzer, P.; Thomas, W. A. *Tetrahedron* **1986**, *42*, 2101–2110.
- (173) Allmendinger, T.; Felder, E.; Hungarbühler, E. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 7301–7304.
- (174) Sani, M.; Volonterio, A.; Zanda, M. *ChemMedChem* **2007**, *2*, 1693–1700.
- (175) Black, W. C.; Bayly, C. I.; Davis, D. E.; Desmarais, S.; Falguyret, J.-P.; Léger, S.; Li, C. S.; Massé, F.; McKay, D. J.; Palmer, J. T.; Percival, M. D.; Robichaud, J.; Tsou, N.; Zamboni, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4741–4744.
- (176) Chaume, G.; Van Severen, M.-C.; Marinkovic, S.; Brigaud, T. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 6123–6126.
- (177) Ojima, I.; Kato, K.; Nakahashi, K.; Fuchikami, T.; Fujita, M. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 4511–4522.
- (178) Huguenot, F.; Brigaud, T. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 2159–2162.
- (179) Meng, H.; Kumar, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15615–15622.

- (180) Tang, Y.; Ghirlanda, G.; Petka, W. A.; Nakajima, T.; DeGrado, W. F.; Tirrell, D. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1494–1496.
- (181) Ojima, I.; Kato, K.; Jameison, F. A.; Conway, J.; Nakahashi, K.; Hagiwara, M.; Miyamae, T.; Radunz, H. E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 219–222.
- (182) Zanda, M. *New J. Chem.* **2004**, *28*, 1401–1411.
- (183) Berno, pietro; Floriani, C.; Chiesi-villa, A.; Guastini, C. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, 109.
- (184) Lum, R. T.; Nelson, M. G.; Joly, A.; Horsma, A. G.; Lee, G.; Meyer, S. M.; Wick, M. M.; Schow, S. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 209–214.
- (185) Geurink, P. P.; Liu, N.; Spaans, M. P.; Downey, S. L.; van den Nieuwendijk, A. M. C. H.; van der Marel, G. A.; Kisselev, A. F.; Florea, B. I.; Overkleeft, H. S. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2319–2323.
- (186) Marraud, M.; Vanderesse, R.; Goodman, M. Thieme: Stuttgart: New York, NY, 2003; Vol. 86, pp. 423–457.
- (187) Guy, L.; Vidal, J.; Collet, A.; Amour, A.; Reboud-Ravaux, M. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4833–4843.
- (188) Lelais, G.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 4152–4168.
- (189) Moussodia, R.-O.; Acherar, S.; Bordessa, A.; Vanderesse, R.; Jamart-Grégoire, B. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 4682–4692.
- (190) Aubin, S.; Martin, B.; Delcros, J.-G.; Arlot-Bonnemains, Y.; Baudy-Floc'h, M. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 330–334.
- (191) Juarsisti, E.; Soloshonok, V. A. *Enantioselective Synthesis of beta-Amino Acids (2nd Ed)*; 2nd ed.; Wiley-VCH Ltd, 2005.
- (192) Cheng, R. P.; Gellman, S. H.; DeGrado, W. F. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3219–3232.
- (193) Seebach, D.; Hook, D. F.; Glättli, A. *Pept. Sci.* **2006**, *84*, 23–37.
- (194) Formicola, L.; Maréchal, X.; Basse, N.; Bouvier-Durand, M.; Bonnet-Delpon, D.; Milcent, T.; Reboud-Ravaux, M.; Ongeri, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 83–86.
- (195) Formicola, L. Design of peptidomimetics towards new foldamers and 26S proteasome inhibitors *Thèse* **2008**.
- (196) Bordessa, A. design, synthesis and structural evaluation of peptidomimetics towards foldamers, PNAs and non covalent inhibitors of the 26S proteasome *Thèse* **2008**.
- (197) Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C. *J. Mol. Biol.* **1995**, *245*, 43–53.
- (198) Zhu, Y.; Zhu, X.; Wu, G.; Ma, Y.; Li, Y.; Zhao, X.; Yuan, Y.; Yang, J.; Yu, S.; Shao, F.; Li, R.; Ke, Y.; Lu, A.; Liu, Z.; Zhang, L. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1990–1999.
- (199) Ma, Y.; Xu, B.; Fang, Y.; Yang, Z.; Cui, J.; Zhang, L.; Zhang, L. *Molecules* **2011**, *16*, 7551–7564.
- (200) Wan, S. B.; Yang, H.; Zhou, Z.; Cui, Q. C.; Chen, D.; Kanwar, J.; Mohammad, I.; Dou, Q. P.; Chan, T. H. *Int J Mol Med* **2010**, *26*, 447–455.
- (201) Baldisserotto, A.; Ferretti, V.; Destro, F.; Franceschini, C.; Marastoni, M.; Gavioli, R.; Tomatis, R. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 6511–6515.
- (202) Basse, N.; Montes, M.; Maréchal, X.; Qin, L.; Bouvier-Durand, M.; Genin, E.; Vidal, J.; Villoutreix, B. O.; Reboud-Ravaux, M. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 509–513.
- (203) Nadas, J.; Li, C.; Wang, P. G. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 410–423.
- (204) Lei, M.; Zhao, X.; Wang, Z.; Zhu, Y. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 2092–2100.
- (205) Groll, M.; Gallastegui, N.; Maréchal, X.; Le Ravalec, V.; Basse, N.; Richy, N.; Genin, E.; Huber, R.; Moroder, L.; Vidal, J.; Reboud-Ravaux, M. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 1701–1705.
- (206) SINE, J.-P. *Enzymologie et applications*; ellipses: Paris, 2010.

