HAL
open science

Synthèse et études structurales de γ-peptides synthétisés à partir d'acides β,γ-diaminés

Andrii Stanovych

▶ **To cite this version:**

Andrii Stanovych. Synthèse et études structurales de γ-peptides synthétisés à partir d'acides β,γ-diaminés. Chimie organique. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA112310 . tel-01249562

HAL Id: tel-01249562

https://theses.hal.science/tel-01249562v1

Submitted on 4 Jan 2016

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

ÉCOLE DOCTORALE 470 :
CHIMIE DE PARIS SUD

Laboratoire : Méthodologie, Synthèse et Molécules Thérapeutiques

THÈSE DE DOCTORAT

CHIMIE

par

Andrii STANOVYCH

Synthèse et études structurales de γ - peptides synthétisés à partir d'acides β,γ-diaminés

Date de soutenance : 06/11/2014

Composition du jury :

Directeur de thèse :	Valérie ALEZRA	Docteur (ICMMO, Université Paris Sud)
Rapporteurs :	Brigitte JAMART-GREGOIRE	Professeur (LCPM, Université de Lorraine)
	Alejandro PEREZ-LUNA	Docteur (IPCM, Université Pierre et Marie Curie Paris 6)
Examinateurs :	Isabelle PARROT	Docteur (IBMM, Université Montpellier 1)
	Sandrine ONGERI	Professeur (BioCIS, Université Paris Sud)
	Cyrille KOUKLOVSKY	Professeur (ICMMO, Université Paris Sud)

Introduction générale

Il y a presque vingt ans, les premières études concernant des oligomères non naturels pouvant mimer les structures secondaires des peptides naturels ont été publiées. Les résultats prometteurs obtenus ont initié la recherche dans un nouveau domaine, le domaine des foldamères. Ce terme 'foldamère' a été introduit en 1996 par un chimiste américain Samuel Gellman[1,2]. Il est général et regroupe 'tout polymère qui a une forte tendance à adopter une conformation compacte spécifique'[3]. Depuis, un grand nombre d'oligomères non-naturels a été étudié, plusieurs d'entre eux sont capables d'adopter des structures secondaires uniques et possèdent des activités biologiques très intéressantes.

Notre laboratoire s'intéresse à la synthèse et aux études structurales de nouveaux foldamères contenant un motif acide β,γ-diaminé (Figure 1). Ce composé est un building-block inexploré dans la synthèse de foldamères peptidomimétiques.

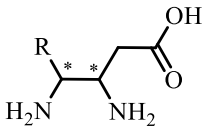


Figure 1 : Formule générale des acides β,γ-diaminés

Les acides β,γ-diaminés possèdent un grand potentiel dans la création de foldamères, puisqu'ils permettent l'élaboration de nouveaux β- ou γ-peptides. La présence d'un hétéroatome supplémentaire (en position β ou γ) permet d'introduire une grande variété de substituants qui peut conduire à différentes molécules fonctionnalisées, ainsi que de jouer sur la solubilité des peptides. De plus, les acides β,γ-diaminés ou leurs dérivés sont présents dans le squelette de molécules naturelles ou dans des intermédiaires de synthèse possédant des activités biologiques importantes.

Une synthèse générale de différents acides β,γ-diaminés a été déjà élaborée dans notre laboratoire à partir de l'acide α-aminé correspondant. Cette synthèse passe par deux réactions clés : la réaction de Blaise (analogue de la réaction de Reformatsky) et une réduction diastéréosélective (Schéma 1).

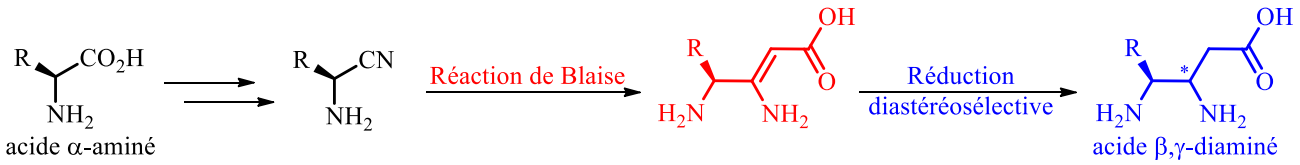


Schéma 1 : Synthèse générale d'acides β,γ-diaminés

[1] Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Karle, I. L.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 13071-13072.
[2] Gellman, D. H. Foldamer: a manifesto. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 173.
[3] «any polymer with strong tendency to adopt a specific compact conformation»

Notre laboratoire a déjà développé et mis au point la synthèse des acides β,γ-diaminés issus de la L-valine **1**, la L-leucine **2** et l'acide L-aspartique **3** et **4** (Figure 2).

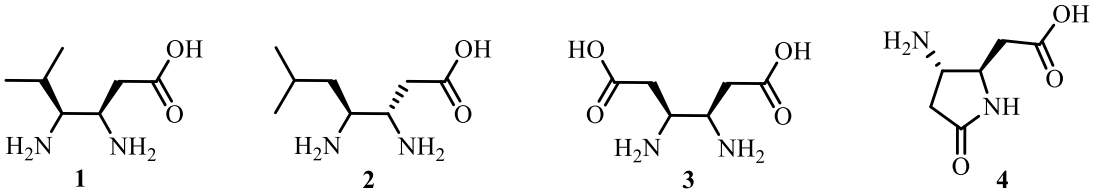


Figure 2 : Acides β,γ-diaminés élaborés dans notre laboratoire

De plus, les études structurales des peptides constitués d'acides **1** ou **4** ont été effectuées. Les résultats obtenus montrent que les γ-peptides correspondants sont capables d'adopter des structures secondaires bien définies (mime de coude γ dans le cas de **1** et hélice sans liaison H dans le cas de **4**) présentées sur la Figure 3.

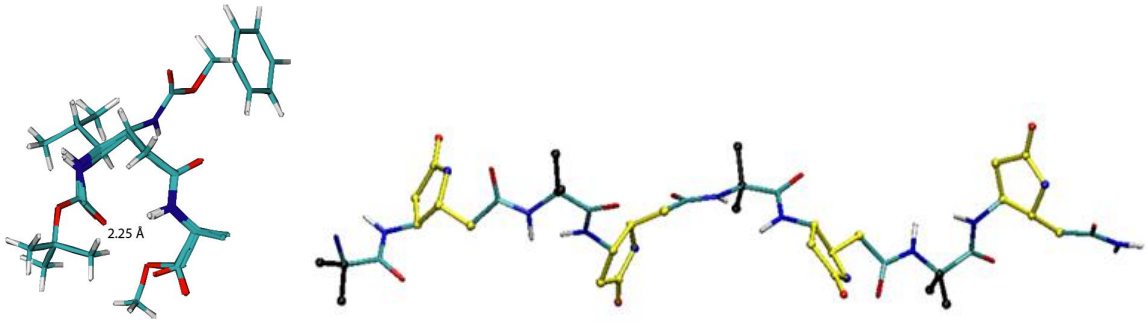


Figure 3 : Coude γ stabilisé par une liaison H à 9 atomes formé par les tripeptides α/γ/α (à gauche) et hélice sans liaisons H (à droite)

L'objectif de cette thèse est d'élargir la gamme des acides β,γ-diaminés (issus de la leucine et de la phénylalanine). Le but est d'élaborer et de mettre au point la synthèse d'acides β,γ-diaminés possédant une configuration relative '*trans*' (Figure 4).

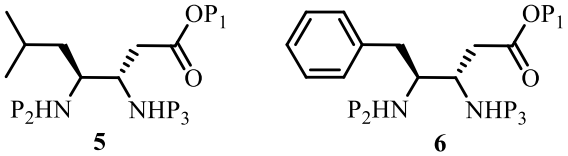


Figure 4 : Acides β,γ-diaminés issus de la leucine 5 et la phénylalanine 6

Ensuite, nous utiliseront ces acides β,γ-diaminés synthétisés dans l'élaboration de nouveaux peptides hybrides α/γ, puis, nous déterminerons l'impact de la configuration des acides β,γ-diaminés sur la structure tridimensionnelle de ces peptides hybrides.

La première partie de ce manuscrit sera consacrée à la synthèse d'acides β,γ-diaminés. Nous décrirons les synthèses existant dans la littérature en privilégiant les synthèses de la déoxyaminostatine. Puis, nous présenterons les travaux antérieurs du laboratoire et ensuite, les résultats obtenus et l'étude de la configuration des acides β,γ-diaminés synthétisés.

Dans la deuxième partie nous débuterons par un rappel bibliographique sur la structuration des peptides et les analyses structurales permettant d'identifier leur repliement. Puis, les structures secondaires adoptées par des peptides comportant différents acides β- ou γ-aminés ainsi que les activités biologiques de certains d'entre eux seront abordées. Nous présenterons également les résultats obtenus par notre laboratoire dans ce domaine.

La troisième partie sera consacrée à la synthèse peptidique en solution de nouveaux peptides hybrides α/γ, suivie par les études structurales des oligomères obtenus afin de déterminer leur capacité à adopter une structure secondaire stable et bien définie.

Dans la dernière partie nous présentérons les analogues de la gramicidine S existant dans la littérature et, ensuite, la synthèse d'analogue comportant deux acides β,γ-diaminés issus de la L-leucine.

Partie I : Synthèse d'acides β,γ-diaminés

1. Introduction

Les acides α-aminés sont une classe de molécules naturelles fondamentales qui jouent un rôle très important dans la nature. Les analogues supérieurs des acides α-aminés sont les acides β- et γ-aminés comportant respectivement une ou deux fonctions méthylènes dans la chaîne carbonée (Figure 5). Les peptides contenant ces acides non-naturels présentent un intérêt biologique, la résistance à la dégradation enzymatique, et un intérêt structural, car ils adoptent des structures secondaires qui peuvent mimer la structure des peptides naturels.

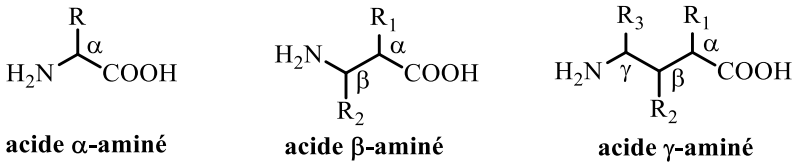


Figure 5 : Acides α-, β-, et γ-aminés

Depuis plus d'une dizaine d'années, les peptides contenant des acides β-aminés ont été étudiés de façon extensive, tandis que les recherches dans le domaine des acides γ-aminés sont plus récentes et commencent à émerger. Néanmoins, ces derniers montrent déjà des propriétés intéressantes, qui seront présentées dans la partie II.

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés aux acides β,γ-diaminés, qui peuvent être considérés comme des dérivés de l'acide γ-aminobutyrique et qui possèdent un groupement amine supplémentaire en position β. Ces composés peuvent se cycliser pour conduire aux aminopyrrolidinones correspondantes (Figure 6).

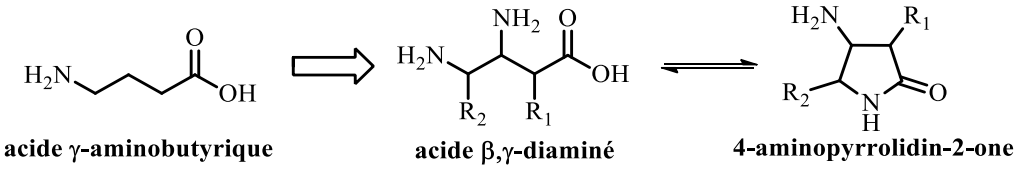


Figure 6 : Cyclisation d'acide β,γ-diaminé en 4-aminopyrrolidin-2-one

Le motif acide β,γ-diaminé peut être rencontré dans la structure de certains produits naturels (Figure 7). Par exemple, les pseudothéonamides[4] sont une famille de molécules naturelles, isolées de

[4] Shiori, T.; Irako, N. *Chem. Lett.* **2002**, 130.

l'éponge marine *Theonella swinhoei*, qui possèdent une activité inhibitrice des protéases à sérine. De plus, la (*R*)-aminocarnitine et ses dérivés[5] empêchent l'oxydation des acides gras.

Enfin, le motif structural des acides β,γ-diaminés peut aussi être rencontré dans des molécules synthétiques biologiquement actives (Figure 7). Par exemple, le pyrrolidine-*trans*-lactame[6] est un inhibiteur de la protéase du virus de l'hépatite C.

Il existe également des molécules possédant le motif structural des acides β,γ-diaminés modifié (Figure 7). Par exemple, l'absouline qui montre une légère activité antivirale[7] et la laburnamine, connue pour sa grande affinité aux récepteurs nicotinique[8], possèdent un cycle pyrrolidine créé par des γ-lactames réduits.

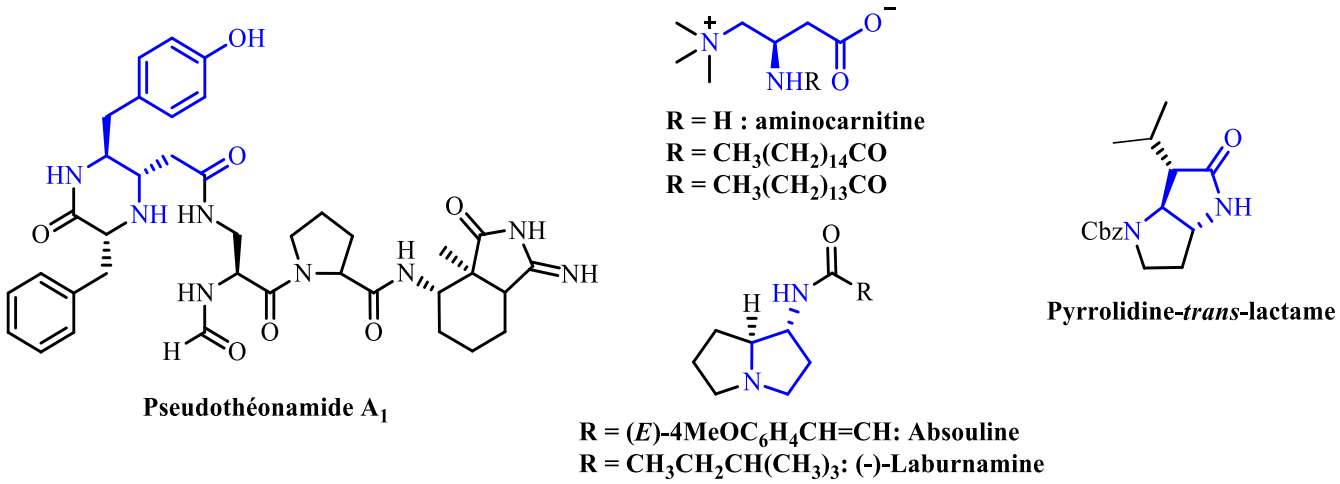


Figure 7 : Produits naturels ou composés synthétiques comportant le motif d'acide β,γ-diaminé

Parmi toutes les molécules contenant le motif acide β,γ-diaminé nous nous sommes intéressés particulièrement à la (3*S*,4*S*)-deoxyaminostatine **2** qui est un analogue d'un acide γ-aminé, la statine **8**. Cette molécule est présente dans la structure du peptide pepstatine **7**, qui est un inhibiteur de protéases et spécifiquement de la pepsine (Figure 8).[9]

[5] a). Shinagawa, S.; Kanamaru, T.; Harada, S.; Asai, M.; Okazaki, H. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1458. b). Calvisi, G.; Dell'Uomo, N.; De Angelis, F.; Dejas, R.; Giannessi, F.; Tinti, M. O. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *1*, 4501.

[6] Andrews, D. M.; Barnes, M. C.; Dowle, M. D.; Hind, S. L.; Johnson, M. R.; P. S, Jones; Mills, G.; Patikis, A.; Pateman, T. J.; Redfern, T. J.; Robinson, J. E.; Slater, M. J.; Trivedi, N. *Org. Lett.*, **2003**, *54*, 4631.

[7] a). Potier, P.; Christine, C.; Ikhiri, K.; Ahond, A.; Al Mourabit, A.; Poupat, C. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 1837. b). Giri, N.; Petrini, M.; Profeta, R. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 7303. c). Matos, M. N.; Afonso, C. A. M.; Batey, R. A. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 1221.

[8] Tasso, B.; Novelli, F.; Fasoli, F. ; Gotti, C. *J. Nat. Prod.*, **2013**, *76*, 727.

[9] Umezawa, H.; Aoyagi, T.; Morishima, H.; Matsuzaki, M.; Hamada, M.; Takeuchi, T. *J. Antibiot*, **1970**, *23*, 259.

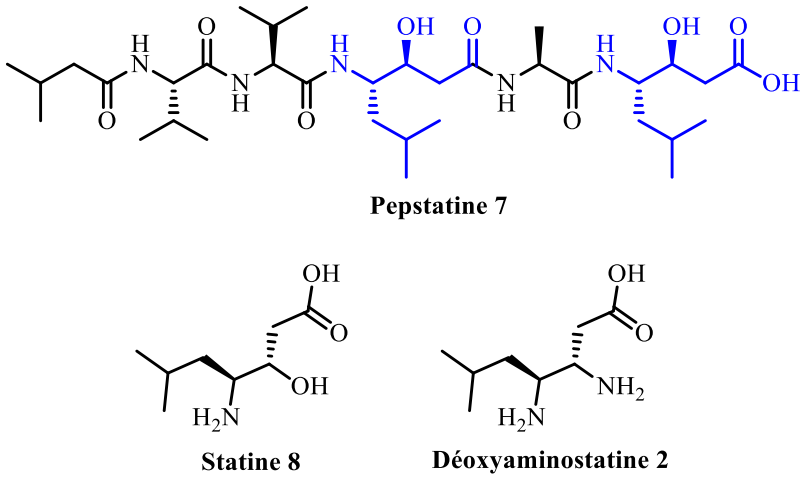


Figure 8 : Structure du peptide pepstatine 7 (en haut), de la statine 8 (en bas à gauche) et de la déoxyaminostatine 2 (en bas à droite)

Il faut souligner que des peptides contenant la déoxyaminostatine **2** ont une activité biologique intéressante, ils inhibent la rénine dans le traitement de l'hypertension[10].

Pour conclure, les acides β,γ-diaminés sont présents dans de nombreux produits naturels et synthétiques qui possèdent des activités biologiques très divergentes. De plus, les acides β,γ-diaminés sont des building-blocks très prometteurs dans la chimie des foldamères (en tant qu'acide β- ou γ-aminé) car ils possèdent une deuxième fonction amine qui peut jouer le rôle d'un donneur d'hydrogène supplémentaire et augmenter la solubilité dans des solvants protiques, notamment dans l'eau pour des tests biologiques.

2. Rappels bibliographiques

Plusieurs équipes travaillent sur la synthèse des acides β,γ-diaminés, mais une synthèse générale et efficace n'a pas été encore proposée. Néanmoins différents acides β,γ-diaminés ont été obtenus. Dans ce paragraphe nous allons présenter les voies de synthèse récentes existant dans la littérature en privilégiant les synthèses de la déoxyaminostatine **2**.

En 1988, l'équipe de Schostarez[11] a publié la synthèse énantiosélective de la déoxyaminostatine **2** (Schéma 2). En partant de la statine **8** ou de son diastéréomère protégés par le Boc, les β-hydroxy-O-alkyl hydroxamates correspondants ont été synthétisés. Le faible pKa (pKa = 9-10) du groupe O-alkyl hydroxamate permet d'effectuer une réaction de Mitsunobu intramoléculaire. La configuration du centre

[10] Arrowsmith, R. J.; Carter, K.; Dann, J. G.; Davies, D. E.; Harris, C.J.; Morton, J. A.; Lister, P. ; Robinson, J. A.; Williams, D. J. *Chem. Soc. Chem. Commun.* **1986**, *10*, 755.
[11] Schostarez, H. J. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 3628.

chiral en position β est parfaitement inversée et conduit aux deux diastéréomères de la déoxyaminostatine **2** en quelques étapes. Par contre, la purification sur une grande échelle a posé des problèmes. La mésylation de l'hydroxyle en position β, suivie par une cyclisation intramoléculaire effectuée en présence de carbonate de potassium donne de meilleurs résultats. Les acides diaminés protégés sont donc synthétisés en 4 étapes avec un rendement global de 41% et 36% pour les diastéréomères 3*R*,4*S* et 3*S*,3*S* respectivement.

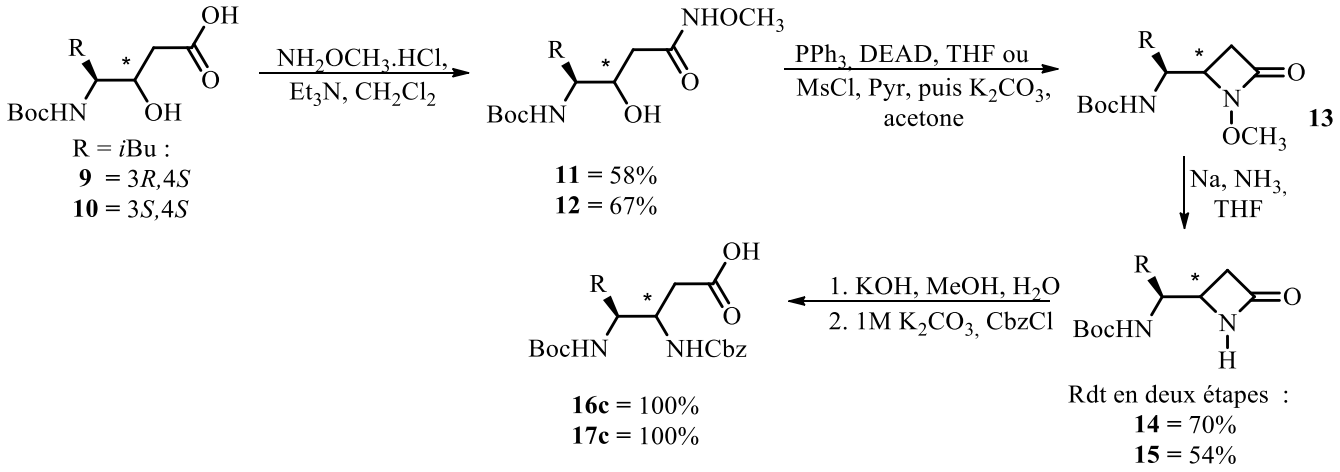


Schéma 2

Un nouvel accès aux acides β,γ-diaminés, notamment à la déoxyaminostatine **25b** a été publié par le groupe de Kunieda en 2001[12] (Schéma 3). Les deux diastéréomères (*R*,*R*) et (*S*,*S*) ont été synthétisés à partir de la 1,3-diacétyl-2-imidazolone **18**. Les auteurs ont rencontré des difficultés pour séparer les deux diastéréomères **19a** et **19b** sous forme d'ether méthylique. La transformation des dérivés de la 4,5-diméthoxyimidazolidin-2-one **19a** et **19b** en 4,5-benzyloxyimidazolidin-2-one a permis d'effectuer une séparation efficace, puis l'hydrogénolyse dans le méthanol donne les deux diastéréomères (*R*,*R*) **20a** et (*S*,*S*) **20b** séparés. La présence de l'auxiliaire chiral (MAC) est nécessaire pour effectuer l'alkylation stéréocontrolée de l'imidazolidinone **21b**. Les transformations suivantes donnent accès à la déoxyaminostatine **25b** en 11 étapes avec un rendement de 10%.

[12] Seo, R.; Ishizuka, T.; Alaa, A.-M.; Abdel-Aziz; Kunieda, Takehisa *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 6353.

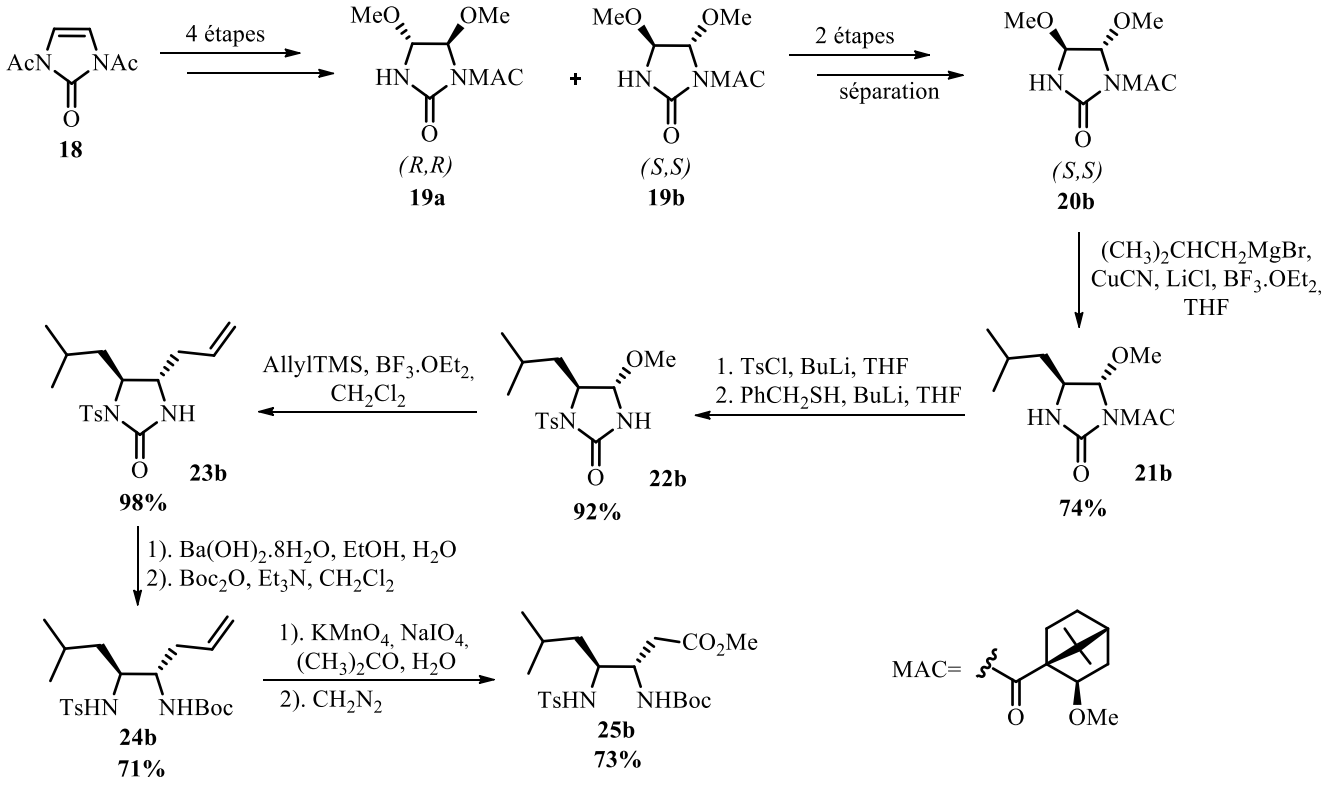


Schéma 3

L'équipe de Kim a publié une autre synthèse de dérivés **30** et **31** de la déoxyaminostatine en 2005 (Schéma 4). L'étape clé de cette synthèse est une addition conjuguée sur un γ-aminoester α,β-insaturé **26**.[13] La synthèse commence avec la N-Boc-L-leucine commerciale qui est transformée en γ-aminoester-α,β-insaturé **26** en 3 étapes. En présence d'une base forte la molécule subit une addition conjuguée intramoléculaire avec un rendement de 78% et un bon rapport diastéréomérique de 10 : 1 (*trans* : *cis*). Par contre, aucune étude de racémisation du centre chiral n'a été effectuée. Le dérivé de la déoxyaminostatine a été obtenu en 9 étapes avec un rendement global de 25% pour le dérivé protégé par un carbamate **31** et 20% par un acétamide **30**.