- (207) Reszka, P.; Schulz, R.; Methling, K.; Lalk, M.; Bednarski, P. J. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 103–117.
- (208) Atkins, R. L.; Bliss, D. E. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 1975–1980.
- (209) Wessjohann, L. A.; Brandt, W.; Thiemann, T. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1625–1648.
- (210) Dong, L.; Du, Q.; Lou, C.; Zhang, J.; Lu, R.; Yan, M. *Synlett* **2009**, *2010*, 266–270.
- (211) Pietruszka, J. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1051–1070.
- (212) Donaldson, W. A. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 8589–8627.
- (213) Kim, J. Y.; Seo, H. J.; Lee, S.-H.; Jung, M. E.; Ahn, K.; Kim, J.; Lee, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 142–145.
- (214) Phillips, D. J.; Davenport, R. J.; Demaude, T. A.; Galleway, F. P.; Jones, M. W.; Knerr, L.; Perry, B. G.; Ratcliffe, A. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4146–4149.
- (215) Li, L.-S.; Zhou, Y.; Murphy, D. E.; Stankovic, N.; Zhao, J.; Dragovich, P. S.; Bertolini, T.; Sun, Z.; Ayida, B.; Tran, C. V.; Ruebsam, F.; Webber, S. E.; Shah, A. M.; Tsan, M.; Showalter, R. E.; Patel, R.; LeBrun, L. A.; Bartkowski, D. M.; Nolan, T. G.; Norris, D. A.; Kamran, R.; Brooks, J.; Sergeeva, M. V.; Kirkovsky, L.; Zhao, Q.; Kissinger, C. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3446–3455.
- (216) Carroll, W. .; Perez-Medrano, A.; Dart, M. .; Nelson, D. .; Li, T.; Peddi, S.; Frost, J.; Kolasa, T.; Liu, B.; Latshaw, S. .; Wang, X. PTC Int. Pat. WO 200948936.
- (217) Nielsen, F. E.; Ebdrup, S.; Jensen, A. F.; Ynddal, L.; Bodvarsdottir, T. B.; Stidsen, C.; Worsaae, A.; Boonen, H. C. M.; Arkhammar, P. O. G.; Fremming, T.; Wahl, P.; Kornø, H. T.; Hansen, J. B. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4127–4139.
- (218) Mykhailiuk, P. K.; Afonin, S.; Palamarchuk, G. V.; Shishkin, O. V.; Ulrich, A. S.; Komarov, I. V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5765–5767.
- (219) Mykhailiuk, P.; Afonin, S.; Ulrich, A.; Komarov, I. *Synthesis* **2008**, *2008*, 1757–1760.
- (220) Paulini, K.; Reißig, H.-U. *J. Prakt. Chem.* **1995**, *337*, 55–59.
- (221) Katagiri, T.; Irie, M.; Uneyama, K. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2423–2425.
- (222) Giannis, A.; Kolter, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1993**, *32*, 1244–1267.
- (223) Gante, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 1699–1720.
- (224) Schneider, J. P.; Kelly, J. W. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2169–2187.
- (225) Hanessian, S.; McNaughton-Smith, G.; Lombart, H.-G.; Lubell, W. D. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 12789–12854.
- (226) Rovero, P.; Pellegrini, M.; Di Fenza, A.; Meini, S.; Quartara, L.; Maggi, C. A.; Formaggio, F.; Toniolo, C.; Mierke, D. F. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 274–278.
- (227) Hagihara, M.; Anthony, N. J.; Stout, T. J.; Clardy, J.; Schreiber, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6568–6570.
- (228) Smith, A. B.; Keenan, T. P.; Holcomb, R. C.; Sprengeler, P. A.; Guzman, M. C.; Wood, J. L.; Carroll, P. J.; Hirschmann, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10672–10674.
- (229) Janetka, J. W.; Raman, P.; Satyshur, K.; Flentke, G. R.; Rich, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 441–442.
- (230) Boumendjel, A.; Roberts, J. C.; Hu, E.; Pallai, P. V.; Rebek, J. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 4434–4438.
- (231) De Marco, R.; Tolomelli, A.; Campitiello, M.; Rubini, P.; Gentilucci, L. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 2307.
- (232) Hanessian, S.; Auzzas, L. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1241–1251.
- (233) Angell, Y. L.; Burgess, K. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1674–1689.
- (234) Holub, J. M.; Kirshenbaum, K. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1325.