[13] a) Yoo, D.; Oh, J. S.; Kim, Y. G. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1213. b) Yoo, D.; Kwon, S.; Kim, Y. G. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 3762. c) Yoo, D.; Kim, H.; Kim, Y. G. *Synlett* **2005**, *11*, 1707.

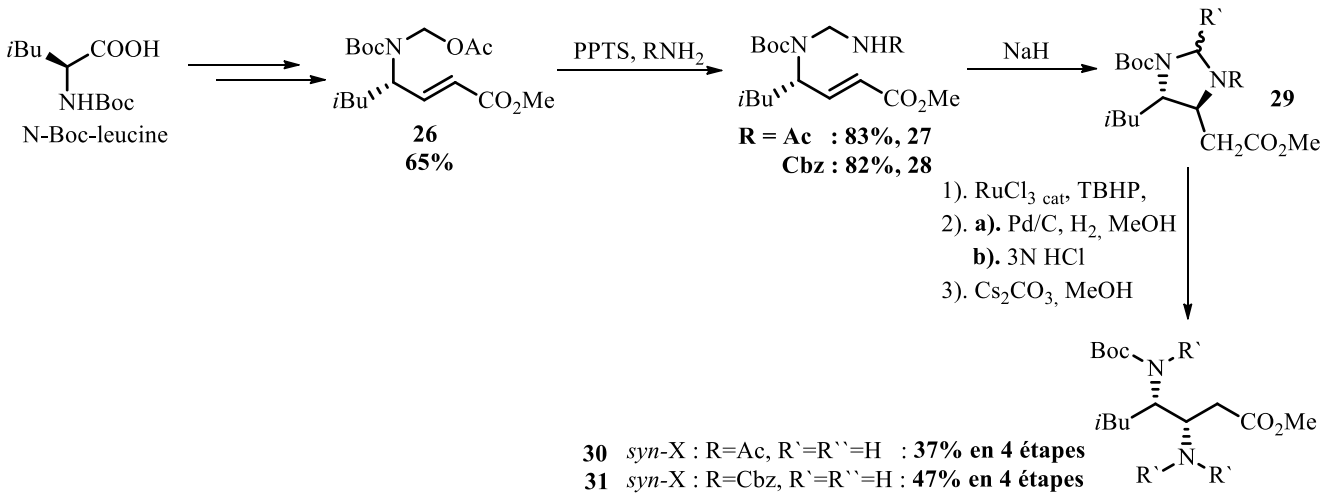
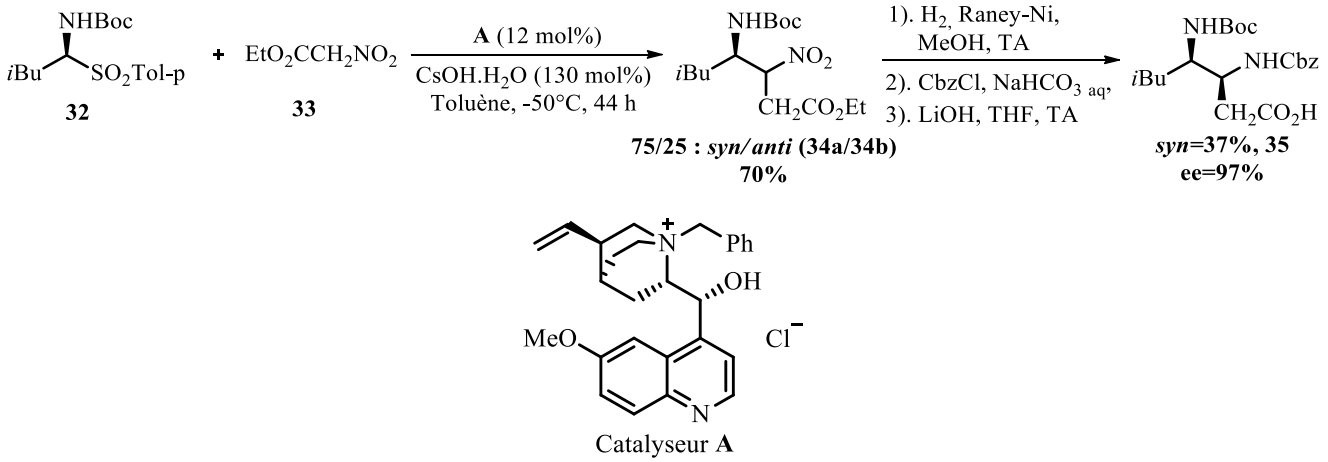


Schéma 4

Le groupe de Palomo[14] a décrit en 2008 une synthèse d'un dérivé **35** de la déoxyaminostatine qui passe par une réaction d'aza-Henry asymétrique catalysée par transfert de phase (Schéma 5).



Catalyseur **A**

Schéma 5

L'étape clé est une réaction entre l'α-amino sulfone protégée **32** et le β-nitro ester **33** en présence de $CsOH.H_2O$ et d'une quantité catalytique de sel d'ammonium quaternaire chiral **A**, dérivé de la quinine. L'acide β-nitro-γ-aminé est isolé à l'issue de cette réaction avec un rendement de 70% et un rapport *syn* : *anti* de 75 : 25 (**34a** : **34b**); l'ee du composé **35** de configuration *syn* est de 97%. Le dérivé de la déoxyaminostatine est synthétisé en 5 étapes avec un rendement global pour le diastéréomère magoritaire **35** de 21%.

[14] a) Palomo, C.; Oiarbide, M.; Laso, A.; Lopez, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17622. b) Gomez-bengoa, E.; Linden, A.; Lopez, R.; Mugica-mendiola, I.; Oiarbide, M.; Palomo, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7955.

En 2009, l'équipe de Concellon[15] a présenté une synthèse stéréosélective d'ester 3,4-diaminés énantiopurs issus d'une addition d'énolates de samarium sur des imines (Schéma 6).

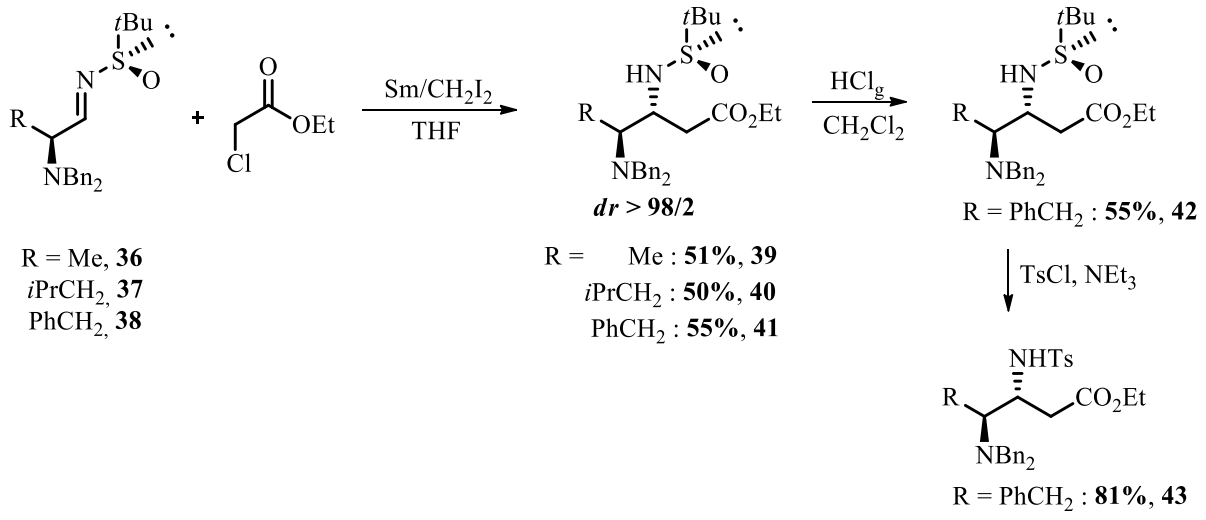


Schéma 6

Dans cette réaction, le diiodure du samarium est généré *in situ* avec une poudre de samarium dans le diiodométhane. Puis, l'énolate de samarium s'additionne sur la 2-aminoimine protégée sous forme de sulfinimine chirale avec une excellente diastéréosélectivité. L'inconvénient de cette réaction est l'utilisation d'une sulfinimine chirale qui, d'après les auteurs, n'influe pas sur la stéréosélectivité. De plus, cette méthodologie n'a pas été appliquée aux substrats avec des chaînes latérales fonctionnalisées.

Le groupe de Lee et Ha[16] s'est intéressé à la synthèse des dérivés de la déoxyaminostatine par addition d'amine sur l'acrylate d'aziridine **45** (Schéma 7).

[15] Concellon, J. M.; Rodriguez-Solla, H.; Simal, C.; Del Amo, V.; Garcia-Granda, S.; Rosario Diaz, M. *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 2991.
[16] Yoon, D.-H.; Ha, H.-J.; Kim, B. C.; Lee, W. K. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 2181.

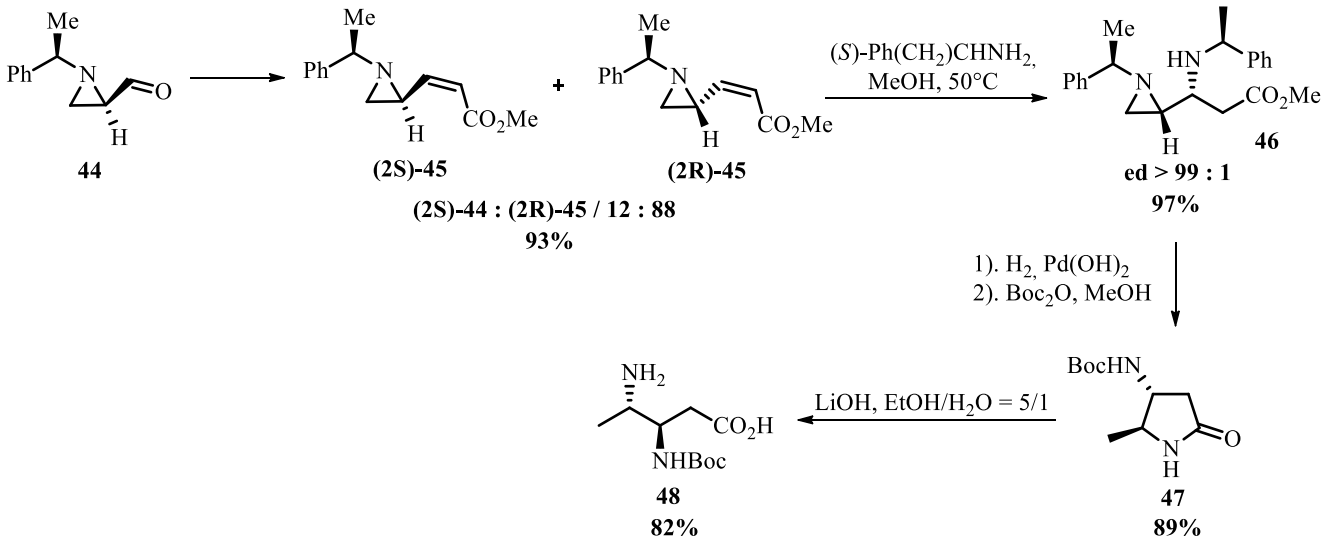


Schéma 7

Les meilleurs résultats sont obtenus lorsque la (*S*)-α-méthylbenzylamine est additionnée sur l'aziridine **45**. Les auteurs ont remarqué une baissse importante du rapport diastéréomérique en cas d'utilisation d'amines non chirales. Les deux centres asymmétriques sont donc nécessaires pour obtenir une très bonne diastéréosélectivité. L'acide β,γ-diaminé correspondant **48** est obtenu après ouverture de l'aziridine **46** sous hydrogénation et ouverture du cycle de l'aminopyrrolidinone **47** en milieu basique.

Plusieurs autres méthodes pour synthétiser les acides β,γ-diaminés ont été publiées. Les acides aminés finaux sont soit issus de l'addition conjugée de dérivés organiques pseudoénantiomériques du lithium sur les différents esters γ-amino-α,β-insaturés racémiques (dérivés des acides a-aminés corréspondants) suivie par une résolution cinétique[17], soit de la réaction de Michael sur des γ-amino esters α,β-insaturés[18], soit d'une addition nucléophile d'énolates sur des N-acyl-β-amino imines[19], soit d'une amination réductrice sur des γ-amino-β-céto esters[20] ou des séries de transformation plus complexes[21].

[17] Lee, J. A.; Roberts, P. M.; Thomson, J. E.; Yin, J.; Davies, S. G. *Org. Lett.* **2012**, *1*, 218.
[18] a) Doherty, A. M.; Kornberg, B. E.; Reily, M. D. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 795. b) Shiori, T.; Irako, N. *Chem. Lett.* **2002**, *2*, 130.
[19] Merino, P.; Franco, S.; Merchan, F. L.; Tejero, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5575.
[20] a) Martin-Martinez, M.; Bartolomé-Nebreda, J. M.; Gomez-Monterrey, I.; Gonzalez-Muniz, R.; Garcia-Lopez, M. T.; Ballaz, S.; Fortuno, A.; Del Rio, J.; Herranz, R. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3402. b) Bartolomé-Nebreda, J. M.; Garcia-Lopez, M. T.; Gonzalez-Muniz, R.; Cenarruzabeitia, E.; Latorre, M.; Del Rio, J.; Herranz, R. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4196.
[21] Macdonald, S. J. F.; Clarke, G. D. E.; Dowle, M. D.; Harrison, L. A.; Hodgson, S. T.; Inglis, G. G. A.; Johnson, M. R.; Shah, P.; Upton, R. J.; Walls, S. B. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5166.

En conclusion, hormis les stratégies développées au laboratoire, une synthèse générale, efficace énantio- et diastéréosélective d'acides β,γ-diaminés avec des chaînes latérales fonctionnalisées ou non-fonctionnalisées n'existe pas dans la littérature.

3. Résultats antérieurs du laboratoire

Une synthèse d'acides β,γ-diaminés relativement générale a été développée dans notre laboratoire. La stratégie est basée sur deux étapes clés qui permettent d'obtenir le produit énantio et diastéréomériquement pur à partir des acides aminés naturels : une réaction de Blaise suivie d'une réduction diastéréosélective (Schéma 8).

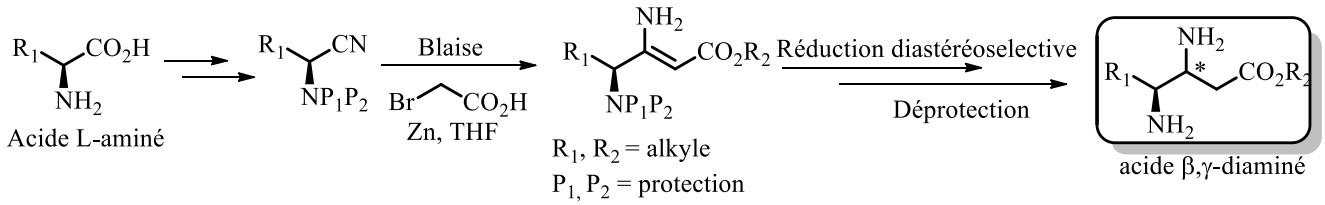


Schéma 8 : Synthèse générale envisagée d'acide β,γ-diaminé

Cette stratégie de synthèse a été appliquée à différents acides aminés avec des chaînes latérales fonctionnalisées et non-fonctionnalisées[22]. Le meilleur résultat a été obtenu avec l'acide β,γ-diaminé issu de la L-valine qui a été synthétisé en 12 étapes avec un excellent rendement de 72%[23]. Seulement deux purifications sur une colonne de gel de silice ont été effectuées au cours de la synthèse. Nous allons présenter plus en détails cette synthèse.

3.1 Synthèse du nitrile protégé

La synthèse commence par la protection du groupement amine **49**, transformation de l'acide en amide **50** puis déshydratation en nitrile **51** sans racémisation du centre chiral. Dans le cas de l'acide aspartique et de l'acide glutamique il est nécessaire de protéger la deuxième fonction acide en la transformant préalablement en ester méthylique (Schéma 9).

[22] Hoang C. T.; *Thèse de doctorat*, Université Paris-Sud Orsay **2007**.
[23] Thetiot-Laurent, S.; Bouillère, F.; Baltaze, J.-P.; Brisset, F.; Feytens, D.; Kouklovsky, C.; Miclet, E.; Alezra, V. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 9660.

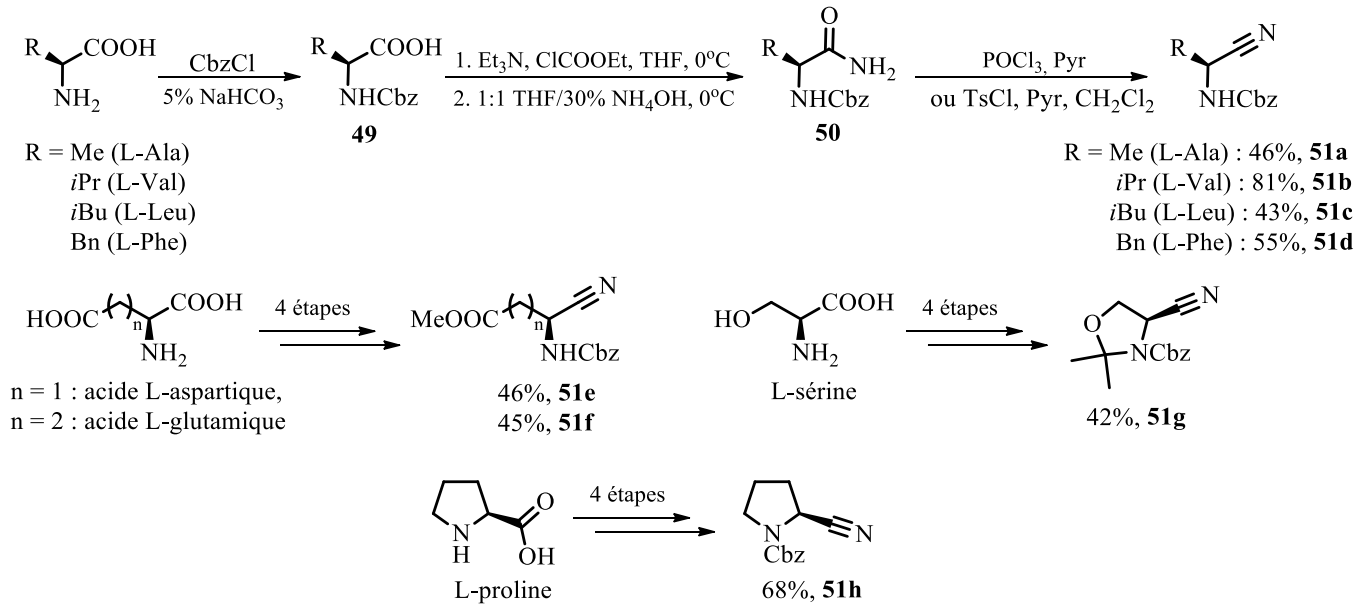


Schéma 9 : Formation du nitrile 51

L'aminonitrile monoprotégé **51a-d** ainsi obtenu subit ensuite une double protection par le groupement benzyle afin d'éviter les réactions secondaires qui pourraient se produire au cours de la réaction de Blaise (Schéma 10).

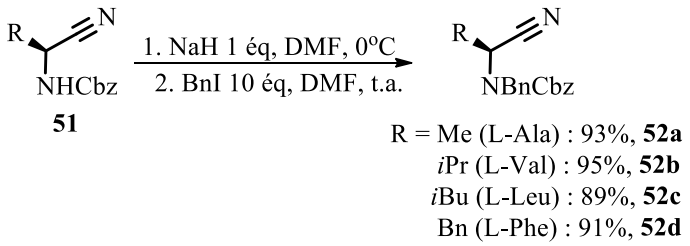


Schéma 10 : Diprotection du nitrile 51

Les études précédentes ont montré un besoin de canuler l'anion formé par la déprotonation avec NaH directement dans le ballon contenant un large excès d'iodure de benzyle pour éviter la racémisation du produit.

3.2 Réaction de Blaise

Une fois les nitriles **52** obtenus, la réaction de Blaise a été effectuée (Schéma 11). Cette réaction est une variation de la réaction de Reformatsky dans laquelle le zinc en poudre réagit avec un α-bromoester[24] **53a**, puis s'additionne sur un nitrile **53b**. La réaction passe par la formation d'une

[24] Revue : H. S. P. Rao, S. Rafi, K. Padmavathy *Tetrahedron* **2008**, *64*, 8037. Réaction de Blaise réalisées dans notre laboratoire : a) Mauduit, M.; Kouklovsky, C.; Langlois, Y. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, *5*, 1595. b) Maudit, M.; Kouklovsky, C.; Langlois, Y. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1053.

métalloimine **53c**, qui peut être hydrolysée en β-cétoester **53f** en milieu acide ou en énaminoester **53h** en milieu basique.

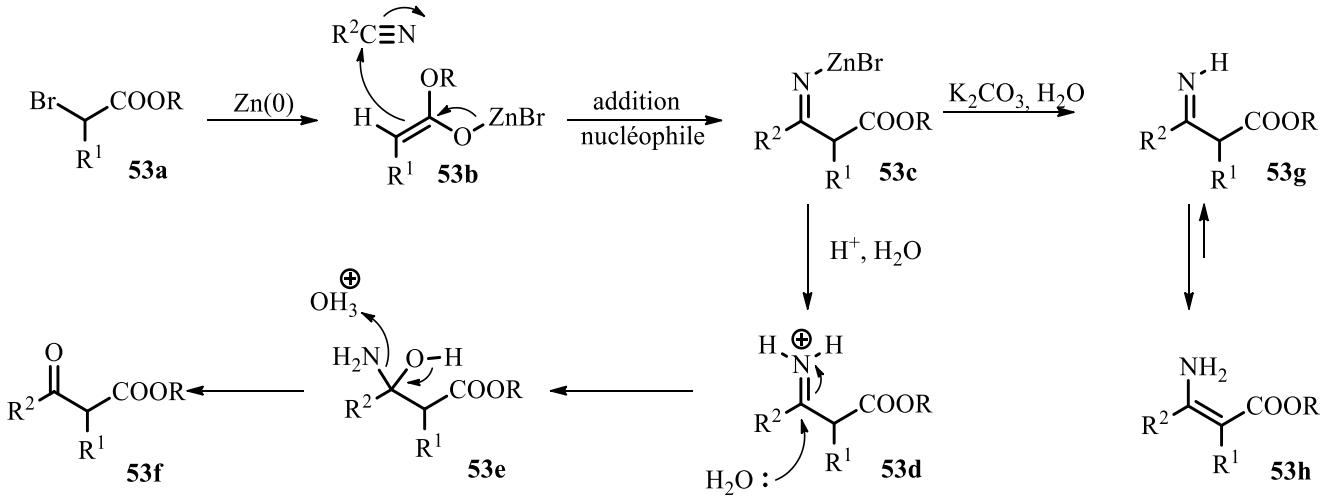


Schéma 11 : Mécanisme de la réaction de Blaise

Lors de cette réaction, l'énaminoester attendu n'a pas pu être obtenu seul pour les composés **54a-d** mais il est toujours formé en mélange avec l'imidazolidinone **55a-d**, provenant de l'attaque nucléophile de l'intermédiaire iminohalozincique sur le carbamate. Afin d'obtenir un seul produit, le brut réactionnel est traité par NaH pour conduire totalement aux produits cycliques **55a-d** avec de bons rendements. Le nitrile **51e** issu de l'acide aspartique conduit à l'aminopyrolidinone issue d'une cyclisation sur l'ester méthylique **55e** (Schéma 12).

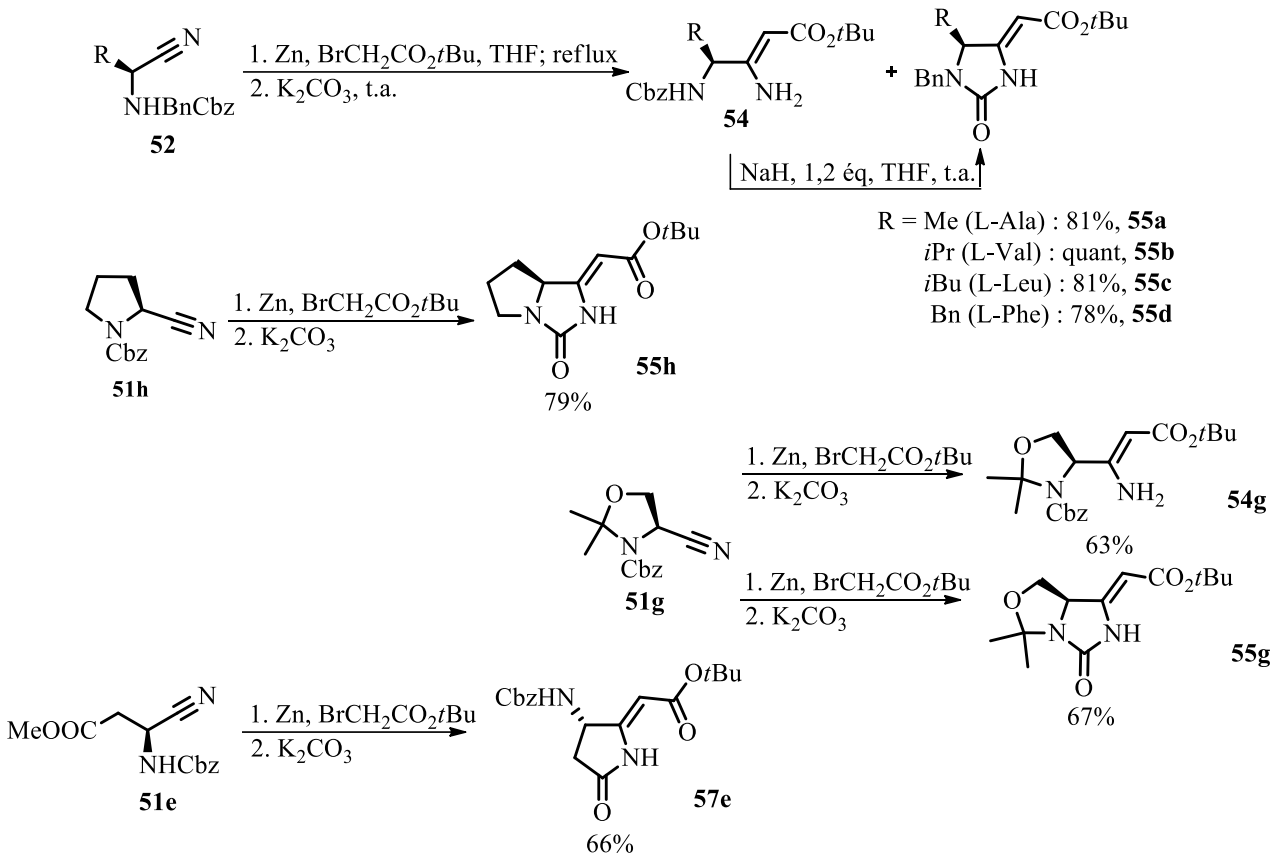


Schéma 12 : Réaction de Blaise

Dans le cas de l'acide glutamique le nitrile **51f** conduit à la formation de deux produits de cyclisation **56f** et **57f** avec des rendements très faibles (Schéma 13).

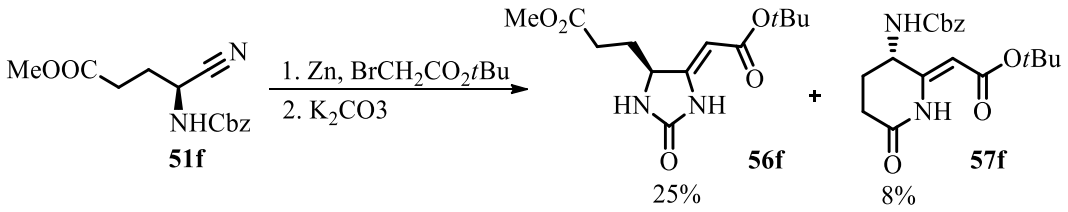


Schéma 13 : Réaction de Blaise sur le nitrile issu de l'acide glutamique

Des études d'optimisation de cette réaction pour obtenir uniquement le dérivé de la piperidinone **57f** ont été réalisées (Schéma 14). Dans un premier temps, le groupement protecteur Cbz a été remplacé par le Boc qui a donné un meilleur rendement de 25%. Ensuite, il a été décidé d'utiliser le groupement non-électrophile Ts pour protéger l'amine. La synthèse de l'amide **61** a été légèrement modifiée pour éviter les réactions secondaires dues à la présence du chloroformate d'éthyle. L'étape de la

déshydratation a été effectuée avec de l'anhydride trifluoroacétique qui conduit au nitrile **62** désiré dans des conditions plus douces sans racémisation et avec un rendement quantitatif [25,26].

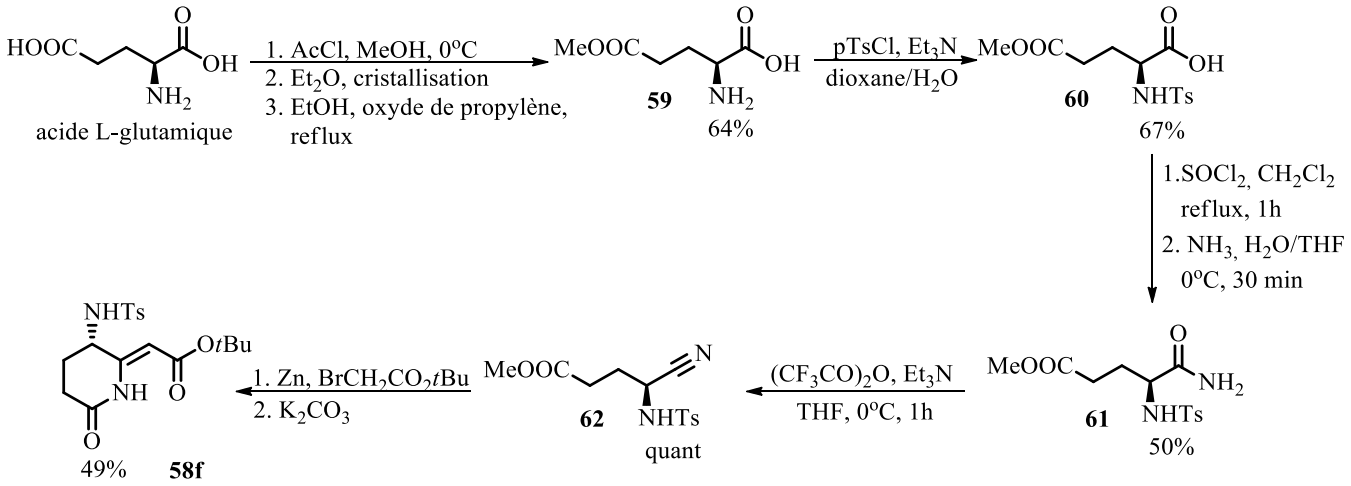


Schéma 14 : Séquence réactionnelle conduisant au dérivé de l'acide glutamique 55f

3.3 Réduction diastéréosélective

Après avoir synthétisé les énaminoesters **55a-h**, différentes conditions ont été utilisées pour effectuer une réduction diastéréosélective : $NaBH_3CN$, réduction de Birch et hydrogénation catalytique[27] (Schéma 15).

La réduction par le $NaBH_3CN$ est totalement diastéréosélective dans le cas de la série valine, mais la réduction des autres énaminoester donne un mélange de deux diastéréomères avec des rapports diastéréomériques souvent proches de 1:1. L'utilisation des conditions de la réaction de Birch conduit dans tous les cas à un seul diastéréomère mais avec des rendements plus faibles à cause de la saponification partielle et la surréduction de l'acide en alcool. Le traitement par la soude à la fin de la réaction permet d'isoler seulement l'acide correspondant, facilement séparé de l'alcool. Dans le cas de l'énaminoester **55h** issu de la proline la réestérification est indispensable pour réussir à isoler le produit.

[25] Thompson, S. A.; Andrews, P. R.; Hanzlik, R. P. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 104.
[26] Bouillère F.; *Thèse de doctorat*, Université Paris-Sud Orsay **2010**.
[27] Hoang, C. T.; Alezra, V.; Guillot, R.; Kouklovsky, C. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2521.

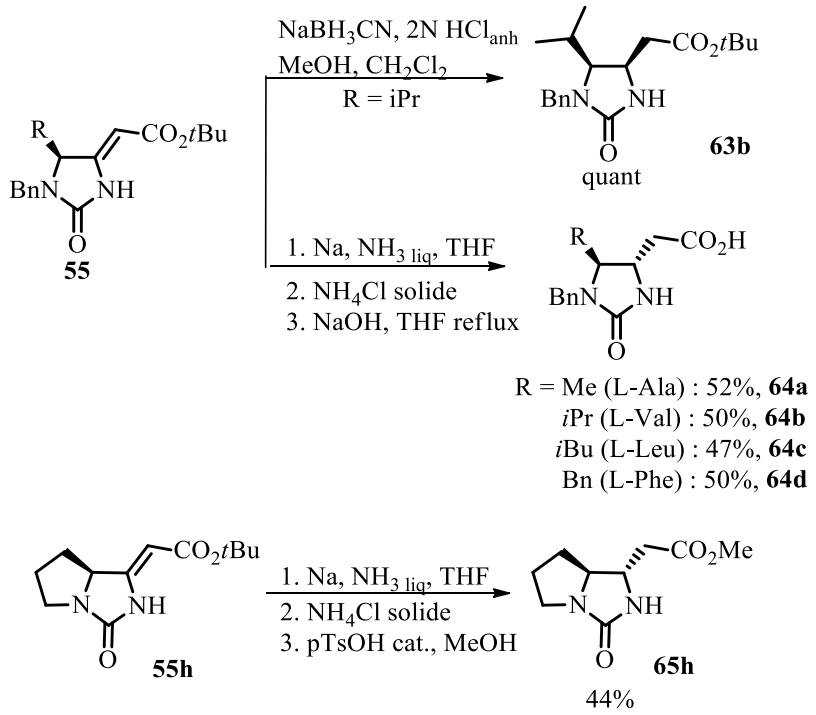


Schéma 15 : Réduction de l'énamine 55

La configuration relative *cis* du composé **63b** a été déterminée grâce à la structure RX du composé obtenu après débenzylation. Par comparaison des spectres RMN du composé issu du dérivé de la valine **63b** saponifié et du composé **64b**, il a été déduit que la configuration relative du composé **64b** était *trans*. Par comparaison des donnés RMN, cette configuration relative a été étendue à tous les acides issus de la réduction de Birch.

Dans le cas de la sérine un rendement correct n'a pu être obtenu qu'avec $NaBH_3CN$ (Schéma 16). La configuration absolue a été déterminée grâce au protocole de Mosher.[28] Le rapport diastéréomèrique est de 75 : 25 (*R,S* : *R,R*)[29].

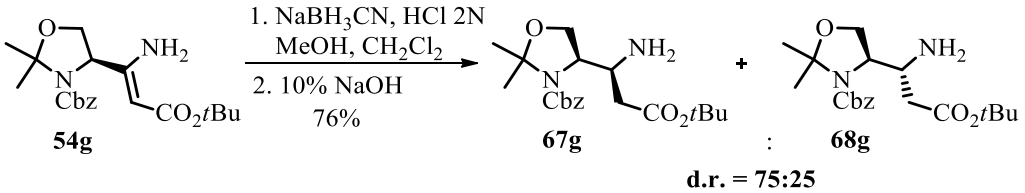


Schéma 16 : Réduction du dérivé de la sérine 54g

En série acide aspartique (Schéma 17), il est possible d'obtenir, selon les conditions de la réduction, soit le produit déprotégé **93e**, soit un seul diastéréomère de la pyrrolidinone déprotégée **94e**

[28] Dale, J. A.; Mosher, H. S. *J. Am. Soc.* **1973**, *95*, 512.
[29] Hoang, C. T.; Bouillère, F.; Johannesen, S.; Zulauf, A.; Panel, C.; Gori, D.; Pouilhes, A.; Alezra, V.; Kouklovsky, C. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 4177.

avec la double liaison réduite. La configuration absolue (*R*,*S*) a été déterminée grâce à une étude RMN (notamment une expérience NOESY) et confirmée par la structure RX (Figure 9) d'un dérivé de la pyrrolidinone **95e**.

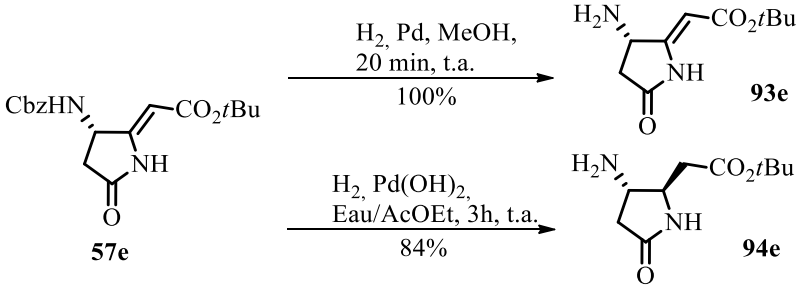


Schéma 17 : Réduction du dérivé de l'acide aspartique 57e

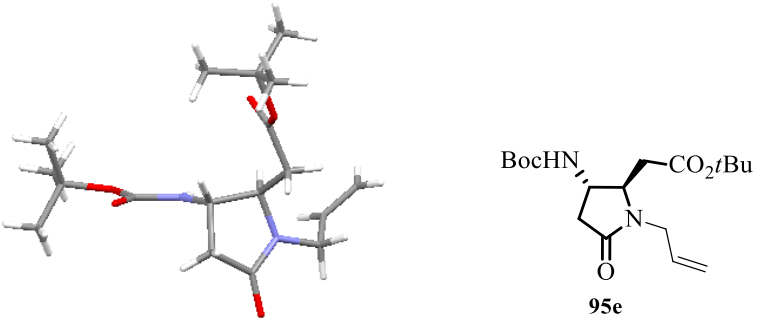


Figure 9 : Structure RX du composé 95e

En série acide glutamique, l'hydrogénation catalytique conduit à un mélange de deux diastéréomères avec un rapport de 70/30 (Schéma 18). Les études pour déterminer la configuration relative n'ont pas été effectuées.

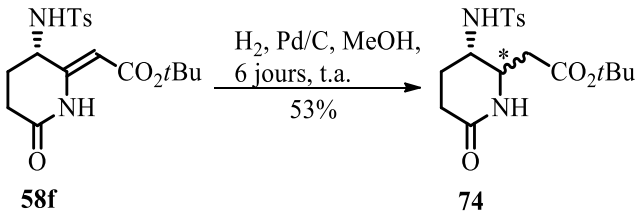


Schéma 18 : Réduction du dérivé de l'acide glutamique 58f

3.4 Acides β,γ-diaminés

Les études d'ouverture du cycle ont été effectuées sur les dérivés de la valine, de la leucine et de l'acide aspartique. Les différentes tentatives d'ouverture du cycle imidazolidinone pour obtenir directement les acides β,γ-diaminés n'ont pas donné de résultat concluant. Dans le cas de la leucine et

de la valine, seule une débenzylation des imidazolidinones suivie d'une ouverture en milieu acide conduit à la formation des aminopyrrolidinones correspondantes par recyclisation (Schéma 19). La protection du groupement amine par le Cbz, puis l'activation de l'amide par le Boc et l'ouverture du cycle en milieu basique mènent, selon les conditions, à l'ester ou à l'acide β,γ-diaminé orthogonalement protégé.

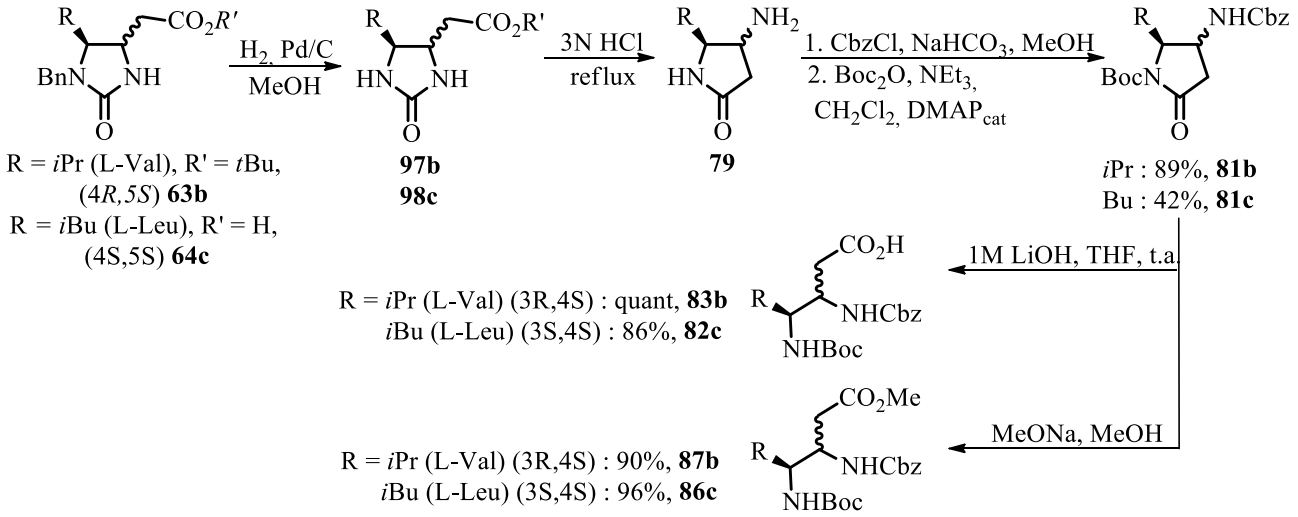


Schéma 19 : Séquence réactionnelle pour former l'acide β,γ-diaminé orthogonalement protégé

En série acide aspartique, le groupement amine de la pyrrolidinone **94e** a été protégé par un Boc, la fonction amide a été activée par un carbamate Cbz et le cycle a été ouvert avec du méthanolate de sodium dans le méthanol donnant accès à l'acide β,γ-diaminé **96e** comportant deux groupement acides protégés orthogonalement[30] (Schéma 20).

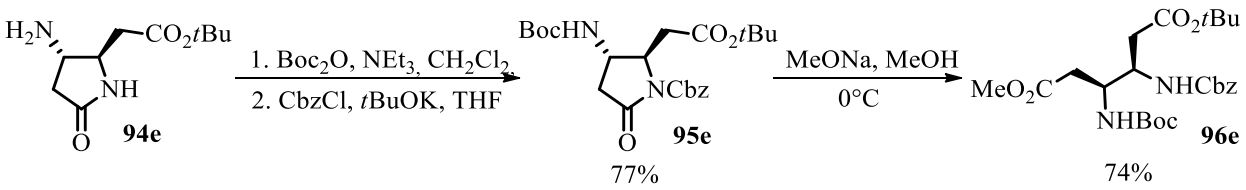


Schéma 20 : Ouverture du cycle et transformations conduisant à l'acide β,γ-diaminé 96e

[30] Bouillère, F.; Guillot, R.; Kouklovsky, C.; Alezra, V. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 394.

3.5 Synthèse totale du (+)-némonapride 103

Afin de valoriser la stratégie de synthèse proposée, une synthèse totale du (+)-némonapride[31] **103** a été effectuée à partir de la D-alanine. Le (+)-némonapride **103** est un agent antipsychotique utilisé dans le traitement de la schizophrénie.

La D-alanine a été transformée en imidazolidinone **99** correspondante en 6 étapes avec un rendement de 23% (Schéma 21). La synthèse passe par la réduction de Birch qui donne un seul diastéréomère *R,R.* Après avoir recyclisé et réduit la fonction amide avec du LAH, l'aminopyrrolidine **77** a été obtenue et engagée dans le couplage avec le composé **102** pour donner le (+)-némonapride **75**[32].

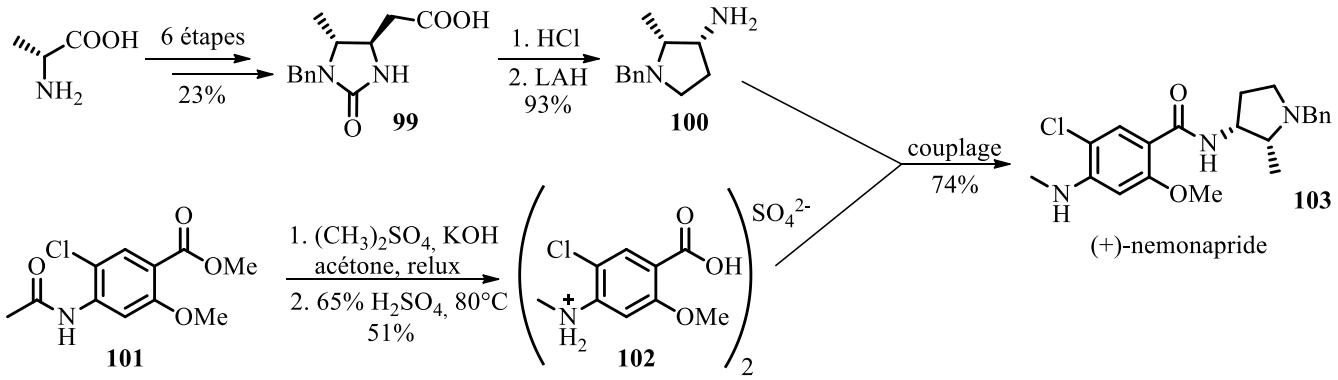


Schéma 21 : synthèse du (+)-némonapride 103

3.6 Conclusion

Au cours des travaux précédents effectués dans notre laboratoire 3 acides β,γ-diaminés issus de la valine, la leucine et l'acide aspartique ont été synthétisés avec des rendements globaux de 72%, 9% (non optimisé) et 15% (non optimisé) respectivement. La synthèse proposée est complètement diastéréosélective et non-racémisante. Une synthèse totale du (+)-némonapride **103** a été effectuée à partir de la D-alanine en 8 étapes avec un rendement global de 16%.

Une stratégie de synthèse générale des acides β,γ-diaminés a été développée et mise en place dans notre laboratoire, mais certaines étapes restent à optimiser. Le but de ma thèse est d'améliorer la synthèse de l'acide β,γ-diaminé issu de la leucine et d'élargir la gamme des nouveaux acides β,γ-diaminés, notamment, en série phénylalanine. L'objectif est ensuite d'incorporer les acides β,γ-diaminés dans une chaîne peptidique contenant des acides aminés naturels pour voir leur influence sur la structuration et l'activité biologique des nouveaux peptides hybrides α/γ.

---

[31] a). Iwanami, S.; Takashima, M. ; Hirata, Y.; Hasegawa, O.; Usuda, S. *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 1224. b). Huang, P. Q.; Wang, S. L.; Zheng, H.; Fei, X. S. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 271. c). Assié, M.-B.; Cosi, C.; Koek, W. *Eur. J. Pharmacol.* **1997**, *334*, 141. d). Shibugushi, T.; Mihara, H.; Kuramochi, A.; Ohshima, T., Shibasaki, M. *Chem. Asian J.* **2007**, *2*, 794.

[32] Hoang, C. T.; Nguyen, V. H.; Alezra, V.; Kouklovsky, C. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 1162.

4. Résultats obtenus selon l'ancienne stratégie du laboratoire

Comme nous l'avons dit précédemment, l'objectif de ce travail est d'améliorer la synthèse des acides β,γ-diaminés à partir de la leucine et d'élaborer la suite en série phénylalanine. La stratégie de synthèse présentée dans le chapitre précédent a été appliquée à ces deux acides aminés.

4.1 Synthèse du nitrile diprotégé

La phénylalanine et la leucine ont été protégées avec le chloroformate de benzyle, puis la fonction acide a été transformée d'abord en fonction amide, en passant par un ester activé. Dans un premier temps, nous avons effectué la deshydratation de l'amide **50** en présence de pyridine et de $POCl_3$. Cette réaction donne de bons rendements, cependant, elle n'est pas du tout reproductible. La déshydratation par l'anhydride trifluoroacétique dans le tetrahydrofurane en présence de triéthylamine a été réalisée avec un rendement quantitatif et fiable dans ces deux cas. Puis, la double protection du carbamate a été réalisée en utilisant les conditions developpées précédemment (Schéma 22).