- (235) Brik, A.; Alexandratos, J.; Lin, Y.-C.; Elder, J. H.; Olson, A. J.; Wlodawer, A.; Goodsell, D. S.; Wong, C.-H. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1167–1169.
- (236) Martinek, T. A.; Fülöp, F. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 687–702.
- (237) Pils, L.; Reiser, O. *Amino Acids* **2011**, *41*, 709–718.
- (238) Guichard, G.; Huc, I. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 5933.
- (239) Fernandes, C.; Faure, S.; Pereira, E.; Théry, V.; Declerck, V.; Guillot, R.; Aitken, D. *J. Org. Lett.* **2010**, *12*, 3606–3609.
- (240) Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Karle, I. L.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 13071–13072.
- (241) Burroughs, L. F. *Nature* **1957**, *179*, 360–361.
- (242) Adams, D. O.; Yang, S. F. *PNAS* **1979**, *76*, 170–174.
- (243) Brackmann, F.; de Meijere, A. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4493–4537.
- (244) Park, K.-H.; Kurth, M. J. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 8629–8659.
- (245) Groth, U.; Halfbrodt, W.; Schöllkopf, U. *Liebigs Ann.* **1992**, *1992*, 351–355.
- (246) Aitken, D. J.; Royer, J.; Husson, H. P. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 2814–2820.
- (247) Alcaraz, C.; Herrero, A.; Marco, J. L.; Fernández-Alvarez, E.; Bernabé, M. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 5605–5608.
- (248) Burgess, K.; Ho, K.-K.; Moye-Sherman, D. *Synlett* **1994**, *1994*, 575–583.
- (249) Wentland, M. P.; Perni, R. B.; Dorff, P. H.; Rake, J. B. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1694–1697.
- (250) Koglin, N.; Zorn, C.; Beumer, R.; Cabrele, C.; Bubert, C.; Sewald, N.; Reiser, O.; Beck-Sickinger, A. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 202–205.
- (251) Reichelt, A.; Martin, S. F. *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 433–442.
- (252) Martin, S. F.; Oalman, C. J.; Liras, S. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3521–3532.
- (253) Martin, S. F.; Austin, R. E.; Oalman, C. J.; Baker, W. R.; Condon, S. L.; DeLara, E.; Rosenberg, S. H.; Spina, K. P.; Stein, H. H. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 1710–1721.
- (254) Seebach, D.; Gardiner, J. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1366–1375.
- (255) Horne, W. S.; Gellman, S. H. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1399–1408.
- (256) Yang, D.; Chang, X.-W.; Zhang, D.-W.; Jiang, Z.-F.; Song, K.-S.; Zhang, Y.-H.; Zhu, N.-Y.; Weng, L.-H.; Chen, M.-Q. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 4796–4805.
- (257) De Pol, S.; Zorn, C.; Klein, C. D.; Zerbe, O.; Reiser, O. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 511–514.
- (258) Koskinen, A. M. P.; Hassila, H.; Harms, K.; Simonsen, K.; Liptay, G.; Trautwein-Fritz, K.; Stackhouse, J.; Ciglic, M. I.; Haugg, M.; Trabesinger-Rüf, N.; Weinhold, E. G. *Acta Chem. Scand.* **1996**, *50*, 323–327.
- (259) Martin, S. F.; Dorsey, G. O.; Gane, T.; Hillier, M. C.; Kessler, H.; Baur, M.; Mathä, B.; Erickson, J. W.; Bhat, T. N.; Munshi, S.; Gulnik, S. V.; Topol, I. A. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1581–1597.
- (260) Grygorenko, O. O.; Artamonov, O. S.; Komarov, I. V.; Mykhailiuk, P. K. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 803–823.
- (261) Artamonov, O.; Mykhailiuk, P.; Voievoda, N.; Volochnyuk, D.; Komarov, I. *Synthesis* **2009**, *2010*, 443–446.
- (262) Fields, R.; Haszeldine, R. N. *Proc. Chem. Soc.* **1960**, 22.
- (263) Atherton, J. H.; Fields, R. *J. Chem. Soc. C.* **1967**, 1450.
- (264) Atherton, J. H.; Fields, R. *J. Chem. Soc. C.* **1968**, 1507.
- (265) Atherton, J. H.; Fields, R. *J. Chem. Soc. C.* **1968**, 2276.
- (266) Dolbier Jr., W. R.; McClinton, M. A. *J. Fluor. Chem.* **1995**, *70*, 249–253.
- (267) Le Maux, P.; Juillard, S.; Simonneaux, G. *Synthesis* **2006**, *2006*, 1701–1704.