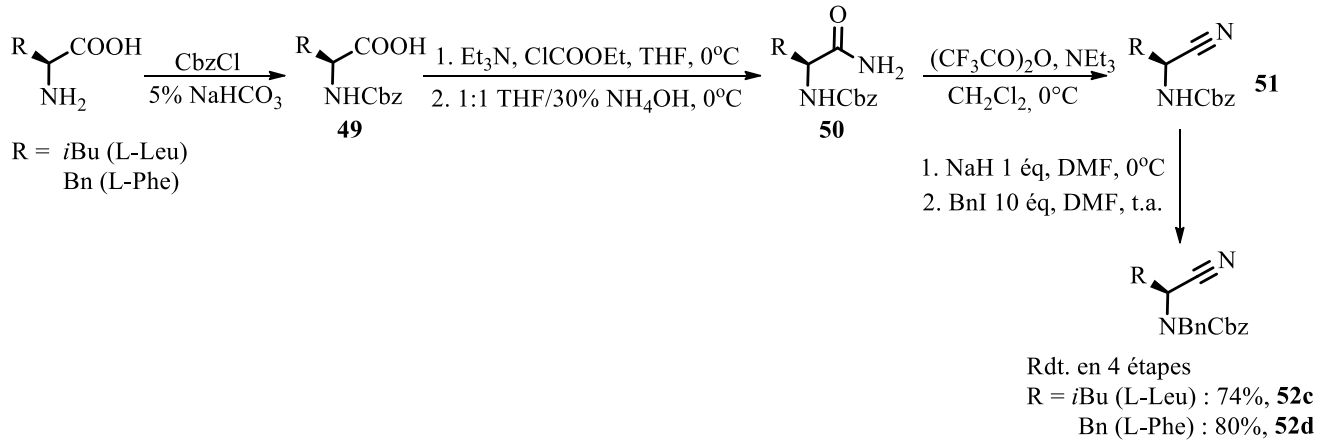


Schéma 22 : Transformation de la leucine et la phénylalanine en nitriles 52 correspondants diprotégés

Les nitriles **52c** et **52d** diprotégés issus de la leucine et de la phénylalanine sont obtenus avec des rendements de 74% et 80% respectivement en 4 étapes. Une seule purification par une colonne de gel de silice a été éffectuée pour purifier le nitrile diprotégé **52**.

Malgré le rendement excellent, la synthèse présente certains inconvenients notamment en ce qui concerne l'étape de la double protection car il est nécessaire d'appliquer 10 équivalents du BnI (fort cancérogène et lacrymogène) afin d'éviter la racémisation du centre stéréogène.

4.2 Réaction de Blaise

La réaction de Blaise a été réalisée en utilisant les conditions optimisées dans les travaux précédents. La poudre de zinc a été activée avec quelques gouttes de dibromoéthane et quelques gouttes de bromoacétate de *tert*-butyle.

Au cours de cette réaction nous avons aussi observé la formation du produit 'ouvert' **54** de façon très minoritaire. La réaction a été laissée 2 heures au reflux afin de transformer tout le nitrile **52** en produit cyclisé **55** sans utiliser le NaH, comme cela avait été fait précédemment (Schéma 23).

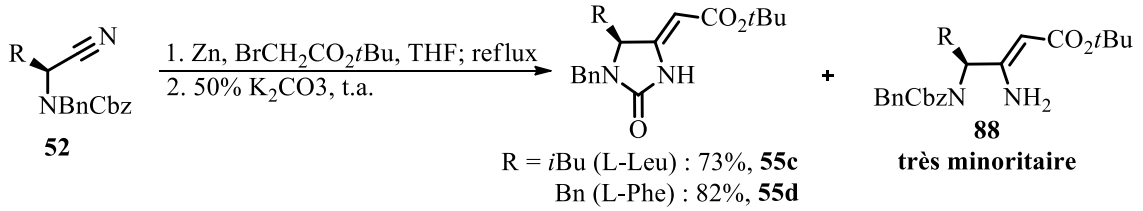


Schéma 23 : Réaction de Blaise

L'imidazolidinone **55** obtenue présente certains inconvénients car elle n'est pas très stable. La double liaison se déplace facilement pour former une urée cyclique qui possède un caractère aromatique sans aucun centre stéréogène (Schéma 24).

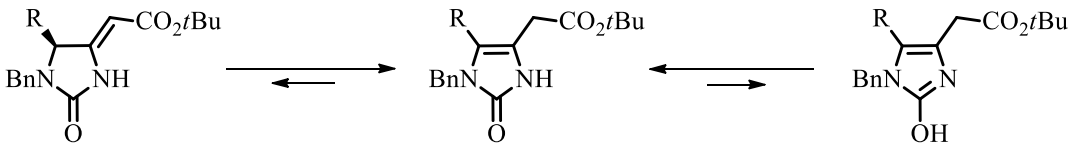


Schéma 24 : Aromatisation de l'imidazolidinone

Nous avons observé que l'urée en série leucine est moins stable qu'en série phénylalanine. Le moindre chauffage ou passage aux ultrasons peuvent déclencher le déplacement de la double liaison.

4.3 Réduction diastéréoséléctive

Les urées cycliques **55** subissent une réduction radicalaire de Birch, qui permet de réduire les noyaux aromatiques et les doubles liaisons conjuguées à l'aide de sodium dans l'ammoniac liquide à -78°C (Schéma 25). Dans notre cas l'objectif est de réduire la double liaison.

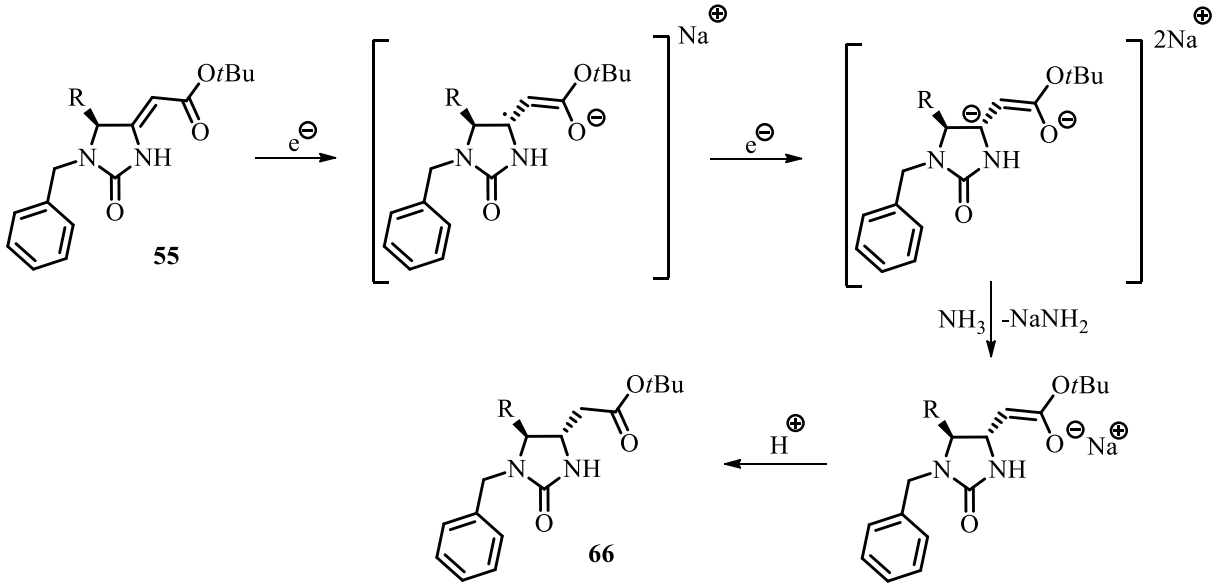


Schéma 25 : Mécanisme réactionnel de la réaction de Birch

La diastéréosélectivité est imposée par le centre chiral de l'acide naturel de départ. La réaction de Birch est stéréosélective et conduit à un seul diastéréomère *trans*.

La réduction de l'imidazolidinone **55c** en série leucine conduit au produit **77c** à la fois réduit et déprotégé avec un rendement faible de 20% (Schéma X). Le produit réduit protégé attendu n'a pas été obtenu. Nous pouvons considérer que l'urée n'est pas stable dans les conditions radicalaires de la réaction de Birch, ce qui fait que nous obtenons des produits de dégradation difficilement analysables.

Dans le cas de la série phénylalanine, nous obtenons seulement le produit réduit protégé **66d** avec un bon rendement de 73% (Schéma 26). Nous avons essayé d'augmenter le temps de réaction et la quantité du sodium pour effectuer la réduction et la déprotection au même temps, mais le produit déprotégé n'a toujours pas été observé et une baisse de rendement est constatée.

Il faut souligner que le produit saponifié n'est observé dans aucun des deux cas.

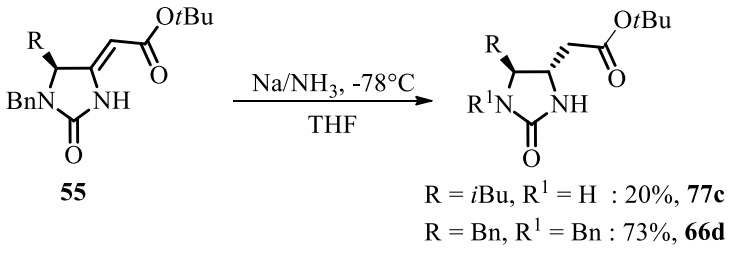


Schéma 26 : Réduction de la double liaison

4.4 Vers les acides β,γ-diaminés

La déprotection du groupement benzyle en série phénylalanine dans les conditions classiques d'hydrogénolyse sur Pd/C ou $Pd(OH)_2/C$ avec des concentrations en catalyseur de respectivement 10%

et 20% n'a pas conduit au produit désiré. Nous avons réussi à déprotéger l'urée **66d** en ajoutant quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré dans le mélange réactionnel toujours en présence de Pd/C. Par contre le produit subit une transestérification au cours de la réaction (Schéma 27).

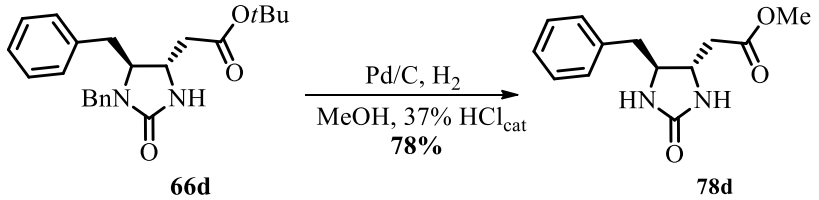


Schéma 27 : Déprotection et transestérification du composé 80d

Ensuite, nous avons utilisé une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 3N portée à reflux pour ouvrir l'urée cyclique. Le produit intermédiaire subit une cyclisation intramoléculaire pour donner l'aminopyrrolidinone **80** correspondante (Schéma 28) :

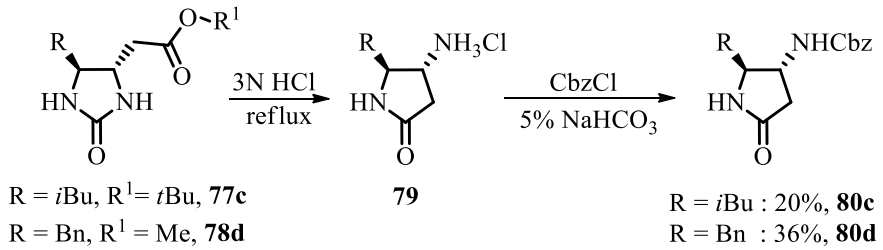


Schéma 28 : Recyclisation de l'urée cyclique conduisant à l'aminopyrrolidinone

Le sel cyclique **79** est engagé directement sans traitement dans la protection avec le chloroformate de benzyle. Les produits issus de la série L-leucine et L-phénylalanine sont obtenus avec un faible rendement de 20% et 36% respectivement.

La dernière étape d'ouverture du lactame n'a pas été effectuée car la quantité de produit n'était pas suffisante pour être engagée dans un couplage peptidique. Les rendements globaux en série leucine et série phénylalanine sont de 1,4% et 12% respectivement.

4.5 Conclusion

Malheureusement, nous n'avons pas réussi à reproduire les résultats obtenus précédemment. En tenant compte du rendement faible dans les deux cas et de la difficulté de certaines étapes de la synthèse nous avons décidé de changer de stratégie.

5. Résultats obtenus selon la nouvelle stratégie

5.1 Réaction avec le bromoacétate de *tert*-butyle

Après avoir examiné le schéma synthétique nous avons décidé d'engager le nitrile monoprotégé **51** dans la réaction de Blaise. En appliquant les conditions précédentes de la réaction de Blaise au nitrile **51c** issu de la leucine, nous avons obtenu majoritairement l'énamine **54c** avec un rendement de 55%. Des traces de l'urée cyclique sont observées au bout de deux heures de réaction.

La quasi absence de produit de cyclisation peut s'expliquer par l'arrachement du proton du carbamate en milieu basique lors de la réaction de Blaise. Dans ce cas une charge négative délocalisée sur l'azote apparait, ce qui diminue fortement la nature électrophile du carbonyle (Schéma 29) :

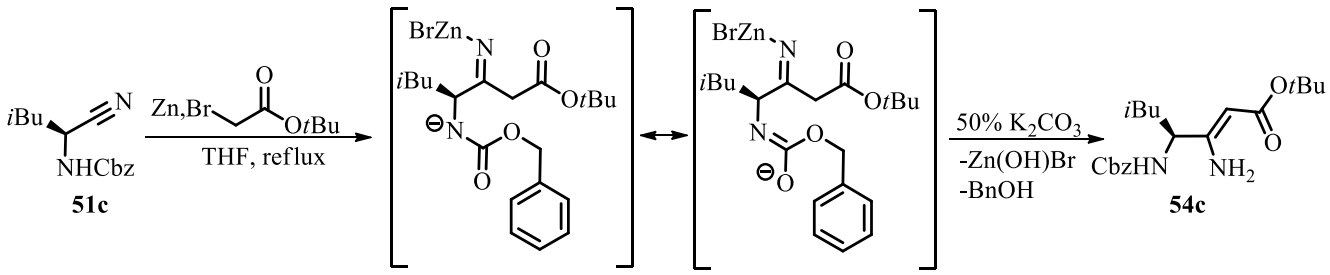
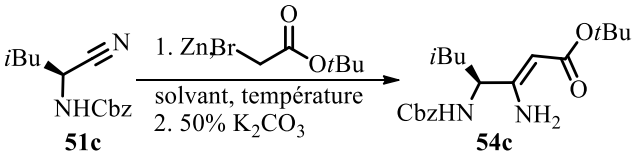


Schéma 29 : Mécanisme de formation de l'énamine 54c

La réaction a été testée dans différents solvants à des températures variables pour étudier leur influence sur la formation de l'énamine (Tableau 1). Dans le cas où le produit désiré n'a pas été observé au bout d'une heure, la réaction a été prolongée 24 heures. Nous pouvons remarquer que la réaction nécessite un solvant polaire avec une paire d'électrons libres qui se complexe au Zn au cours de la réaction. Les solvants avec plusieurs paires d'électrons libres 'inhibent' la réactivité du métal en occupant probablement toutes les orbitales vacantes, ce qui empêche l'insertion du Zn dans la liaison brome-carbone au cours de la réaction de Blaise. Les meilleures conditions sont finalement une réaction dans le THF à reflux pendant une heure (entrée 3). Ces conditions ont également été appliquées sur le dérivé de la phénylalanine (rendement = 55%).



Entrée	Solvant	Température,°C	Temps, h	Rendement
1	THF	t.a.	24	Traces de produit
2	THF	50	1	réactif+produit
3	THF	reflux	1	55%*
4	Diéthyléther	50	1	traces de produit

5	Dioxane	reflux	24	pas de conversion
6	Diméthoxyéthane	reflux	24	pas de conversion
7	Dichlorométhane	reflux	1	traces

* rendement en série leucine et en série phénylalanine

Tableau 1 : Influence du solvant sur la réaction de Blaise

Malgré le faible rendement de la réaction de Blaise avec le nitrile monoprotégé cette stratégie a ses avantages. D'abord, nous avons supprimé l'étape de la diprotection qui nécessite, comme cela a été dit précédemment, un grand excès d'iodure de benzyle qui est un composé fort lacrymogène et cancérogène. De plus, nous avons raccourci la voie de synthèse de l'acide β,γ-diaminé car il ne reste qu'à réduire l'énamine et à protéger la fonction amine en position β (Schéma 30) :

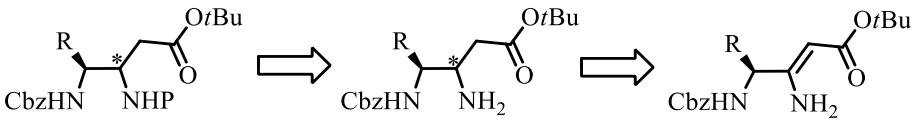


Schéma 30 : Retrosynthèse d'acide β,γ-diaminé envisagée à partir de l'énamine

La perte de la structure rigide dans le produit ouvert par rapport à l'urée cyclique implique certains enjeux dans la synthèse. Le degré de liberté de la chaîne carboné est beaucoup plus important que dans la structure cyclique. Ce phénomène diminue l'influence du substituant en position γ sur la diastéréosélectivité de la réduction. Puis, pour finir la synthèse, nous devons trouver un groupement protecteur orthogonal à la fois stable dans les conditions de déprotection du Cbz et du *t*Bu mais aussi un groupement qui peut être facilement enlevé.

D'abord sur le dérivé de la leucine **54c**, nous avons employé les conditions de la réduction de Birch pour réduire la double liaison, mais le produit désiré n'a pas été obtenu. L'énamine se dégrade complètement. La réduction a alors été réalisée avec $NaBH_3CN$.

Dans un premier temps, la réaction a été effectuée en présence de 1,5 équivalent de $NaBH_3CN$. Deux diastéréomères, séparables sur une colonne de gel de silice, ont été obtenus dans un rapport diastéréomèrique de 65/35 avec un rendement de 59%.

D'autre part, nous avons isolé le nitrile **51c**, réactif de la réaction de Blaise, comme produit secondaire. La quantité du produit de 'retro-Blaise' isolé varie à chaque fois. Nous supposons que cette réaction passe par le mécanisme indiqué dans le Schéma 31. L'utilisation d'un grand excès de $NaBH_3CN$ (10 équivalents) permet d'éviter la formation du nitrile **51c**. Les deux diastéréomères sont ainsi obtenus avec un rendement quantitatif.

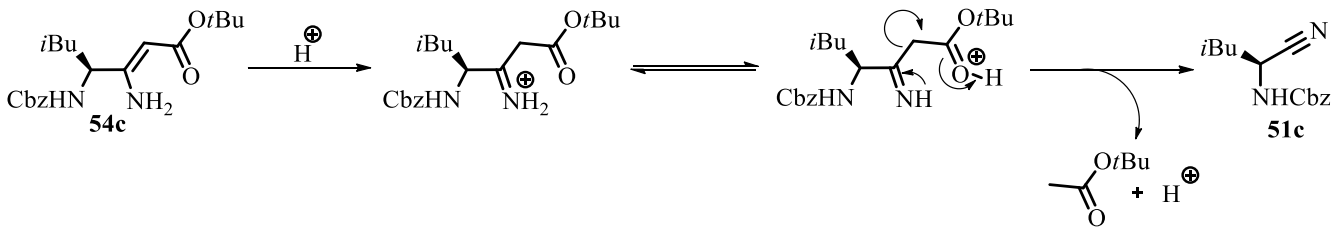


Schéma 31 : Mécanisme de la réaction de rétro-Blaise conduisant au nitrile de départ

La détermination de la configuration absolue des deux produits nous a posé beaucoup de problèmes. Les analyses par RMN n'ont pas donné d'information concrète car les atomes peuvent tourner librement autour de la chaîne carbonée. Les molécules peuvent ainsi adopter toutes sortes de conformations, ce qui fait que les spectres sont difficilement analysables dans les solvants favorisant la structuration ($CDCl_3$) et deviennent identiques dans les solvants qui ont tendance à casser les interactions intramoléculaire (CD_3OD). La configuration absolue de centres stéréogènes a pu être déterminée ultérieurement et a montré que le diastéréomère majoritaire était de configuration (*S,S)* (Voir Partie I.6.)

Dans un premier temps, le groupement protecteur Troc (2,2,2-trichloroethoxycarbonyl) nous a semblé être orthogonal au *t*Bu et au Cbz. En effet, la déprotection se produit en milieu acide faible à l'aide du zinc qui s'insère dans la liaison carbone-chlore, puis l'élimination et la décarboxylation conduisent à la formation de l'amine déprotégée. De plus, nous avons choisi cette protection en espérant faciliter la cristallisation des peptides.

Les produits réduits et séparés sont protégés par le groupement Troc en présence de triéthylamine avec des rendements quantitatifs dans les deux cas. Ensuite, l'acide est déprotégé par un excès d'acide trifluoroacétique avec un rendement excellent (Schéma 32) :

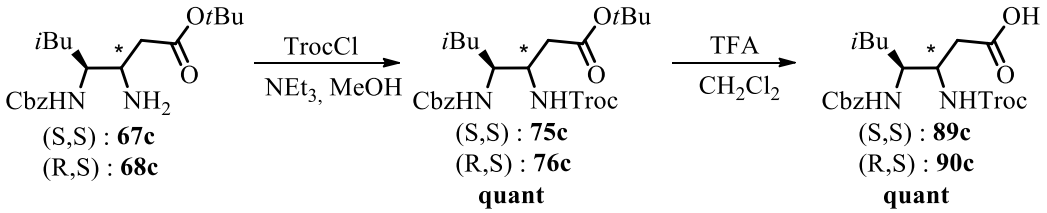


Schéma 32 : Synthèse de l'acide β,γ-diaminé protégé par le Cbz et le Troc

Grâce à cette nouvelle stratégie, nous avons pu synthétiser les deux diastéréomères de l'acide β,γ-diaminé issu de la leucine en 6 étapes avec un bon rendement total de respectivement 33% et 22% pour les composés (*S,S*) et (*R,S*). Les acides β,γ-diaminés obtenus sont de nouveaux building-blocks pour le couplage peptidique.

Nous avons commencé par tester le nouvel acide β,γ-diaminé **89c** en série leucine dans le couplage avec des acides α-aminés naturels (Schéma 33). L'ester méthylique de la L-valine a été couplé

avec l'acide β,γ-diaminé **89c** dans des conditions classiques en solution en présence de HOBt, EDCI et DIPEA comme agents de couplage dans le DMF. Le dipeptide **104** a été isolé avec un rendement de 57%. Après avoir déprotégé le groupement Cbz avec de l'hydrogène en présence du Pd/C, le produit a été engagé dans le couplage avec la Cbz-L-leucine en utilisant les mêmes conditions. Le tripeptide **105** a été obtenu avec un faible rendement de 36%. De plus, nous avons isolé également le tripeptide **106** possédant le groupement amine en position β de l'acide β,γ-diaminé déprotégé. Cela signifie que le groupement protecteur Troc ne résiste pas soit aux conditions du couplage peptidique, soit aux conditions de la déprotection du Cbz. Nous avons alors décidé de revenir en arrière et de trouver une autre protection qui satisfasse nos critères.

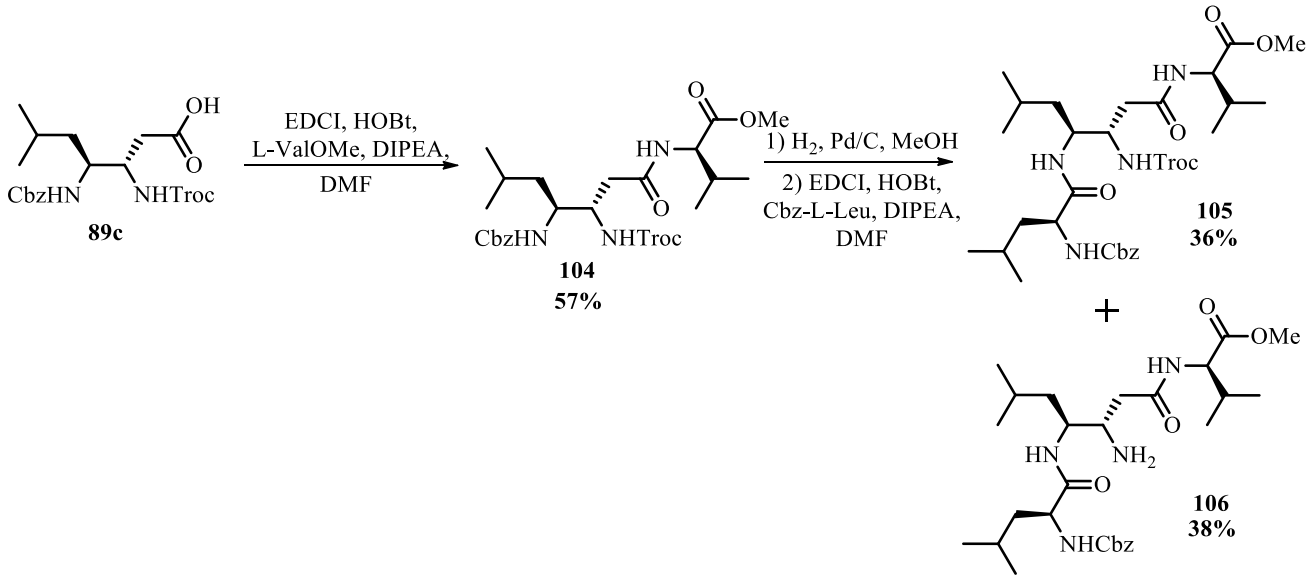
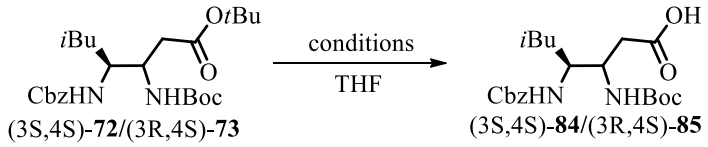


Schéma 33 : Synthèse peptidique en solution

Après avoir examiné plusieurs groupements protecteurs, notre choix s'est porté sur le *tert*-butoxycarbonyl (Boc) qui est souvent utilisé dans le couplage peptidique sur support solide ainsi que dans la synthèse peptidique en solution. La présence de l'ester *tert*-butylique (*t*Bu) et du Boc nous empêche d'utiliser les acides forts (tel que l'acide trifluoroacétique) pour cliver l'un des deux sélectivement. Par contre, nous pouvons déprotéger l'ester *tert*-butylique par une simple saponification sans toucher le Boc, qui est stable dans des conditions basiques.

Dans un premier temps, la protection du groupement amine a été réalisée sur le mélange des deux diastéréomères avec un rendement de 78%. Malheureusement, après avoir essayé différentes conditions de saponification le produit déprotégé n'a pas été obtenu, seules des conditions basiques drastiques conduisent à la formation de traces du produit désiré (Tableau 2) :



	Solvant	Température	Temps, h	Rendement
10% NaOH	THF	t.a.	12	-
10% NaOH	THF	reflux	12	-
1M NaOH	THF	reflux	12	-
5M NaOH	THF	reflux	48	trace

Tableau 2 : Essais de saponification de l'ester *t*Bu

Malgré ces résultats infructueux nous avons décidé de ne pas changer le groupement protecteur mais d'essayer de cliver l'ester *t*Bu et de réaliser ensuite la protection du groupement amine (Schéma 34).

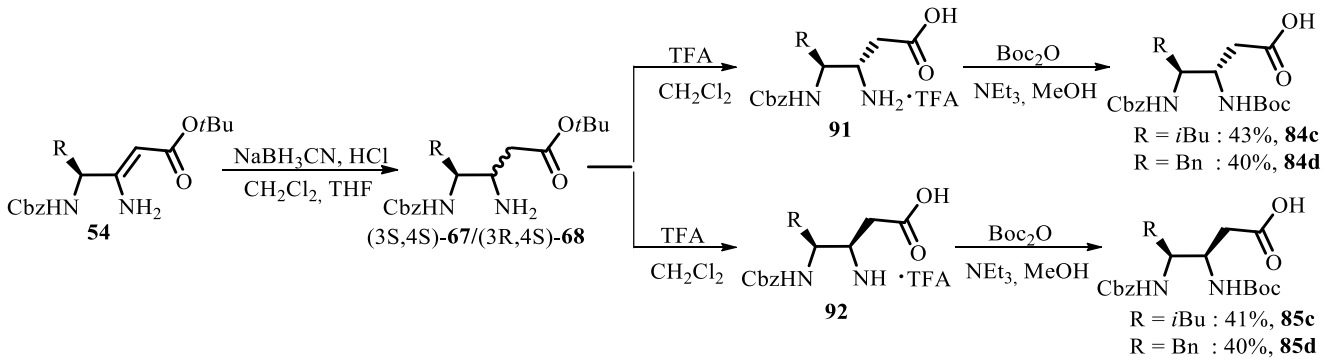


Schéma 34 : Synthèse des deux diastéréomères acides β,γ-diaminés protégés issus de la L-leucine et de la L-phénylalanine

Cette stratégie a été appliquée avec succès aux deux séries d'acides aminés. Dans le cas de la série leucine les produits désirés ont été isolés avec de bons rendements de 43% et 41% pour les deux diastéréomères (*S,S*) et (*R,S*) respectivement. En série phénylalanine, les diastéréomères sont obtenus avec un bon rendement de 40% dans deux cas.

Cette nouvelle voie de synthèse nous permet donc de synthétiser des acides β,γ-diaminés diastéréomériquement purs en 6 étapes au lieu de 11 comme c'était le cas dans l'ancienne stratégie de synthèse. Un rendement global de 44% et 46% (total des deux diastéréomères) a été obtenu en série phénylalanine et en série leucine respectivement. Nous avons évité l'utilisation de réactifs dangereux tels que l'iodure de benzyle. Toutes les étapes de synthèse sont reproductibles et les produits obtenus sont stables. Les rendements de chaque réaction sont soit bons soit quantitatifs.

L'inconvénient majeur de cette stratégie est la séparation des deux diastéréomères juste après la réduction. En effet, la présence d'une amine libre en position β complique la séparation sur colonne de gel de silice. De plus, la purification des acides β,γ-diaminés à la fin de la synthèse est difficile à cause du groupement acide libre.

5.2 Réaction avec le bromoacétate de méthyle

Afin de faciliter la séparation des deux diastéréomères, nous avons décidé d'effectuer la réaction de Blaise avec le bromoacétate de méthyle au lieu du bromoacétate de *tert*-butyle, ce qui permet d'introduire le motif acide sous forme d'ester méthylique. Dans ce cas, nous obtenons l'acide β,γ-diaminé orthogonalement protégé par des groupements avec un méthyle, Cbz et Boc et effectuons la séparation à la fin de la synthèse.

Le nitrile monoprotégé **51c** a été engagé dans la réaction de Blaise avec le bromoacétate de méthyle en appliquant les mêmes conditions que pour la réaction avec le bromoacétate de *tert*-butyle. L'énamine désirée a été isolée avec un rendement de 35%. La réduction par $NaBH_3CN$ donne deux diastéréomères avec un rendement quantitatif (Schéma 35). Malgré le rendement un peu plus faible de cette séquence par rapport à la réaction avec le bromoacétate de *tert*-butyle, nous avons décidé de continuer dans cette voie car à la fin de la synthèse nous obtenons deux diastéréomères orthogonalement protégés et beaucoup plus faciles à séparer par une colonne de gel de silice.

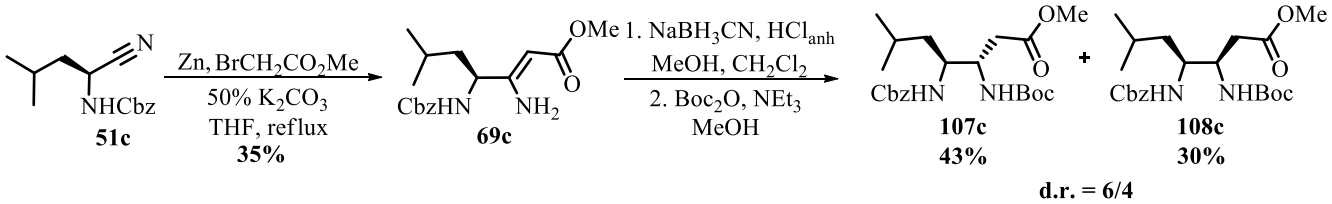


Schéma 35 : Synthèse des deux diastéréomères 107c et 108c orthogonalement protégés issus de la L-leucine

Le rendement plus faible s'explique par la formation de l'urée cyclique au cours de la réaction. Nous avons constaté que la quantité d'urée (et d'autres produits secondaires) dépendent de la durée et de la température de la réaction. Plus la durée et la température sont grandes, plus les sous-produits sont nombreux. Pour éviter les réactions indésirables, nous avons décidé de changer le mode d'activation de la poudre de Zn.

Lee et al[33] rapportent une augmentation du rendement en énamine **110**[34] en utilisant les ultrasons pour activer le Zn[35] (Schéma 36). Il est également montré que la présence de ZnO ou de TiO_2 améliore l'efficacité des ultrasons dans la réaction de Blaise[36].

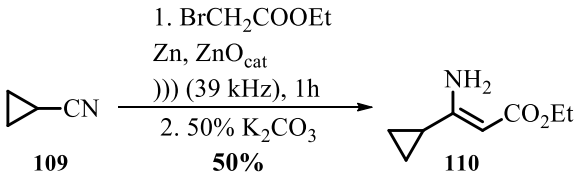


Schéma 36 : Réaction de Blaise effectuée sous ultrasons en présence de ZnO comme catalyseur

Les mêmes conditions ont été reproduites avec le nitrile **51c** en série leucine. Il a été placé dans un bain à ultrason à 50°C en présence du Zn et de ZnO comme catalyseur. Après une heure de réaction et le traitement classique par K_2CO_3, nous n'avons obtenu ni le produit désiré ni l'urée cyclique correspondante.

Ensuite la réaction de Blaise a été effectuée en utilisant les mêmes conditions mais sans ajouter de ZnO. A l'issue de la réaction nous avons isolé l'énamine **69c** désirée avec un meilleur rendement de 66% (Schéma 37). Après réduction avec $NaBH_3CN$ et protection par un groupement Boc les deux diastéréomères ont été séparés par chromatographie sur une colonne de gel de silice. Les acides β,γ-diaminés en série leucine '*syn*' **107c** et '*anti*' **108c** orthogonalement protégés ont été isolés avec un rendement de respectivement 43% et 30% et un rapport diastéréomérique de 6/4.

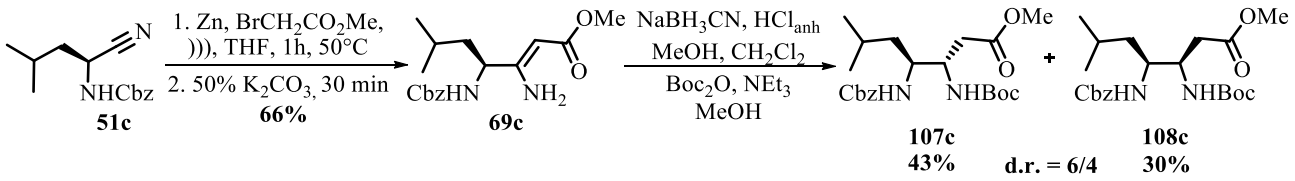


Schéma 37 : Synthèse des deux diastéréomères 107c et 108c orthogonalement protégés issus de la L-leucine

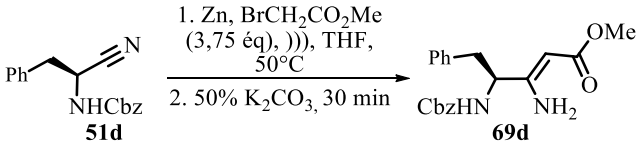
Les mêmes conditions ont été appliquées en série phénylalanine, mais un rendement de seulement 42% a été obtenu au bout d'une heure. Pour améliorer celui-ci, nous avons réalisé la réaction dans des conditions différentes.

---

[33] Wu, X.; Rieke, R. D. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6658.
[34] Lee, A. S.; Cheng, R. Y.; Pan, O. G. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 443.
[35] Ley, S. V.; Low, C. M. R. Ultrasound in Synthesis; Springer: New York, NY, 1989.
[36] Standtmuller, H.; Greve, B.; Lennick, K.; Chair, A.; Knochel, P.; *Synthesis*, **1995**, *1*, 69.

D'abord, nous avons essayé de traiter la réaction par une solution de K_2CO_3 saturée au lieu de la solution aqueuse de K_2CO_3 à 50% pour éviter l'hydrolyse possible de l'énamine en β-cétoester, mais aucun effet n'a été observé.

Puis, différents temps de réaction ont été testés et un rendement de 52% a été obtenu au bout de 10 minutes (Tableau 3). Malheureusement, la conversion n'est pas totale, mais la quantité de sous-produits est négligeable, donc le nitrile **51d** qui n'a pas réagi peut être facilement purifié et réengagé dans la réaction de Blaise.

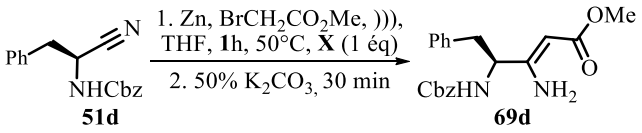


Temps, min	Rendement
1	Traces
10	52%
20	42%
60	42%

Tableau 3 : Influence du temps sur la réaction de Blaise

La baisse de rendement de la réaction au bout d'une heure peut être expliquée par la dégradation partielle du produit sous ultrasons.

Après avoir étudié l'influence du temps sur la réaction, nous avons pensé que le faible rendement pouvait être dû à la participation du proton du carbamate qui est légèrement acide. Cette hypothèse pourrait expliquer la formation de sous-produits difficilement analysables. Pour vérifier, nous avons décidé d'engager dans la réaction différents donneurs de protons non-nucléophiles, qui peuvent le partager beaucoup plus facilement que le nitrile de départ (Tableau 4).

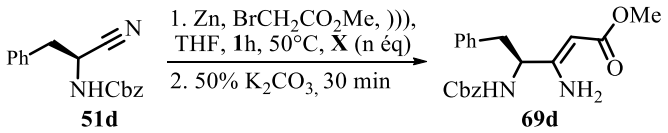


X	Rendement
***t*BuOH**	traces
2,4,6-Triméthylphénol	traces

Tableau 4 : lnfluence d'additif sur la réaction de Blaise

La réaction a été maintenue 1h au lieu de 10 minutes car la vitesse de la réaction baisse en présence des additifs, mais le mélange réactionnel contient moins de sous-produits. D'après les résultats obtenus, nous pouvons constater que la réaction avec les donneurs de protons portant un groupement –OH (*t*BuOH et 2,4,6-triméthylphénol) ne favorisent pas la formation de l'énamine.

Ensuite, nous nous sommes intéressés à l'influence d'autres ligands sur la réactivité du Zn. Plusieurs ligands monodentate et bidentate avec des natures différentes d'hétéroatomes donneurs ont été testés (Tableau 5) :



X	Équivalent	Rendement
Anisole	1	58%
Anisole	10	48%
Anisole	solvant	traces
Diphényloxide	1	conversion ≈50%
DME	1	traces
DME	solvant	traces
Pyridine	1	conversion ≈50%
TMEDA	1	traces

Tableau 5 : lnfluence d'additifs sur la réaction de Blaise

Comme nous pouvons le remarquer, les ligands bidentates (TMEDA et DME) inhibent complètement l'activité du Zn en occupant toutes les orbitales vacantes du métal et en empêchant l'insertion du Zn dans la liaison C-Br au cours de la réaction de Blaise. Le produit se forme dans le cas de la pyridine, mais au bout d'une heure la conversion n'est toujours pas complète. Le meilleur résultat (rendement de 58%) a été obtenu avec 1 équivalent d'anisole. En revanche, dans le cas du diphényloxide nous constatons une baisse de rendement, probablement à cause de l'encombrement important du ligand.

La réduction, suivie par la protection par Boc conduit à un mélange des deux diastéréomères **107d** et **108d** avec le rapport diastéréomèrique de 77 : 23 et un rendement de 50% et 15% pour le 'anti' et 'syn' respectivement (Schéma 38) :

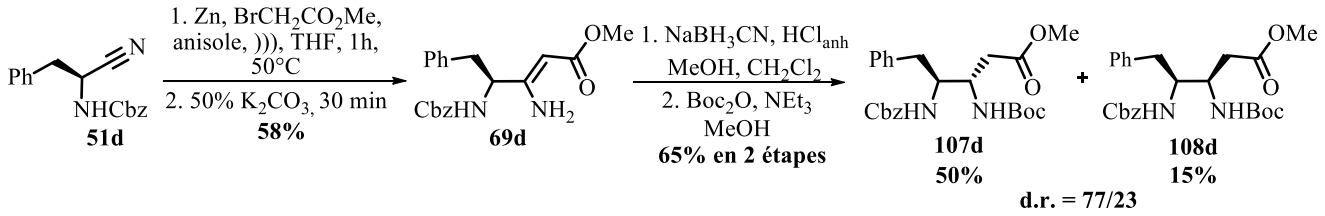


Schéma 38 : Synthèse des deux diastéréomères 107d et 108d orthogonalement protégés issus de la L-phénylalanine

Cette nouvelle méthode d'activation du Zn a plusieurs avantages par rapport à la procédure précédente : elle nécessite des températures moins élevées, donne un meilleur rendement dans les deux séries, génère moins de sous-produits et est plus facile à mettre en oeuvre. Cependant les travaux effectués ne sont pas exhaustifs et nécessiteraient plusieurs études (catalyseurs, ligands, etc.) afin de trouver les meilleures conditions pour former l'énamine désirée.

6. Etudes de la configuration des acides β,γ-diaminés synthétisés

Les tentatives de cristallisation des acides β,γ-diaminés finaux n'ont pas donné de résultat fructueux. En revanche, nous avons pu cristalliser des intermédiaires de synthèse en série leucine, comme en série phénylalanine, ce qui permet d'attribuer la configuration relative des produits finaux.

Grâce à la structure RX du diastéréomère majoritaire **67c** issu de la réduction avec $NaBH_3CN$, nous avons pu attribuer la configuration absolue des deux centres stéréogènes. Ce composé (3S,4S) cristallise dans un système orthorhombique et adopte un groupe d'espace P $2_12_12_1$ (Figure X) :

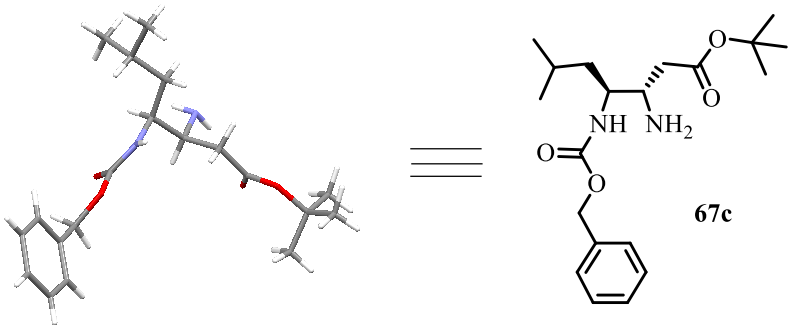


Figure 10 : Structure RX du composé 67c

En série phénylalanine, la configuration relative a été déterminée grâce à la structure RX du produit **91d** issu de la déprotection du groupement *t*Bu. La configuration absolue des deux centres stéréogènes est 3S,4S. Le produit cristallise dans un système monoclinique dans un groupe d'espace P 2_1 (Figure 11) :

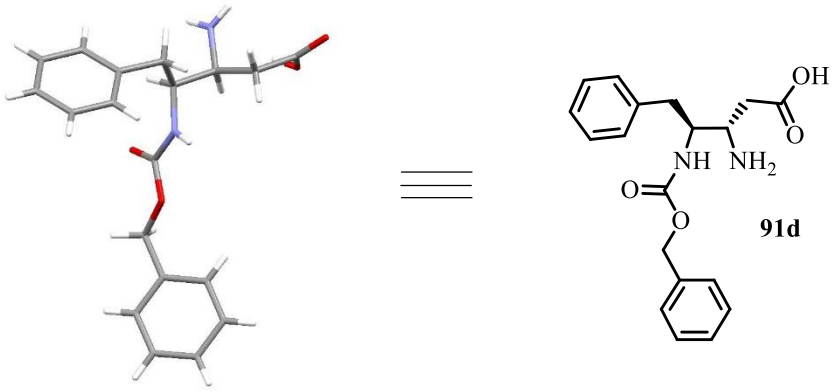


Figure 11 : Structure RX du composé 91d

7. Conclusion

En conclusion, nous avons amélioré la synthèse des acides β,γ-diaminés en partant de la leucine et la phénylalanine naturelles. En engageant le nitrile monoprotégé dans la réaction de Blaise avec du bromoacétate du méthyle dans un bain aux ultrasons nous obtenons l'énamine avec un bon rendement de 66% dans le cas de la série leucine et 58% dans le cas de la série phénylalanine. La réduction avec $NaBH_3CN$ et la protection par un groupement Boc du mélange obtenu conduit à deux diastéréomères facilement séparables par chromatographie sur gel de silice. Les produits désirés ont été obtenus en 6 étapes au lieu de 11 et avec un bon rendement global de 48% en série leucine et 38% en série phénylalanine. La nouvelle stratégie de synthèse nous permet d'obtenir la (3S,4S)-déoxyaminostatine orthogonalement protégée. Cet acide β,γ-diaminé sera engagé dans la synthèse peptidique afin d'obtenir des peptides hybrides contenants un ou plusieurs acides β,γ-diaminés. L'étude de la structuration des oligomères obtenus sera effectuée et décrite dans les chapitres suivants.

Partie II : Rappels bibliographiques sur les foldamères

1. Généralités sur la structuration des peptides

1.1 Introduction

Les protéines sont des macromolécules composées d'une série d'acides aminés et capables d'adopter une conformation particulière selon leur composition. En 1951 Pauling et Corey [37] ont prédit la première conformation structurée en hélice à partir de considérations théoriques. Ensuite, en 1957, Kendrewl [38] a publié la première organisation structurale des protéines dans une représentation tridimensionnelle de la myoglobine cristallisée.

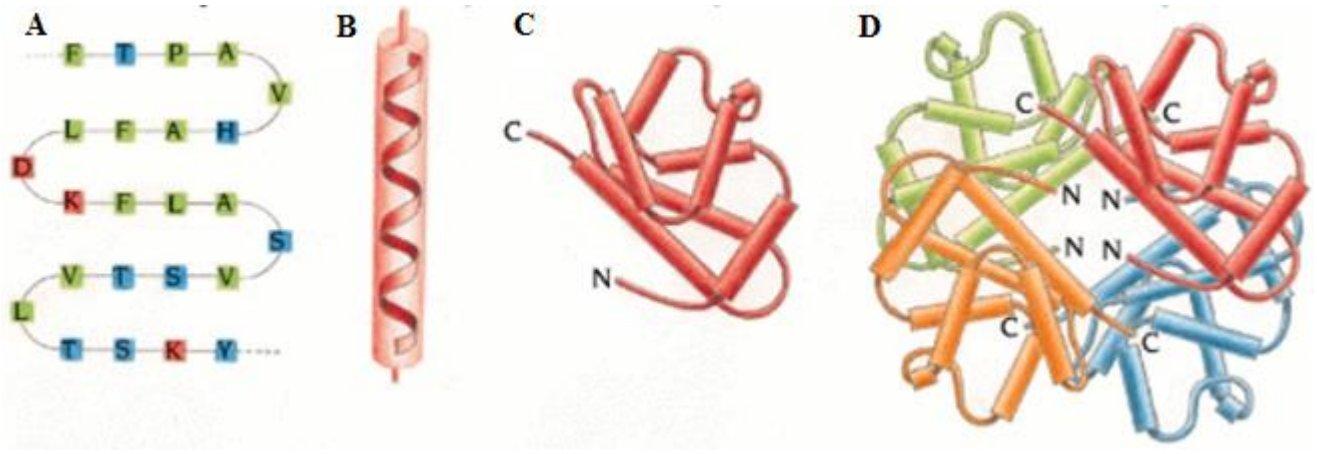
Les enchaînements d'acides aminés ont la propriété de se replier et de s'assembler dans des structures tridimensionnelles très complexes. Il existe 4 niveaux de structuration des protéines (Figure 12):

- ***la structure primaire (A)*** : c'est une séquence linéaire d'un peptide où les acides aminés sont connectés par les liaisons amides.

- ***la structure secondaire (B)***, où la chaîne peptidique adopte une conformation stabilisée par des liaisons hydrogènes (coudes, feuillets et hélices).

- ***la structure tertiaire (C)*** : c'est une association dans une structure tridimensionnelle de plusieurs structures secondaires.

- ***la structure quaternaire (D)*** : c'est une association des plusieurs structures tertiaires dont la cohésion est parfois assurée par une molécule non-peptidique ou un ion (hémoglobine).



[37] Pauling, L.; Corey, R.B.; Branson, H.R. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1951**, *37*, 205.
[38] Kendrew, J.C. ; Bodo, G. ; Dintzis, H.M. ; Parrish, R.G. ; Wyckoff, H. ; Phillips, D.C. *Nature* **1958**, *161*, 662.

Figure 12 : A) structure primaire, B) structure secondaire, C) structure tertiaire et D) structure quaternaire

Chaque acide α-aminé incorporé dans une chaîne peptidique possède trois angles dièdres Φ, Ψ et ω, représentés sur la Figure 13 :

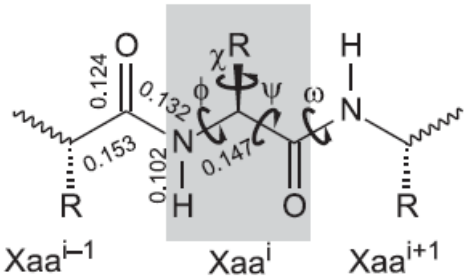


Figure 13 : représentation des angles dièdres Φ, Ψ et ω et des longueurs de liaison dans une chaîne peptidique Φ [CO-NH-Cα-CO], Ψ [NH-Cα-CO-NH] et ω [Cα-CO-NH-C]. Xaa = acide aminé.

Il faut remarquer que la rotation autour de la liaison amide est restreinte à cause de la stabilisation par résonance. Cependant, il existe deux rotamères autour de cette liaison : en configuration *cis* (ω=0°) et en configuration *trans* (ω=180°), qui est présente dans les plupart des peptides car elle est énergétiquement beaucoup plus favorable (8 kJ.mol^{-1}).

D'un autre côté, les angles Φ et Ψ ne peuvent pas adopter n'importe quelles valeurs parce que certaines d'entre elles conduisent à des conformations énergétiquement très défavorables à cause des interactions entre les atomes. Le physicien et biologiste indien Ramachandran[39] a effectué une étude systématique des combinaisons admissibles d'angles Φ et Ψ et les a rassemblés dans un diagramme montrant différents types de structures en fonction des combinaisons Φ et Ψ (Figure 14)

[39] Ramachandran, G.N.; Sasisekharan, V. Conformation of Polypeptides and Proteins. *Adv. Prot Chem*. **1968**, *23*, 283.