- (268) Duncton, M. A. J.; Ayala, L.; Kaub, C.; Janagani, S.; Edwards, W. T.; Orike, N.; Ramamoorthy, K.; Kincaid, J.; Kelly, M. G. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 1009–1011.
- (269) von E. Doering, W.; Roth, W. R. *Tetrahedron* **1963**, *19*, 715–737.
- (270) Morandi, B.; Carreira, E. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 938–941.
- (271) Shi, G.; Xu, Y. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3383–3386.
- (272) O'Bannon, P. E.; Dailey, W. P. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 7341–7358.
- (273) O'Bannon, P. E.; Dailey, W. P. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 4197–4200.
- (274) Wan, W.; Gao, Y.; Jiang, H.; Hao, J. *J. Fluor. Chem.* **2008**, *129*, 510–514.
- (275) Abreo, M.; Chafeev, M.; Chakka, N. PCT. Int. Pat. WO 2005/011655, 2005.
- (276) Wang, Y.; Zhao, X.; Li, Y.; Lu, L. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 7775–7777.
- (277) Shinohara, N.; Haga, J.; Yamazaki, T.; Kitazume, T.; Nakamura, S. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 4363–4374.
- (278) Gao, T. *Hecheng Huaxue* **2009**, 566.
- (279) Lin, H.; Shen, Q.; Lu, L. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 7359–7369.
- (280) Pesciaioli, F.; Righi, P.; Mazzanti, A.; Bartoli, G.; Bencivenni, G. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 2842–2845.
- (281) Ballini, R.; Fiorini, D.; Palmieri, A. *Synlett* **2003**, 1704–1706.
- (282) Hansen, H. M.; Longbottom, D. A.; Ley, S. V. *Chem. Commun.* **2006**, 4838–4840.
- (283) Du, Q.; Dong, L.; Wang, J.; Lu, R.; Yan, M. *Arkivoc* **2009**, *14*, 191–199.
- (284) Yashin, N. V.; Averina, E. B.; Grishin, Y. K.; Kuznetsova, T. S.; Zefirov, N. S. *Synthesis* **2006**, 279–284.
- (285) Wurz, R. P.; Charette, A. B. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 1262–1269.
- (286) Braish, T. F.; Castaldi, M.; Chan, S.; Fox, D. E.; Keltonic, T.; McGarry, J.; Hawkins, J. M.; Norris, T.; Rose, P. R.; Sieser, J. E.; Sitter, B. J.; Watson Jr, H. *Synlett* **1996**, 1996, 1100,1102.
- (287) Parish, E. J.; Kizito, S. A.; Heidepriem, R. W. *synth. commun.* **1993**, *23*, 223–230.
- (288) Papageorgiou, C. D.; Ley, S. V.; Gaunt, M. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 828–831.
- (289) Buckner, M. T.; Matthews, T. G.; Lytle, F. E.; McMillin, D. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 5846–5848.
- (290) Cossy, J.; Blanchard, N.; Meyer, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *2001*, 339–348.
- (291) Kapron, J. T.; Santarsiero, B. D.; Vederas, J. C. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 1074–1076.
- (292) Anderson, D. J.; Gilchrist, T. L.; Horwell, D. C.; Rees, C. W. *J. Chem. Soc. C.* **1970**, 576.
- (293) Atkinson, R. S.; Rees, C. W. *J. Chem. Soc. C.* **1969**, 772.
- (294) Yang, K.-S.; Chen, K. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1107–1109.
- (295) Yang, K.-S.; Chen, K. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 1676–1679.
- (296) Ulukanli, S.; Karabuga, S.; Celik, A.; Kazaz, C. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 197–199.
- (297) Diaper, C. M.; Sutherland, A.; Pillai, B.; James, M. N. G.; Semchuk, P.; Blanchard, J. S.; Vederas, J. C. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 4402–4411.
- (298) Li, Z.; Duan, Z.; Kang, J.; Wang, H.; Yu, L.; Wu, Y. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 1924–1930.
- (299) Zibinsky, M.; Butkevich, A. N.; Kuznetsov, M. A. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 5505–5507.
- (300) Li, J.; Liang, J.-L.; Chan, P. W. H.; Che, C.-M. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2685–2688.
- (301) Hernández-Toribio, J.; Hussain, M. M.; Cheng, K.; Carroll, P. J.; Walsh, P. J. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 6094–6097.