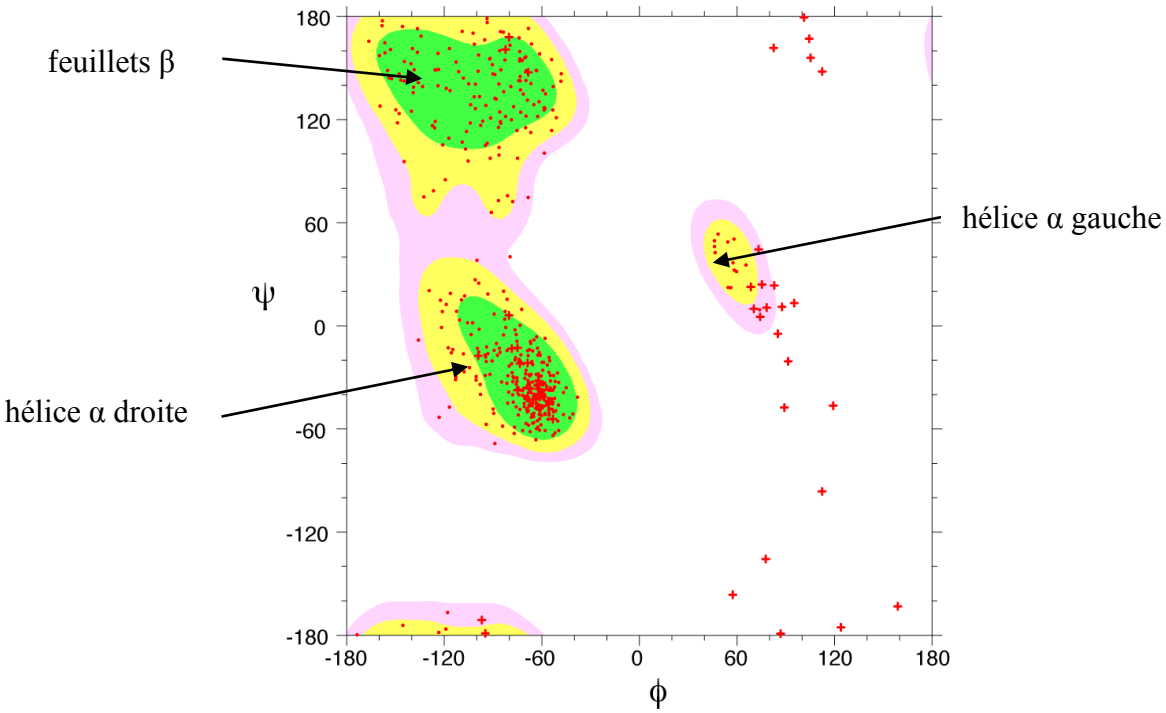


Figure 14 : Diagramme de Ramachandran

1.2 Structures secondaires

1.2.1 Coudes (turns)

1.2.1.1 Coudes β

Les coudes β sont des structures secondaires non périodiques qui relient deux brins de peptide en inversant la direction de la chaîne (Figure 15).

Figure 15 : Angles dièdres caractéristiques des β-turns (à gauche) et représentation des β-turns I et II (à droite)

4 acides aminés participent dans la formation de ce coude stabilisé par une liaison hydrogène entre le carbonyle du résidu *i* et le groupement amide du résidu *i*+3. Les principaux coudes β possèdent les angles Φ et Ψ présentés dans le Tableau 6 :

	Résidu *i+1*		Résidu *i+2*	
Types de coudes	**Φ (°)**	**Ψ (°)**	**Φ (°)**	**Ψ (°)**
I	-60	-30	-90	0
II	-60	120	80	0
III	-60	-30	-60	-30
I'	60	30	90	0
II'	60	-120	-80	0
III'	60	30	60	30

Tableau 6 : Valeurs des angles dièdres des principaux coudes β

1.2.1.2 Coudes γ

Il existe aussi un autre type de coude qui s'appelle un coude γ. Cette structure secondaire est caractérisée par une liaison hydrogène entre le carbonyle du résidu *i* et le groupement amide du résidu *i*+2. Selon l'orientation des deux angles dièdres Φ et Ψ, deux types de coudes γ sont distingués : classique et inversé (Tableau 7).

	Résidu *i+1*	
Types de coudes	**Φ (°)**	**Ψ (°)**
classique	75	-64
inversé	-79	69

Tableau 7 : Valeurs des angles dièdres des coudes γ

1.2.2 Feuillets β

Les feuillets β sont des structures secondaires où deux chaînes peptidiques distinctes adoptent une forme étendue, stabilisée par des liaisons hydrogènes interbrins.

Il existe deux types de feuillets β selon l'agencement des deux brins : parallèle (où les deux brins possèdent la même orientation) et antiparallèle (avec l'orientation opposée) (Figure 16).

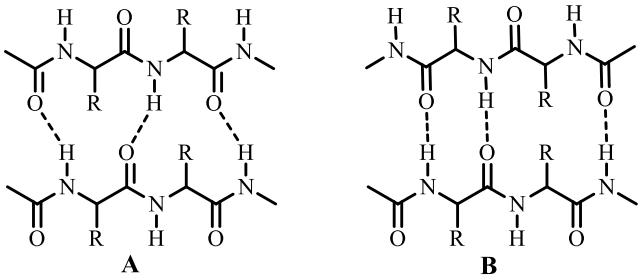


Figure 16 : Feuillet β A) parallèle et B) antiparallèle

Types de feuillet	Φ (°)	Ψ (°)
parallèle	-139	135
antiparallèle	-119	113

Tableau 8 : Valeurs des angles dièdres de feuillet parallèle et antiparallèle

1.2.3 Hélices

Les hélices sont les structures secondaires les plus souvent rencontrées dans les protéines. Elles sont construites à partir d'un enchainement d'acides aminés dont les valeurs des angles dièdres Φ et Ψ sont répétées périodiquement. La stabilité de l'hélice est expliquée par : la stabilisation de la structure avec des liaisons hydrogènes orientées parallèlement à l'axe de l'hélice et l'orientation des radicaux à l'extérieur de l'hélice ce qui minimise les gênes stériques.

Une hélice est caractérisée par le nombre de résidus par tour d'hélice « n », la valeur du pas de l'hélice « p » et le nombre d'atomes composant le squelette principal incorporé dans la boucle formée par la liaison hydrogène. De plus les hélices possèdent une chiralité, indiquée par la lettre « *P* » (plus, hélice droite) lorsque la direction de propagation de l'hélice se fait dans le sens horaire et « *M* » (minus, hélice gauche) pour le sens antihoraire.

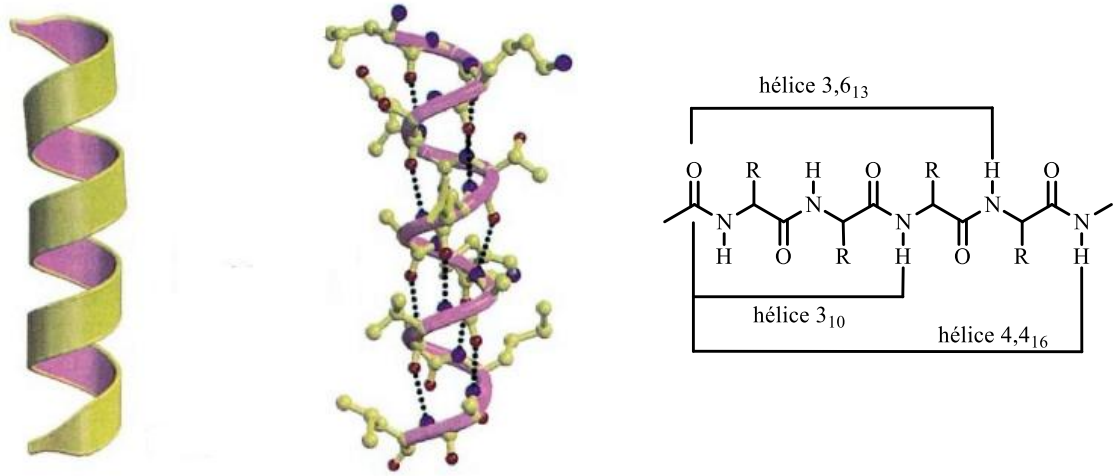


Figure 17 : représentation de l'hélice α en spirale (à gauche), dans un fragment peptidique (au centre) et représentations schématiques des liaisons H pour différents types d'hélices (à droite)

Parmi les différents types d'hélice existant dans les structures des protéines, la plus commune est l'hélice α. Elle est caractérisée par 3,6 résidus par tour, un pas de 0,54 nm, un angle Φ de 57° et Ψ de 47°. Elle est stabilisée par des liaisons hydrogènes entre le carbonyle du résidu *i* et le proton amide du

résidu i+4 formant une boucle à 13 atomes. La nomenclature complète d'une hélice α constituée de L-acides aminés est donc (P)-3,6_{13} (Figure 17).

On rencontre également au sein des protéines de courts segments d'hélice 3_{10} (hélice-P-3_{10}, Φ = -60°, Ψ = -30°) et plus rarement des hélices π (hélice-P-4,4_{16}, Φ = -57°, Ψ = -70°).

Très souvent (notamment dans les protéines globulaires[40]) on peut rencontrer une hélice polyproline de type II (PPII). C'est une hélice gauche (Figure 18) qui possède 3 résidus par tour, la conformation des liaisons amides est *trans* et la valeur moyenne des angles dièdres est de (Φ, Ψ) = (-75°, +145°)[41]. La longueur des segments de PPII est généralement courte (4 à 8 résidus)[42] et d'autres résidus que la proline sont compatibles avec cette conformation (Gln, Asp).

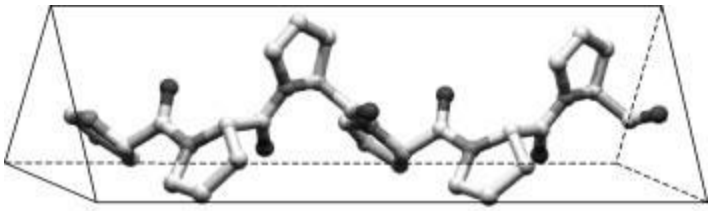


Figure 18 : Structure d'une hélice PPII constituée de proline

La PPII est caractérisée par l'absence de liaisons hydrogènes intramoléculaires. De ce fait, la structure de cette hélice est remarquablement étendue et la majorité des chaînes latérales du squelette sont stériquement accessibles au solvant. Grâce à cette propriété, la PPII peut donc facilement être impliquée dans des interactions protéines-protéines, notamment avec les domaines SH3 qui interagissent avec les segments riches en proline[43].

La structure secondaire des peptides et des protéines joue un rôle extrêmement important dans la recherche des nouveaux oligomères capables de mimer les interactions protéine-protéine. Il existe plusieurs techniques pour effectuer des études structurales des peptides en solution. Les techniques les plus souvent utilisées sont présentées dans le chapitre suivant.

2. Identification des structures secondaires en solution

2.1 Résonance magnétique nucléaire

La RMN est une analyse puissante dans l'étude de structures secondaires de peptides en solution. Cette technique permet de voir la présence de liaisons hydrogènes, ainsi que de déterminer certains angles de torsion grâce aux constantes de couplage et courbes de Karplus[44].

---

[40] Stapley, B. J.; Creamer, T. P. *Protein Sci* **1999**, *8*, 587.
[41] Rath, A.; A.R. Davidson and C.M. Deber, *Biopolymers*, **2005**, *80*, 179.
[42] Adzhubei, A. A.; Sternberg, M. J. *J Mol Biol* **1993**, *229*, 472.
[43] Kay, B. K.; Williamson, M. P.; Sudol, M. *FASEB J* **2000**, *14*, 231.
[44] Karplus, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 2870.

L'attribution des signaux des protons d'une molécule, notamment un peptide, est effectuée grâce aux séquences bidimensionnelles COSY (COrrelated SpectroscopY) et TOCSY (TOtally Correlated SpectroscopY). La séquence COSY permet de corréler les signaux provenant de noyaux couplés scalairement et éloignés de deux ou trois liaisons (^2J, ^3J). Cette technique est utilisée pour attribuer les systèmes de spins intrarésidus. Cependant, l'analyse devient difficile lorsque les mêmes types de résidus sont présents dans la structure du peptide (répétition de séquences identiques). Dans ce cas, l'expérience TOCSY semble le plus utile car elle permet d'attribuer tous les spins au sein d'un même résidu.

Pour étudier la conformation de peptides dans l'espace il existe deux expériences puissantes de la RMN 2D : ROESY (Rotating frame Overhauser Effect SpectroscopY) et NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY). L'effet Overhauser est basé sur les couplages dipolaires entre noyaux à travers l'espace. Ces couplages ne sont observables que pour des distances interprotoniques inférieures à environ 5 Å. L'intégration de surface d'une tâche NOE et calibration avec les tâches NOE dont la distance est connue (les protons géminaux, par example), donne une information sur les distances interatomiques de groupements qui ne sont pas toujours liés par une liaison covalente

Une information importante sur la structuration d'un peptide est apportée par les déplacements chimiques des groupements amides ou carbamates qui peuvent être engagés dans des liaisons hydrogènes intra- ou intermoléculaires.

Des NH liés ont des déplacements chimiques plus élevés que les NH non liés. Plusieures méthodes aident à détecter les NH établissant des liaisons H :

- l'influence de la concentration :

Dans un milieu concentré, la formation des liaisons hydrogènes intermoléculaires est plus favorisée que dans une solution diluée. Par conséquent, les déplacements chimiques d'un proton amide ou carbamate, qui est engagé dans l'établissement des liaisons H intramoléculaires, sont peu sensibles à la variation de concentration, tandis que les déplacements chimiques des protons non liés, changent fortement à cause de la formation de liaisons H intermoléculaires dans une solution concentrée.

- l'influence de la température :

Cette analyse est basée sur les effets de la température sur les déplacements chimiques des NH. Les NH liés ne sont pas sensibles aux variations de la température car l'agitation thermique n'est pas suffisante pour briser la liaison hydrogène intramoléculaire, tandis que les liaisons H intermoléculaires sont plus faibles et la rupture est plus facile.

- *l'ajout de DMSO-d_6 :*

Le DMSO est un fort accepteur de liaison hydrogène par le groupement S=O. Cette propriété est très souvent utilisée pour détecter les NH qui sont impliqués dans l'établissement des liaisons H. Le principe de cette analyse consiste à enregistrer le spectre proton dans un solvant peu polaire après ajout progressif de DMSO-d_6 (dans notre cas le spectre est enregistré avec de l'ajout de 0, 20, 40, 60, 100 et 140 µL de DMSO dans 500 µL de $CDCl_3$).

Les déplacements chimiques des protons non impliqués dans une liaison seront fortement déplacés vers les champs forts. En revanche, les déplacements chimiques d'un NH lié sont très peu sensibles à l'ajout de DMSO-d_6 (Figure 19).

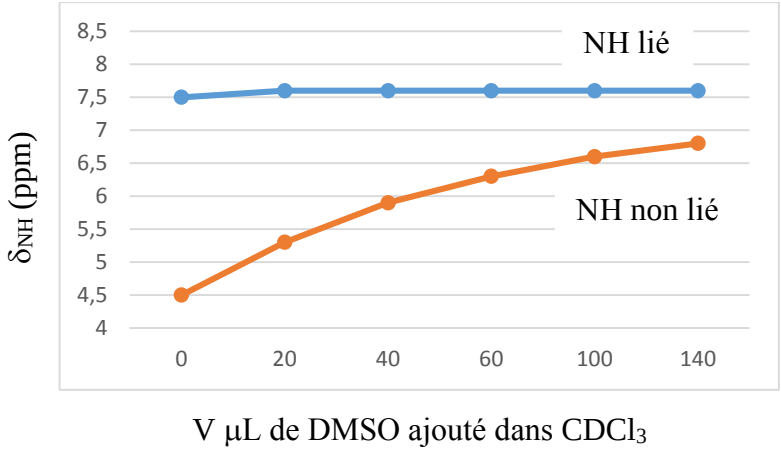


Figure 19 : Influence de l'ajout du DMSO-d_6 sur les déplacements chimiques de NH lié et non lié dans la liaison H

2.2 Spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge est très souvent utilisée en chimie, notamment dans l'analyse des molécules organiques. Le principe est basé sur le fait que les liaisons d'une molécule possèdent des fréquences spécifiques de vibration dues à la modification de la liaison soit en direction, soit en amplitude, soit de son moment dipolaire électrique. Ces types de vibrations absorbent dans le domaine des ondes infrarouges (entre 4000 et 400 cm^{-1}).

Les vibrations du groupement amide (mouvement d'élongation et de déformation de N-H et C=O) sont utiles dans la mise en évidence de la présence de liaisons hydrogènes dans l'analyse des peptides. Les deux bandes d'élongation du lien amide[45] sont utilisées : ν (N-H) qui absorbe entre 3500-3200 cm^{-1} et ν (C=O) entre 1800-1600 cm^{-1}.

[45] Krimm, S.; Bondekar, J. *Adv. Prot. Chem.*, **1986**, *38*, 181.

La fréquence de vibration est donnée par la loi de Hooke :

$$\nu\ (\mathrm{Hz}) = \frac{1}{2\pi}\sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

où : k est la constante de raideur du vibrateur N-H
μ la masse réduite des deux atomes reliés par cette liaison.

La création d'une liaison hydrogène entre un N-H et un C=O affaiblit la force des liaisons amides et diminue la fréquence d'oscillation, ce qui fait que la bande d'absorption se déplace vers les nombres d'ondes plus faibles (diminue d'environ 3400 cm^{-1} à 3300 cm^{-1}). Grâce à ces mesures spectroscopiques courtes, contrairement à l'analyse RMN, il est possible de voir sur le spectre à la fois les NH liés et non liés par liaisons hydrogènes. En revanche, il est impossible d'identifier les NH qui sont engagés directement dans la liaison H.

2.3 Dichroïsme circulaire

La présence d'une structure secondaire peut être très souvent détectée par une autre spectroscopie, le dichroïsme circulaire. Les molécules organiques en solution sont capables d'absorber la lumière polarisée circulairement à gauche et à droite. Si la molécule est chirale ou se structure dans une solution, une partie de la lumière polarisée (gauche ou droite) sera plus absorbée.

Les protéines absorbent dans la zone ultraviolete par les groupements amides et les chaînes latérales. La transition de plus basse énergie est observée pour la transition n→π* entre 210 et 220 nm et une autre π→π* plus forte en énergie entre 185 et 190 nm. L'allure du spectre observé dépend de la nature de la structure secondaire car chaque structure possède son propre profil (Figure 20[46]).

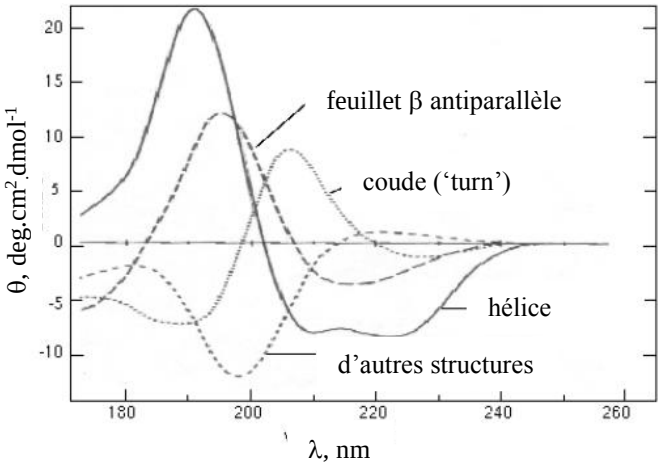


Figure 20 : Spectre de dichroïsme circulaire des différentes structures secondaires

[46] http://www.cryst.bbk.ac.uk/PPS2/course/section8/ss-960531_21.html

Cette technique donne une information sur le type et la proportion de structures secondaires présentes dans la molécule. L'avantage du dichroïsme circulaire, par rapport aux autres techniques, est la rapidité des mesures en faisant varier les conditions d'analyses (solvant, température, pH, salinité…), sans nécessiter une grande quantité de produits.

Cette technique est très souvent utilisée dans les analyses structurales des peptides constitués d'acides α- et β-aminés, cependant les travaux de Seebach[47] et Hannessian[48] ont montré que dans le cas des γ-peptides, le dichroïsme circulaire ne donne pas toujours des résultats cohérents avec les données RMN et RX qui indiquent une forte structuration de l'oligomère étudié.

2.4 Modélisation moléculaire

La modélisation moléculaire est un ensemble de techniques qui permettent de prévoir la structure et la réactivité des molécules ou des systèmes de molécules. Il existe plusieurs méthodes de modélisation moléculaire : les méthodes quantiques et la mécanique moléculaire. Parmi les méthodes quantiques sont rencontrées les méthodes *ab initio*, semi empirique et de DFT (Density Functional Theory) qui est la plus récente et la plus performante. Cependant, les temps de calculs sur les grandes molécules (grands nombres d'atomes) restent très longs ce qui limite son application dans l'étude conformationnelle des peptides. C'est pourquoi nos expériences de modélisation moléculaire *in silico* ont été réalisées avec le logiciel AMBER (Assisted Model Building and Energy Refinement) qui est basé sur des calculs de mécaniques moléculares et est donc le plus adapté pour modéliser les grandes molécules comme les peptides, les polymères nucléotidiques ou les protéines.

2.4.1 Principes généraux et définition d'un champ de force. AMBER

Le principe de ce type de modélisation moléculaire repose donc sur la définition de fonctions d'énergie potentielle associées aux différents degrés de liberté du système moléculaire. Ces fonctions sont ensuite utilisées lors de la dynamique afin de favoriser les structures qui minimisent tous les potentiels d'interaction et correspondent à des structures représentatives de la structure réellement adoptée par la molécule. Le potentiel global dans lequel la molécule est contrainte d'évoluer se décompose de la façon suivante :

- les interactions entre atomes liés (par des liaisons chimiques) comprenant des profils d'énergie potentielle associés :
  - aux longueurs de liaisons et à leur vibration
  - aux angles directs entre trois atomes consécutifs
  - aux angles dièdres formés par 4 atomes consécutifs

[47] Hintermann, T.; Gademann, K.; Jaun, B.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta*. **1998**, *81*, 983.
[48] Hanessian, S.; Luo, X.; Schaum, R.; Michnick, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8569.

- aux impropres, tel que la contrainte de planéité d'un cycle aromatique ou la stéréochimie;

- les interactions entre atomes non liés comprenant notamment :
  - les interactions de Van der Waals
  - les interactions électrostatiques entre les charges partielles portées par deux atomes.

$$E_{Totale} = E_{liaison} + E_{angles} + E_{angles\ dièdre} + E_{impropres} + E_{Van\ der\ Waals} + E_{électrostatique}$$

La plupart des potentiels utilisés modélisent les pénalités énergétiques sous la forme de potentiels harmoniques, visant à défavoriser tout écart par rapport à une position d'équilibre définie comme la plus stable. Il en va ainsi pour les liaisons, les angles ou encore les impropres. Le potentiel associé aux angles dièdres présente, quant à lui, une forme un peu plus complexe en lien direct avec les gènes stériques et électrostatiques et la périodicité du système. Ce potentiel vise à favoriser plusieurs positions diédrales (gauche +/-, anti). Pour ce faire, ce potentiel est codé comme une somme de fonctions périodiques sinusoïdales pouvant ainsi mener à des profils relativement complexes.

Enfin, les interactions à travers l'espace d'atomes non liés sont modélisées différemment. La répulsion électrostatique est modélisée par un potentiel électrostatique classique dérivé de la force de Coulomb ou encore les interactions de Van der Waals qui sont modélisées par un potentiel d'interaction de Lennard-Jones : somme d'un potentiel en $(1/r)^{12}$ correspondant à la répulsion entre deux atomes due à l'exclusion de Pauli et d'un potentiel en $(1/r)^{6}$ représentant la dispersion attractive de London. Tous ces paramètres utilisés lors de la dynamique moléculaire afin d'associer une énergie au système moléculaire et de le faire évoluer au sein du champ de force, sont définis par un certain nombre de paramètres qui sont constants au cours du temps et qui sont contenus dans le fichier de topologie permettant de définir entièrement le système moléculaire et son champ de force associé.

L'intérêt principal du logiciel de modélisation AMBER réside dans le fait qu'il continue, à l'heure actuelle, d'être développé et testé sur de nouveaux systèmes y compris pour des applications biomoléculaires. Il fournit donc un champ de force toujours plus optimisé et intégrant de plus en plus de types atomiques dans une bibliothèque de base utilisable ensuite directement par les utilisateurs. Le but étant à terme, de proposer une librairie de définitions atomiques correctes, capables de modéliser avec une erreur acceptable n'importe quel type d'atome au sein d'un système moléculaire.

2.4.2 Principe du recuit simulé

Le but du principe du recuit simulé consiste à atteindre un état d'énergie minimale correspondant à une structure stable de la molécule. Dans un premier temps, la molécule est chauffée progressivement jusqu'à une température élevée aux alentours de 600K, de sorte que cette dernière acquiert une énergie

cinétique suffisante pour pouvoir franchir les barrières de potentiel du champ de force et ainsi explorer au cours de la dynamique l'ensemble de l'espace conformationelle à sa disposition.

Dans un deuxième temps, la molécule est soumise à un refroidissement progressif visant à l'amener à une température de 0K. Au cours du refroidissement l'évolution de la molécule vers des conformations présentant une énergie potentielle plus élevée est de moins en moins probable, la contraignant ainsi progressivement à tomber dans un puits d'énergie potentielle. Au fil du refroidissement les barrières de potentiel que la molécule a la capacité de surmonter sont toujours plus faibles assurant que lorsque la molécule franchit une barrière de potentiel, menant d'un minimum énergétique A à un autre B plus bas en énergie. Cette dernière n'a pas la possibilité de repeupler l'état A car la barrière énergétique correspondante est plus élevée que celle associée à la transition A -> B. Ce comportement est toutefois uniquement valable dans le cas d'un refroidissement lent car plus le refroidissement est rapide plus le risque de rester bloqué dans un minimum local est élevé.

Lors de cette étape de recuit simulé, des contraintes RMN (issues d'observations expérimentales) sont introduites : les constantes de couplage vicinales (reliées aux angles dièdres) et les corrélations NOE. Ces dernières, issues de l'expérience NOESY(ou ROESY) sont également quantifiées. Pour cela, on utilise généralement deux protons géminaux dont la distance interatomique est de 1,6 Å, ce qui permet de calibrer l'intégration de la tâche de corrélation correspondante. Les autres tâches de corrélation observées sont également intégrées et l'on obtient ainsi des distances interatomiques qui sont introduites dans le logiciel sous forme d'intervalles de distance (pour ne pas trop contraindre la modélisation). Les structures obtenues après le recuit tiennent en principe compte de ces contraintes.

2.4.3 Principe de la dynamique moléculaire

La molécule est mise dans une boîte de solvant (dans notre cas c'est une boite de $CHCl_3$) comprenant au moins 8Å autour de chaque atome avec le logiciel Xleap. Puis le système est soumis à une équilibration en cinq étapes :

- minimisation en deux étapes :
  - minimisation du solvant avec la molécule fixe
  - minimisation du système entier
- équilibration en trois étapes :
  - équilibration du système en augmentant la température de 0 à 300K et en gardant la molécule fixe et le volume constant
  - équilibration du système entier à 300 K
  - équilibration du système en gardant la température et la pression constantes

L'évolution des paramètres de température, volume, densité ainsi que l'évolution de la force est appliquée au système afin de stabiliser la pression autour de 1 bar. Une fois équilibré à 300K sous une

pression de 1 bar le système est soumis à une dernière étape dynamique moléculaire qui consiste à laisser évoluer le système dans le champ de force Amber mais cette fois en l'absence de toute contrainte expérimentale et sans modifier ni la température ni la pression.

En conclusion, plusieurs techniques analytiques sont utilisées pour déterminer la structure secondaire des peptides. La diffraction des rayons X est une analyse très utile pour obtenir la structure secondaire d'un peptide ou une protéine à l'état solide.

La spectroscopie infrarouge en solution est une analyse rapide et facile pour voir la présence de liaisons hydrogènes inter- ou intramoléculaires. Cependant, elle ne donne aucune information sur les atomes qui sont engagés dans la création de liaisons H.

Le dichroïsme circulaire est très souvent utilisé dans l'étude structurale de peptides constitués d'acides α- ou β-aminés. Il a été montré que les résultats d'analyse ne sont pas toujours cohérents avec les données expérimentales dans le cas des peptides comportant des acides γ-aminés.

La spectroscopie RMN couplée à la modélisation moléculaire est une analyse puissante très souvent utilisée dans la détermination de la conformation de peptides. Cette analyse permet d'obtenir des données importantes sur la structure du peptide ainsi que sur les NH engagés dans la liaison hydrogène et la position des atomes dans l'espace. Les données NOE peuvent être utilisées dans la modélisation moléculaire sous contraintes RMN afin de déterminer la structure secondaire du peptide étudié.

Dans notre cas, nous avons généralement utilisé la diffraction RX (dans le cas où le monocristal de peptide était obtenu) et l'analyse RMN couplée à la modélisation moléculaire.

3. Rappels bibliographiques sur les foldamères contenant les acides γ-aminés ou analogues

3.1. Introduction

Les protéines jouent un rôle extrêmement important dans presque tous les processus intervenant dans les cellules. Leur activité dépend fortement de la structure, mais leur grande taille rend difficile et dans plusieurs cas impossible la synthèse des protéines correspondantes dans un laboratoire. La recherche des nouveaux peptides synthétiques plus courts capables d'adopter une conformation stable et définie pour mimer les sites actifs des protéines a donné naissance à un nouveau type de molécules qui s'appellent les foldamères.

Le terme 'foldamère' qui signifie 'tout polymère qui a une forte tendance à adopter une conformation compacte spécifique' («any polymer with strong tendency to adopt a specific compact conformation») a été proposé en 1996 par Samuel H. Gellman[1,2] et coll. dans une publication sur les

études structurales d'une série de peptides constitués d'un acide *trans*-2-aminocyclohexanecarboxylique (*trans*-ACHC) (Figure 21).

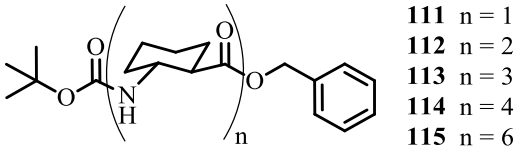


Figure 21 : Structures de peptides constitués d'un acide *trans*-2-aminocyclohexanecarboxylique (*trans*-ACHC)

Gellman a montré que le tétrapeptide **114** et l'hexapeptide **115** synthétisés adoptent une conformation stable en forme d'hélice 14 stabilisée par des liaisons hydrogènes intramoléculaires en solution (méthanol) et à l'état solide.

La même année, l'équipe de Seebach[49] a publié des études sur la structuration du β-hexapeptide **116** constitué d'homologues d'acides α-aminés en série L. Les analyses RMN, de dichroïsme circulaire et les rayons X ont montré que l'hexapeptide adoptait une conformation stable en forme d'hélice 14 (ou hélice 3_{14}) (Figure 19).

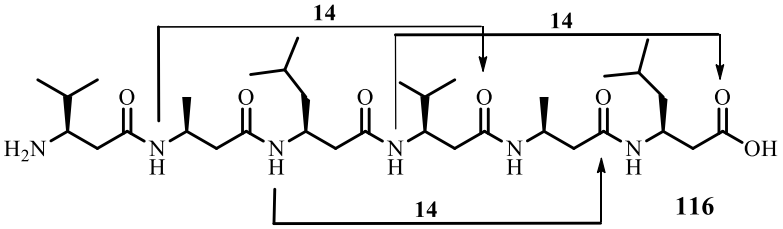
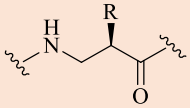
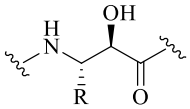
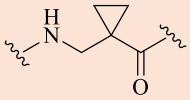
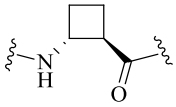
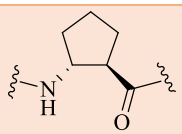
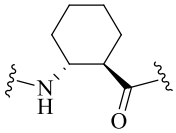
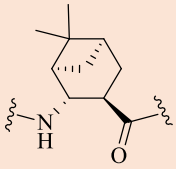
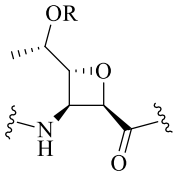


Figure 19 : Représentation d'une hélice 14

Ces travaux ont initié les recherches dans le domaine des foldamères. Depuis bientôt une vingtaine d'années, différents acides β-aminés ont été utilisés comme buildings blocks dans la synthèse de nouveaux peptides capables d'adopter une structure secondaire stable et définie. Quelques exemples des homooligomères constitués uniquement d'acides β-aminés sont présentés dans le Tableau 9.

[49] Seebach, D.; Overhand, M.; Kunhle, F. N. M.; Martinoni, B.; Oberer, L.; Hommel, U.; Widmer, H. *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 913.

Unité	Nature du milieu	Type d'hélice
	CD_3OH	Hélice 14[50,51]
	CD_3OH	Hélice 8[52]
	Etat solide, $CHCl_3$, CD_2Cl_2	Hélice 8[53]
	Pyridine-d_6	Hélice 12[54]
	Etat solide	Hélice 12[55]
	CD_3OD	Hélice 10[56] et 14[37,38]
	CD_3OH, DMSO-d_6	Hélice 12[57]
	$CDCl_3$, C_6D_6	Hélice 10[58]

[50] Hintermann, T.; Seebach, D. *Synlett* **1997**, 437.
[51] Seebach D.; Abele, S.; Gademann, K.; Guichard, G.; Hintermann, T.; Jaun, B.; Matthews, J. L.; Schreiber, J. V.; Oberer, L.; Hommel, U.; Widmer, H. *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 932.
[52] Gademann, K.; Häne, A.; Rueping, M.; Jaun, B.; Seebach, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1534.
[53] Abele, S.; Seiler, P.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 1559.
[54] Fernandes, C.; Faure, S.; Pereira, E.; Théry, V.; Declerck, V.; Guillot, R.; Aitken, D. *J. Org. Lett.* **2010**, *12*, 3606.
[55] Apella, D. H.; Christianson, L. A.; Klein, D. A.; Richards, M. R.; Powell, D.R.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7574.
[56] Hetenyi, A.; Mandity, I. M.; Martinek, T.A.; Toth, G. K.; Fülöp, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 547.
[57] Hetényi, A.; Szakonyi ,Z.; Mándity, I. M.; Szolnoki, É.; Tóth,G. K.; Martinek, T. A.; Fülöp, F. *Chem. Commun.*, **2009**, 177.
[58] Claridge, T. D. W.; Goodman, J. M.; Moreno, A.; Angus, D.; Barker, S. F.; Taillefumier, C.; Watterson, M. P.; Fleet, G. W. J. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 4251.

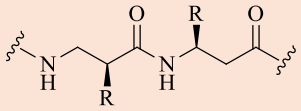
	Pyridine, CD_3OH	Hélice 12/10[59,60]

Tableau 9 : Hélices principales adoptées par des β-peptides

La famille des β-peptides a été déjà bien étudiée et certains β-peptides ont montré des propriétés importantes : résistance à l'action des peptidases[61], activité antibiotique[62,63,64,65,66,67,68], inhibiteurs de l'absorption des graisses et du cholestérol[69], inhibition d'interactions protéine-protéine[70], mime d'une protéine apoptotique[71], capacité à traverser les membranes cellulaires[72], etc.

Les résultats obtenus ont poussé les chercheurs à découvrir de nouvelles structures secondaires avec des analogues d'acides β-aminés comportant un hétéroatome dans la chaîne carbonée à la place d'un groupement méthylène (acides α-aminoxy[73], acides α-hydrazino[74] ou dérivés d'urée[75]) ou des analogues supérieurs des β-peptides comportant un groupement méthylène en plus. Les γ-peptides, une famille de foldamères non-naturels, a commencé à être étudiée plus récemment, mais montre déjà un intérêt structural et une activité biologique intéressante. Dans le chapitre suivant nous allons présenter les γ-peptides et les α/γ-peptides hybrides décrits dans la littérature, ainsi que l'activité biologique de certains d'entre eux.

---

[59] Seebach, D.; Gademann, K.; Schreiber, J. V.; Matthews, J. L.; Hintermann, T.; Jaun, B.; Oberer, L.; Hommel, U.; Widmer, H. *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 2033.
[60] Rueping, M.; Schreiber, J. V.; Lelais, G.; Jaun, B.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 2577.
[61] Frackenpohl, J.; Arvidsson, P. I.; Schreiber, J. V.; Seebach, D. *Chem. Bio. Chem.* **2001**, *2*, 445.
[62] Hamuro, Y.; Schneider, J. P.; DeGrado, W. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 12200.
[63] Liu, D.; DeGrado, W. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7553.
[64] Porter, E. A.; Weisblum, B.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7324.
[65] Schmitt, M. A.; Weissblum, B.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6848.
[66] Arvidsson, P. I.; Ryder, N. S.; Weiss, H. M.; Gross, G.; Kretz, O.; Woessner, R.; Seebach, D. *Chem.Bio.Chem* **2003**, *4*, 1345.
[67] Seebach, D.; Namoto, K.; Mahajan, Y.; Bindschädler, P.; Sustmann, R.; Kirsch, M.; Ryder, N. S.; Weiss, M.; Sauer, M.; Roth, C.; Werner, S.; Beer, H.-D.; Munding, C.; Walde, P.; Voser, M. *Chem. Biodiv.* **2004**, *1*, 65.
[68] Arvidsson, P. I.; Ryder, N. S.; Weiss, H. M.; Hook, D. F.; Escalante, J.; Seebach, D.; *Chem.Biodiv.* **2005**, *2*, 401.
[69] Werder, M.; Hauser, H.; Abele, S.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta.* **1999**, *82*, 1774.
[70] Kritzer, J.; Lear, J. D.; Hodsdon, M. E.; Schepartz, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9468.
[71] Sadowski, J. D. ; Fairlie, W. D. ; Hadley, E. B.; Lee, H-S.; Umezawa, N.; Nikolovska-Coleska, Z.; Wang, S. ; Huang, D. C. S. ; Tomita, Y. ; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 139.
[72] Umezawa, N.; Gelman, M. A.; Haigis, M. C.; Raines, R. T.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 368.
[73] Li, X.; Wu, Y.-D., Yang, D. *Acc. Chem. Res.*, **2008**, *41*, 1428.
[74] a) Gu1nther, R.; Hofmann, H.-J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 247. b) Acherar, S.; Salaün, A.; Le Grel, P.; Le Grel, B.; Jamart-Gregoire, B. *Eur. J. Chem.*, **2013**, *18*, 5603.
[75] Fischer, L.; Didierjean, C.; Jolibois, F.; Semetey, V.; Lozano, J. M.; Briand, J. P.; Marraud, M.; Poteau, R.; Guichard G. *Org Biomol Chem*, **2008**, *6*, 2596.

3.2. Homooligomères contenant des acides γ-aminés

3.2.1. Homooligomères contenant des acides γ-aminés monosubstitués

Comme nous l'avons dit précédemment, les γ-peptides sont les analogues supérieurs des β-peptides et ils possèdent 4 angles dièdres (Figure 23).

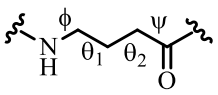


Figure 23 : Angles dièdres présents dans la chaîne d'un γ-peptide

La présence d'un groupement méthylène supplémentaire augmente de façon cruciale la flexibilité de la chaîne, ce qui peut favoriser la création de plusieurs conformations ou défavoriser la structuration. Mais d'après les travaux de Seebach et al. publiés en 1998[46], il a été trouvé que des peptides courts comportant des acides γ-aminés sont capables d'adopter une structure stable en solution.

Dans ce travail, le γ-hexapeptide **117** a été synthétisé et étudié par dichroïsme circulaire et par des analyses RMN dans le méthanol et la pyridine. Le DC n'a révélé aucune structuration, par contre les analyses RMN ont prouvé le contraire. Après avoir effectué un recuit simulé sous les contraintes RMN trouvées, il a été montré que l'hexapeptide **117** se structurait sous forme d'hélice 14 (hélice droite (*P*)-2,6_{14}) stabilisée par des liaisons hydrogènes entre le CO *i* et le NH *i+3* (Figure 25).

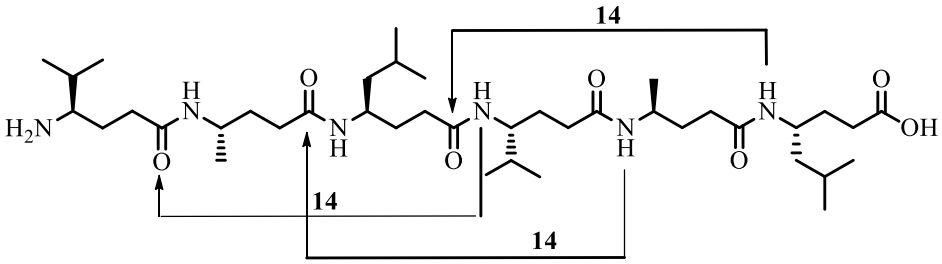


Figure 24 : Représentation de l'hélice 14 du composé 117

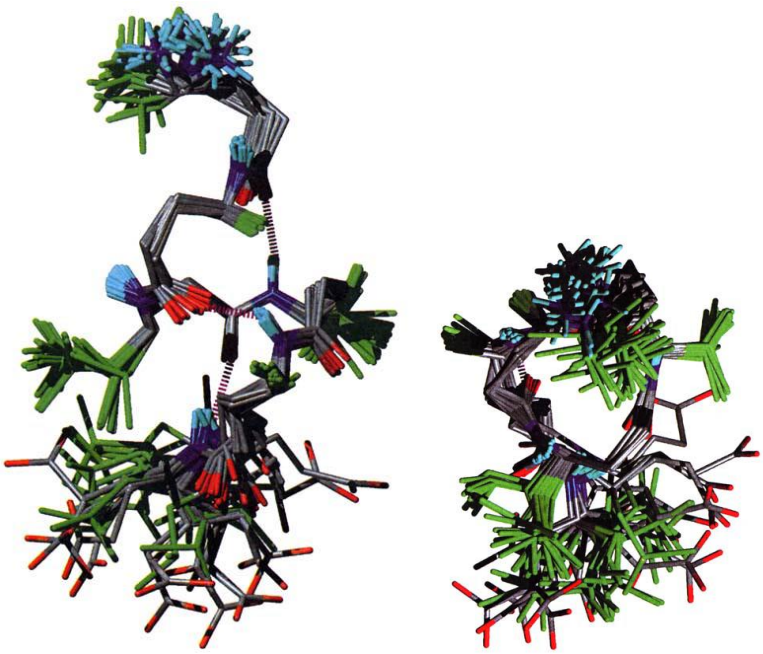


Figure 25 : Superposition des 20 structures de plus basse énergie du γ-hexapeptide 117 (recuit simulé effectué dans le C_5D_5N). Vue de côté (à gauche) et vue de haut (à droite)

Le dipôle de cette hélice est orienté du N_{ter} vers le C_{ter}. Les liaisons C_α-C_β et C_β-C_γ adoptent une conformation (+)-*sc* avec des angles dièdres de +60° pour θ_1 et θ_2 et -140° pour ψ. Contrairement à l'hélice 3_{14} des β-peptides, l'hélice $2,6_{14}$ des γ-peptides possède la même polarité que l'hélice α (Figure 26)[76].

[76] Seebach, D.; Hook, D. F.; Glättli, A. Biopol., **2006**, *84*, 23.

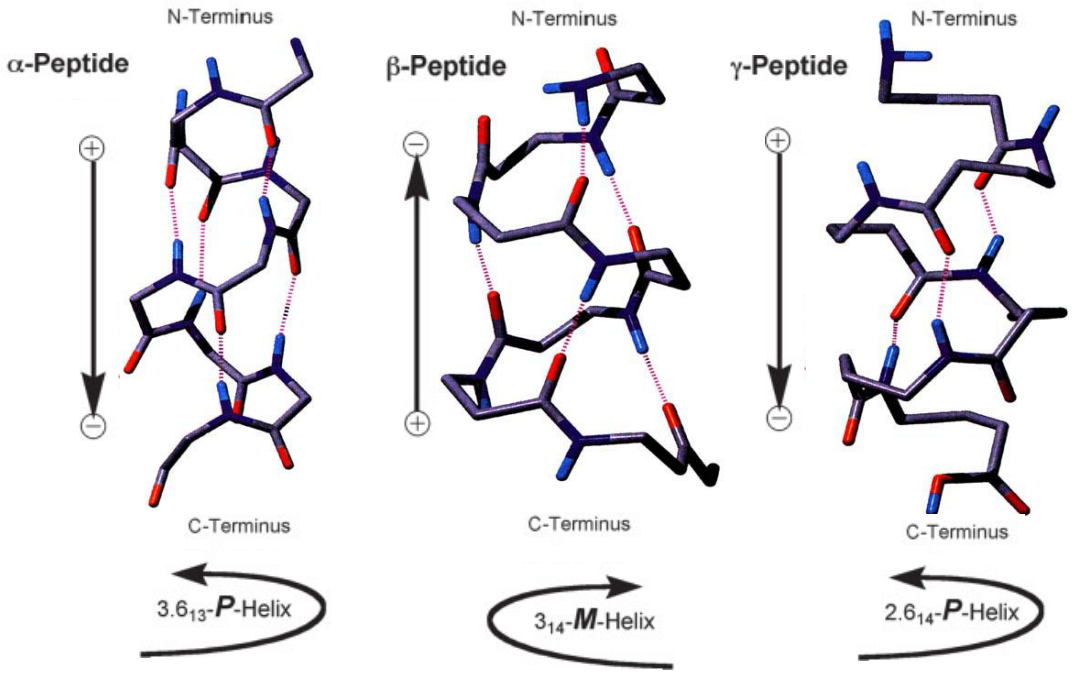


Figure 26 : Modèles d'hélices pour des α- (à gauche), β- (au centre) et γ-peptides (à droite). Les acides α-, β- et γ-aminés possèdent une configuration L. Les chaînes latérales ne sont pas représentées.

La stabilité thermodynamique de l'hélice de ce γ-hexapeptide **117** est plus élevée que celle d'une hélice naturelle car le même hexapeptide constitué uniquement d'acides α-aminés n'est pas capable d'adopter une conformation hélicoïdale.

La même année, le groupe de Hanessian[47] a publié une étude structurale en solution dans la pyridine-d_5 sur une famille de tétra- hexa- et octapeptides qui sont constitués d'une séquence (-γ-Ala-γ-Val-). La même hélice 2,6_{14} a été obtenue à partir de seulement 4 résidus. Il faut remarquer que le dichroïsme circulaire, comme dans le cas des travaux de Seebach, n'a montré aucune structuration.

Les peptides contenant les acides γ-aminés *R* ont été également étudiés[77] récemment (Figure 27).

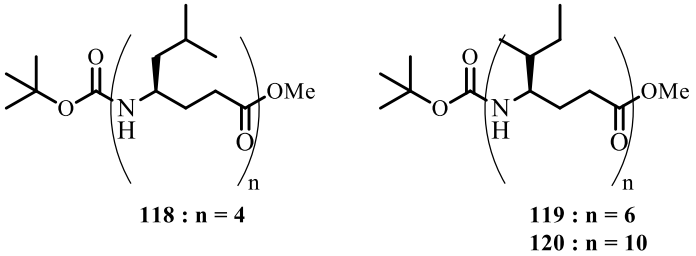


Figure 27 : Structures du tétrapeptide 118 (à gauche), de l'hexapeptide 119 et du décapeptide 120 (à droite)

[77] Basuroy K.; Dinesh B.; Reddy M. B.; Chandrappa S.; Raghothama S.; Shamala N.; Balaram P. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 4866.

Les structures cristallines du γ-tétrapeptide **118**, du γ-hexapeptide **119** et du γ-décapeptide **120** montrent une forte tendance à la formation d'une hélice 14 (*M*) avec une polarité inverse de celle de l'hélice formée par les acides γ-aminés *S* (synthétisés par Hannesian) (Figure 28).

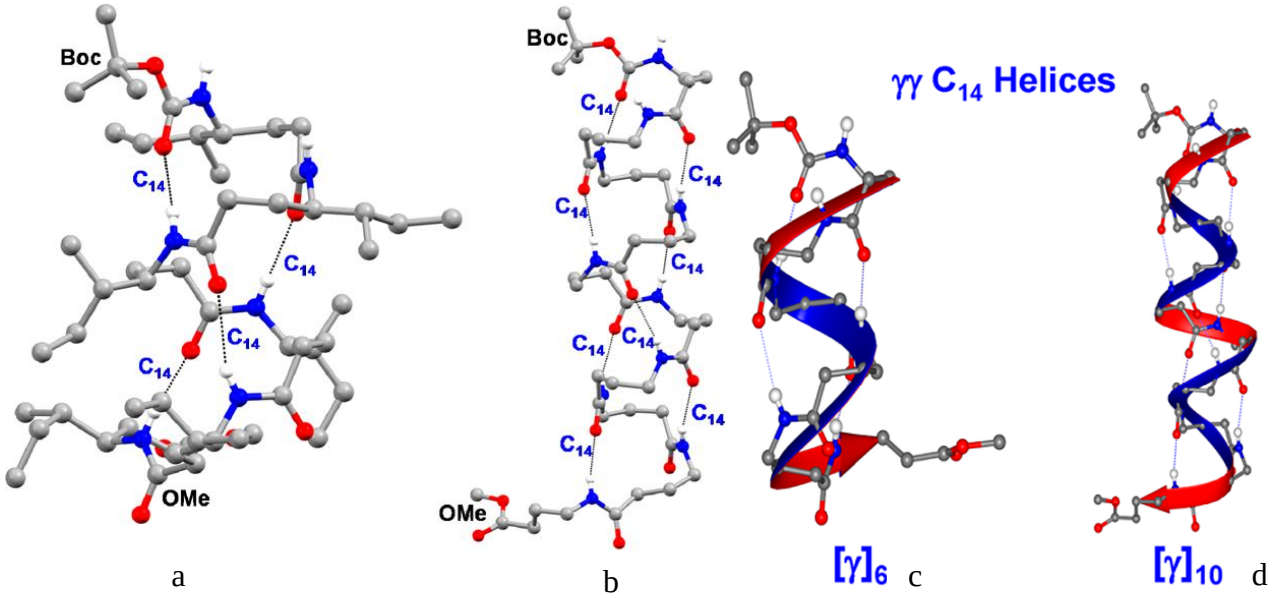


Figure 28 : Structures RX de l'hexapeptide 119 (a), du décapeptide 120 (b) et représentations en hélice de l'hexapeptide 119 (c) et du décapeptide 120 (d)

Les analyses RMN du γ^2-hexapeptide **121** et du γ^3-hexapeptide[78] **122** (Figure 29) dans des solvants différents (pyridine-d_5 et CD_3OD) ont montré un faible éclatement des déplacements chimiques, ce qui signifie une probable absence de structuration.

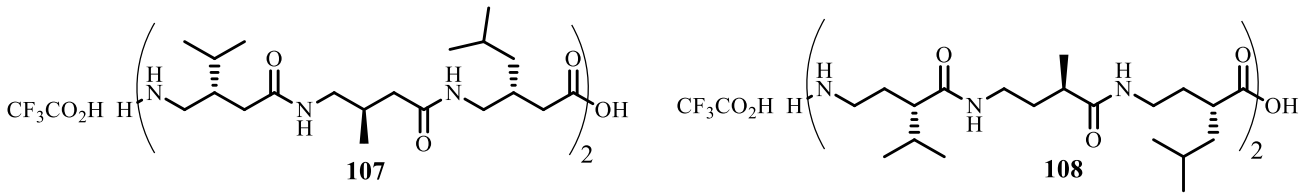


Figure 29 : Structure du γ^2-hexapeptide 121 et du γ^3-hexapeptides 122

En 2006, Kunwar et Sharma[79] ont montré que le tétrapeptide **123** et l'hexapeptide **124** mixtes constitués d'une alternance d'acide GABA et d'acide carbo-γ-aminé **125** (γ-Caa) sont capables d'adopter une hélice gauche C_9 (Figure 30).

[78] Seebach, D.; Brenner, M.; Rueping, M.; Jaun, B. *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 573.
[79] Sharma, G. V. M.; Jayaprakash, P.; Narsimulu, K.; Ravi Sankar, A.; Ravinder Reddy, K.; Radha Krishna, P.; Kunwar, A. C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2944.

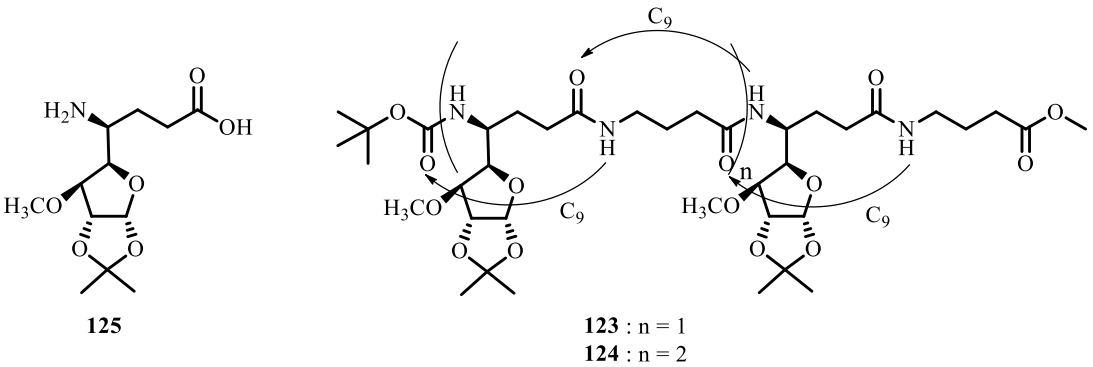


Figure 30 : Structure de l'acide carbo-γ-aminé 125 (γ-Caa) et représentation de l'hélice C_9

3.2.2. Homooligomères contenant des acides γ-aminés disubstitués et cycliques

Les oligopeptides contenant 2 ou 4 résidus de gabapentine (Gpn) (Figure 31) ont été étudiés par l'équipe de Balaram[80]. La présence de substituants géminaux en position β diminue le nombre de conformations possibles autour des liaisons C^{γ}-C^{β} (θ_1) et C^{β}-C^{α} (θ_2) jusqu'à deux conformations *gauche* ($\theta_1 \approx \theta_2 \approx \pm 60°$).

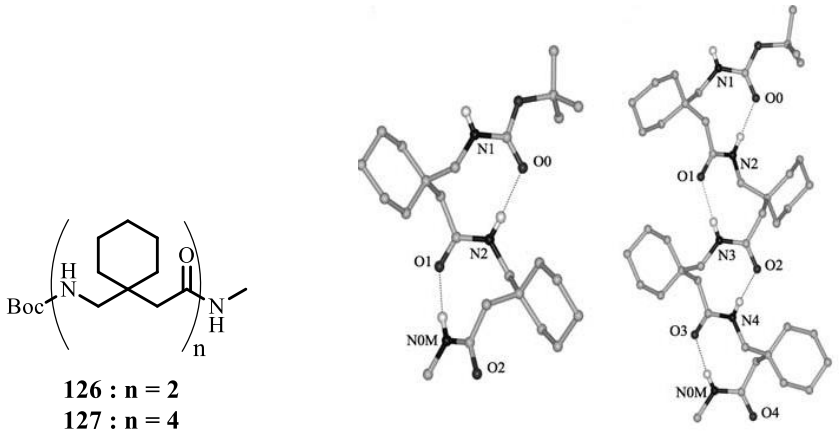


Figure 31 : Oligopeptides contenant le gabapentine (Gpn) (à gauche), structure RX du dipeptide (au centre) et du tétrapeptide (à droite)

La structure cristalline des deux peptides montre la formation de boucles à 9 atomes stabilisées par des liaisons hydrogènes entre le CO du résidu (*i*-1) et le NH du résidu (*i*+1). Cette structure secondaire a été également prouvée par des analyses RMN. La seule différence importante entre les deux structures est l'inversion du signe de l'angle de torsion : dans le cas de dipeptide **126**, les signes des résidus 1 et 2 sont respectivement de ++ et dans le tétrapeptide **127** sont de ++--.

[80] Vasudev, P. V.; Shamala, N.; Ananda, K.; Balaram, P. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2005**, *44*, 4972.

Les boucles à 9 dans les deux peptides peuvent être considérées comme l'analogue du coude γ observé dans les peptides naturels possédant une liaison hydrogène entre les résidus *i*-1 et *i*+1.

La modélisation de peptides plus longs constitués uniquement d'acide Gpn a montré qu'il existe deux types de structures secondaires. Dans le cas où les angles de torsion ont les mêmes signes ++++, le peptide se structure sous forme d'hélice 2.7_9. Si les signes des angles sont différents ++-- (comme dans le cas du tétrapeptide **127**), la formation de ruban est favorisée.

L'équipe de Hanessian[47] a étudié l'influence de la substitution en position α et γ dans les acides γ-aminés. Pour effectuer cette étude, les peptides **128**, **129** et **130**, représentés sur la Figure 32, ont été synthétisés.

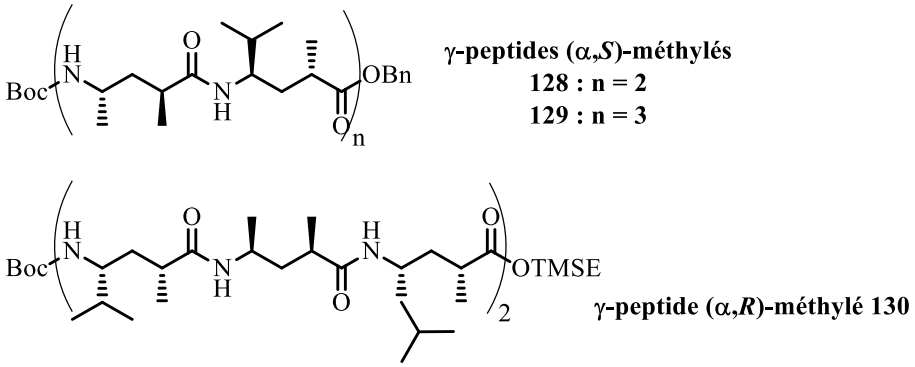


Figure 32 : γ-peptides contenant des acides (α,*S*)- ou (α,*R*)-méthylés

Les analyses RMN (^{1}H, COSY, TOCSY et ROESY) ont été enregistrées dans la pyridine-d_5, qui donne un meilleur éclatement des signaux que dans le $CDCl_3$ et le CD_3OH. Les 20 structures de plus basse énergie superposées, issues de la modélisation moléculaire de **128** et **129**, ont montré la formation d'une hélice gauche $2,6_{14}$. Les analyses de titration par le DMSO-d_6 et de l'influence de la température entre 273 et 323 K ont montré que les déplacements chimiques des NH sont plus faibles que dans les analogues monosubstitués. Cela signifie que la stabilité de l'hélice des peptides disubstitués est probablement plus forte grâce aux interactions hydrophobes entre les substituants en position α et γ.

Il faut remarquer que l'hexapeptide (α,*R*) **130** n'adopte aucune structuration à cause d'interactions non favorables entre les chaînes latérales, les interactions *syn*-pentane[81](Figure 33). Parmi les 9 conformères obtenus par rotation autour de la chaîne C(sp^3) - C(sp^3) de l'acide γ-aminé 2,4-disubstitué, seulement 2 n'ont pas d'interactions déstabilisantes *syn*-pentane.

[81] Hoffman, R. W. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2000**, *39*, 2054.

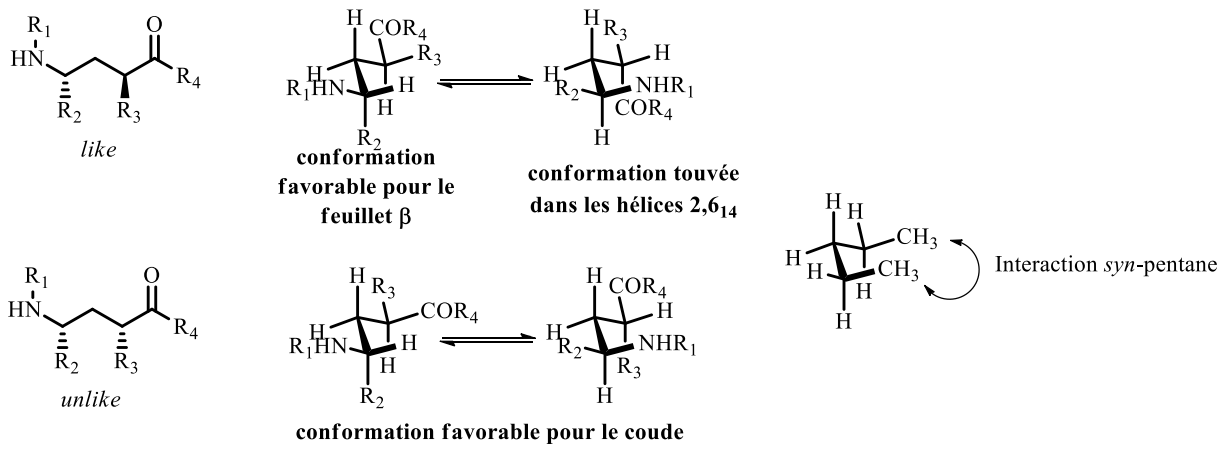


Figure 33 : Interactions entre les substituants en position 2 et 4 dans la chaîne d'acides γ-aminés

Pour explorer plus l'influence de la configuration du substituant en position α[82], les oligopeptides (α,*R*) **131** et (α,*S*) **132** obtenus à partir d'acide γ-cinnamyle (Figure 34) ont été synthétisés.

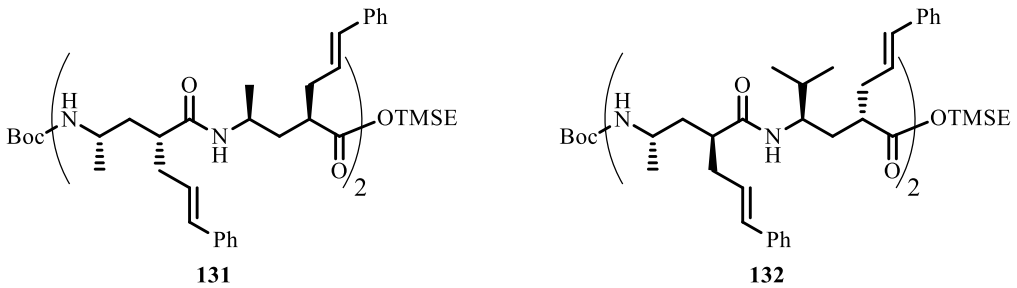


Figure 34 : Peptides 131 et 132 obtenus à partir d'acide γ-cinnamyle

Les mêmes expériences RMN dans la pyridine-d_5 ont été réalisées avec une concentration de 1 mM de tétrapeptide afin de favoriser les liaisons hydrogènes intramoléculaires. Les données RMN observées pour le tétrapeptide **131**, ainsi que l'échange isotopique avec le CD_3OD, montrent la formation de coude β stabilisé par une liaison hydrogène entre le NH du résidu 1 et le CO du résidu 4. Il faut remarquer que la formation d'un coude β naturel est favorisée par des acides aminés contraints comme la proline.

[82] Hanessian, S.; Luo, X.; Schaum, R. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 4925.

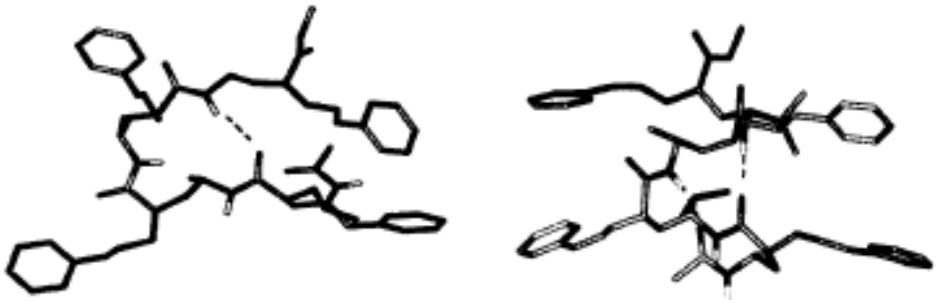


Figure 35 : Structures issues de la modélisation moléculaire sous contraintes RMN du tétrapeptide 131 (à gauche) et 132 (à droite)

Cependant, dans le tétrapeptide **132**, le changement de configuration en position α conduit à la formation d'une hélice 14, présentée précédemment.

Une autre étude, effectuée par l'équipe de Seebach[83], a de son côté montré que la configuration *unlike* favorise la formation du coude en solution et à l'état solide (Figure 36).

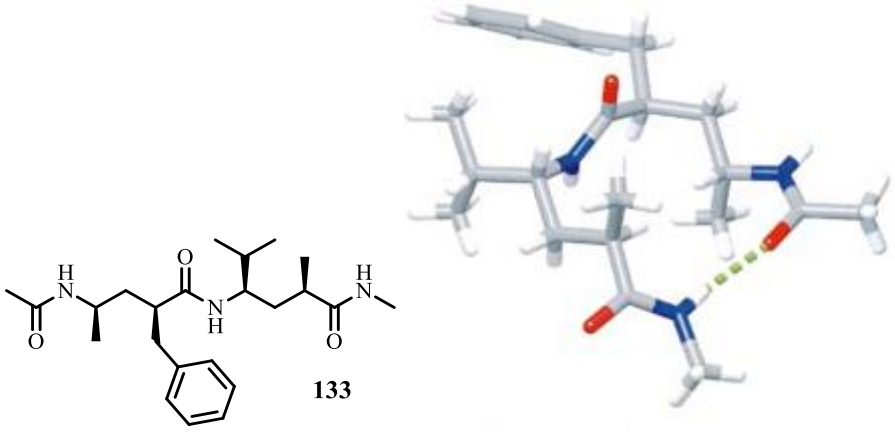


Figure 36 : Dipeptide 133 (à gauche) et coude adopté par le dipeptide 133 (à droite)

Les premières études de dichroïsme circulaire de γ-peptides substitués avec un hétéroatome en position 2 ou 3 (Figure 37) ont été présentées par Seebach et al.[84]

[83] Brenner, M.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 2155.
[84] Brenner, M.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 1181.

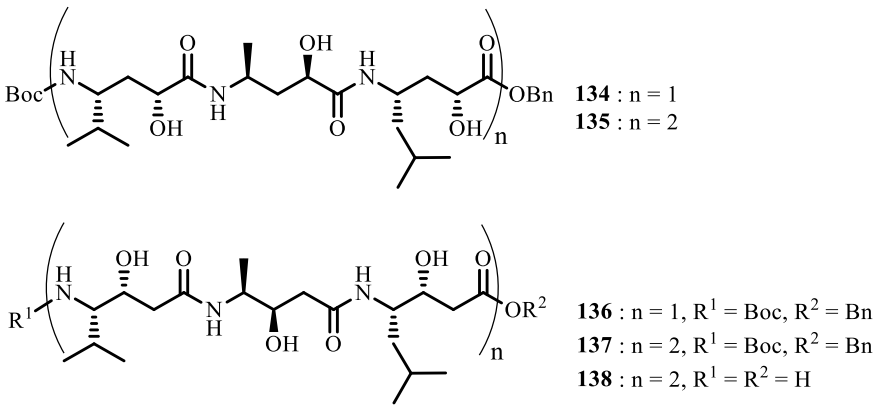


Figure 37 : γ-peptides substitués avec un hétéroatome en position 2 ou 3

Différents γ-peptides comportant un groupement –OH ont été synthétisés et les spectres DC ont été enregistrés. Ces derniers présentent une intensité importante dans l'acétonitrile. Les courbes possèdent un maximum vers 220 nm, passent par zero à 212 nm et ont un effet Cotton négatif à 198 nm. Les courbes sont décalées (3 nm) et moins intenses dans le méthanol que dans l'acétonitrile. Les spectres DC du peptide **138** ont été effectués dans l'eau et le méthanol. L'intensité observée est 2 fois plus faible dans l'eau et le maximum a été déplacé (5 nm). L'intensité du minimum n'a pas été affectée.

Les observations montrent la formation d'une structure secondaire dans l'acétonitrile qui est déstabilisée lorsqu'on passe dans un solvant polaire protique (méthanol ou eau). Les études RMN étaient en cours lors de la publication car les essais de cristallisation des peptides n'avaient pas donné de résultats fructueux.

La structuration de tripeptides contraints contenant un cyclopropane dans la structure de l'acide γ-aminé a été étudiée par le groupe de Smith[85]. Il a été montré que le trimère **139** adopte une conformation étendue et s'organise en feuillet β stabilisé par des liaisons hydrogènes intermoléculaires (Figure 38). La particularité de ce type de liaisons H est la participation de trois atomes, dont un CH.

[85] Khurram, M.; Qureshi, N.; Smith, M. D. *Chem. Commun.* **2006**, *48*, 5006.

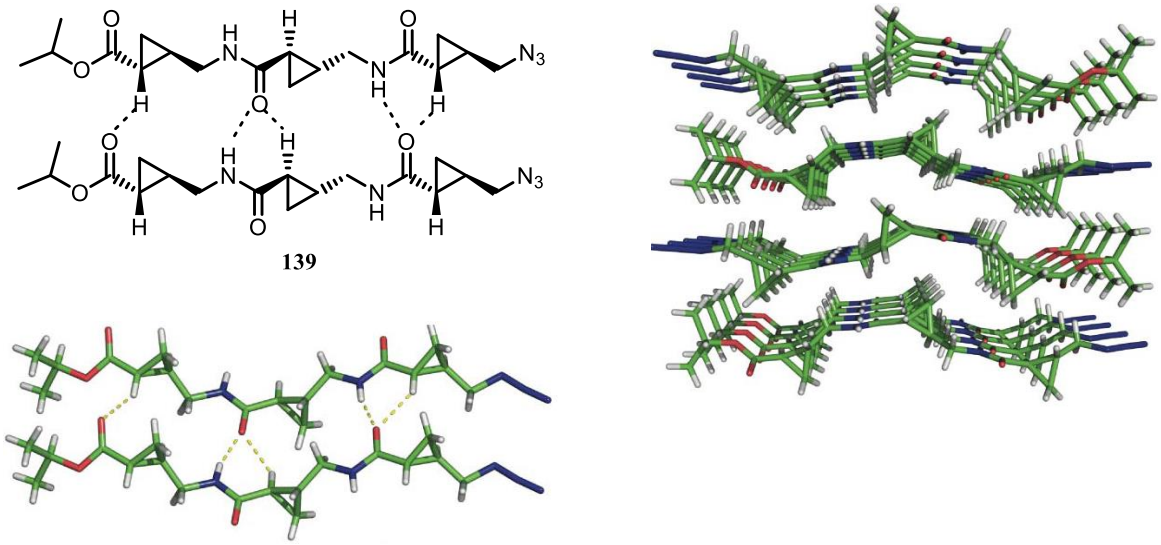
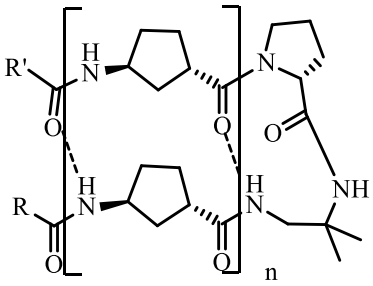


Figure 38 : Représentation de feuillets β (en haut, à gauche), empilement de tripeptides 139 dans la structure RX (en haut, à droite) et structure RX avec des liaisons hydrogènes à trois centres (en bas)

De son côté, l'équipe de Gellman[86] a étudié la formation de feuillets β avec des acides *trans*-3-ACPC attachés par un linker (Figure 39). Les analyses RMN dans le dichlorométhane et les structures RX ont confirmé la structuration en feuillets parallèles.



140 : n = 1, R=R'=$O(CH_3)_3$
141 : n = 1, R=R'=CH_2Ph
142 : n = 2, R=CH_2Ph R'=$C(CH_3)_3$

Figure 39 : Feuillets β adoptés par des acides *trans*-3-ACPC

Les analogues γ de la proline ont fait l'objet des travaux de Royo, Albericio et Pons[87]. Ils ont montré que l'introduction de différentes chaînes latérales (aliphatique ou aromatique) sur l'azote en position α conduit à une grande diversité de monomères pour la synthèse peptidique. Les analyses RMN

[86] Woll, M. G. ; Lai, J. R.; Guzei, I. A.; Taylor, S. J. C.; Smith, M. E. B.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11077.
[87] Farrera-Sinfreu, J.; Zaccaro, L. ; Vidal, D. ; Salvatella, X. ; Giralt, E. ; Pons, M. ; Albericio, F. ; Royo, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6048.

effectuées dans l'eau ont montré que l'hexamère **143** adopte une structure en forme de ruban, stabilisée par des liaisons hydrogènes à 9 atomes (Figure 40).

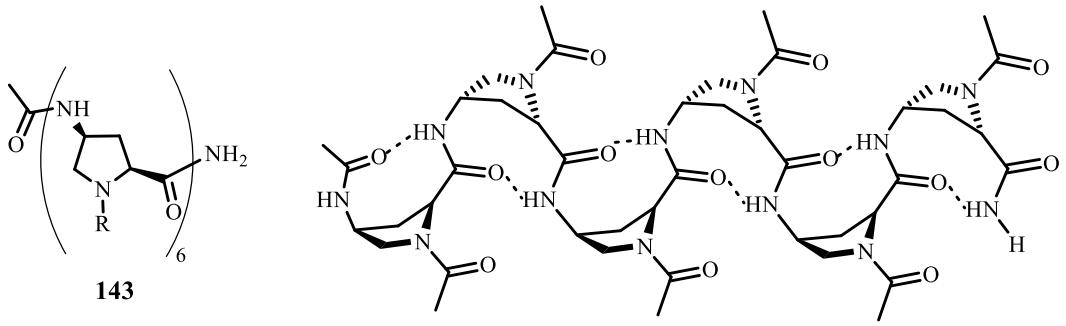


Figure 40 : Hexapeptide 143 constitué de dérivés de la γ-proline (à gauche) et structure secondaire en forme de ruban stabilisée par des liaisons hydrogènes à 9 atomes (à droite)

Le même type de structuration a été présenté précédemment avec les peptides composés de gabapentine.

En 2007, l'équipe de Smith[88] a présenté des travaux sur le dérivé contraint de l'acide γ-aminé 2,2-trans-dioxolane **144**. Les analyses RMN ainsi que le dosage DMSO-d_6 dans le benzène évoquent la formation d'une structure secondaire en forme de ruban stabilisé par des liaisons hydrogènes intramoléculaires à 7 atomes (Figure 41).

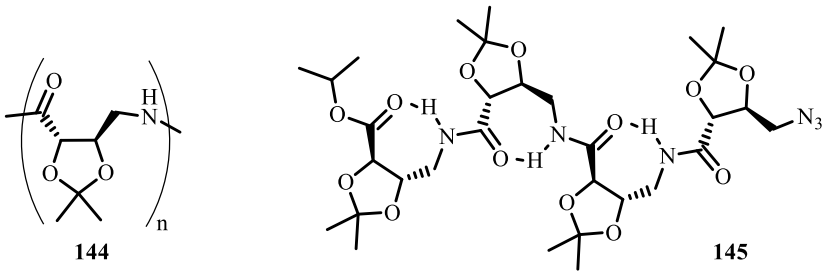


Figure 41 : Acide γ-aminé 2,2-trans-dioxolane 144 (à gauche) et structure secondaire en forme de ruban stabilisé par des liaisons hydrogènes à 7 atomes (à droite)

[88] Kothari, A.; Khurram, M.; Qureshi, N.; Beck, E. M.; Smith, D. M. *Chem. Commun.* **2007**, *27*, 2814.

3.2.3. Homooligomères contenant des acides γ-aminés trisubstitués

L'équipe de Seebach[77,89] a publié des études sur des oligopeptides substitués en position 2, 3 et 4 (Figure 42).

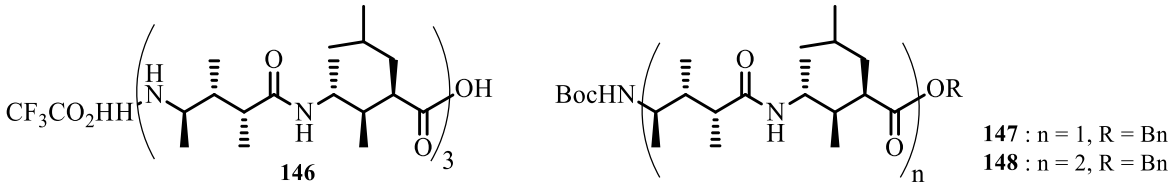


Figure 42 : Homooligomères contenant des acides γ-aminés trisubstitués

Les structures RX des produits intermédiaires **147** et **148** (Figure 43) de la synthèse ont été obtenues. Le γ-dipeptide **147** cristallise sous la forme d'une hélice gauche stabilisée par une liaison hydrogène formant un cycle à 9 atomes. Dans le cas du γ-tétrapeptide **148** les auteurs ont encore obtenu une hélice mais avec deux boucles à 14 atomes.