- (302) Li, J.; Chan, P. W. H.; Che, C.-M. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5801–5804.
- (303) Singh, S.; Singh, K. N. *Synth. Commun.* **2005**, *35*, 2597–2602.
- (304) Jagodzinska, M.; Huguenot, F.; Zanda, M. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 2042–2046.
- (305) Molteni, M.; Volonterio, A.; Zanda, M. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3887–3890.
- (306) Wang, B.-L.; Yu, F.; Qiu, X.-L.; Jiang, Z.-X.; Qing, F.-L. *J. Fluor. Chem.* **2006**, *127*, 580–587.
- (307) Brosse, N.; Pinto, M.-F.; Jamart-Grégoire, B. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, 3685–3688.
- (308) Egli, M.; Hoesch, L.; Dreiding, A. S. *Helv. Chimic. Acta* **1985**, *68*, 220–230.
- (309) Fan, R.; Ye, Y.; Li, W.; Wang, L. *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 2488–2492.
- (310) Inokuma, T.; Sakamoto, S.; Takemoto, Y. *Synlett* **2009**, *2009*, 1627–1630.
- (311) Papageorgiou, C. D.; Cubillo de Dios, M. A.; Ley, S. V.; Gaunt, M. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4641–4644.

◆ Le protéasome est une macromolécule qui assure la dégradation de la majorité des protéines cellulaires ce qui en fait une cible dans le traitement du cancer. Nous avons conçu et synthétisé des inhibiteurs non-covalents de structures pseudopeptidiques fluorés ou non fluorés du protéasome. L'évaluation des ces composés par RMN du ^{19}F est en cours de réalisation. Nous avons aussi développé une méthodologie de synthèse d'amino acides cyclopropane trifluorométhylés et de *N*-aminoaziridine fluorés.

◆ Mots clés : protéasome, inhibiteurs non covalents, peptidomimétiques, fluor, cyclopropane, *N*-aminoaziridine, RMN du ^{19}F .

◆ Le nom du laboratoire de rattachement : laboratoires de molécules fluorées et chimie médicinale, BioCIS, UMR 8076, LabEx LERMIT

PÔLE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11
UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »
5, rue Jean Baptiste Clément
92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex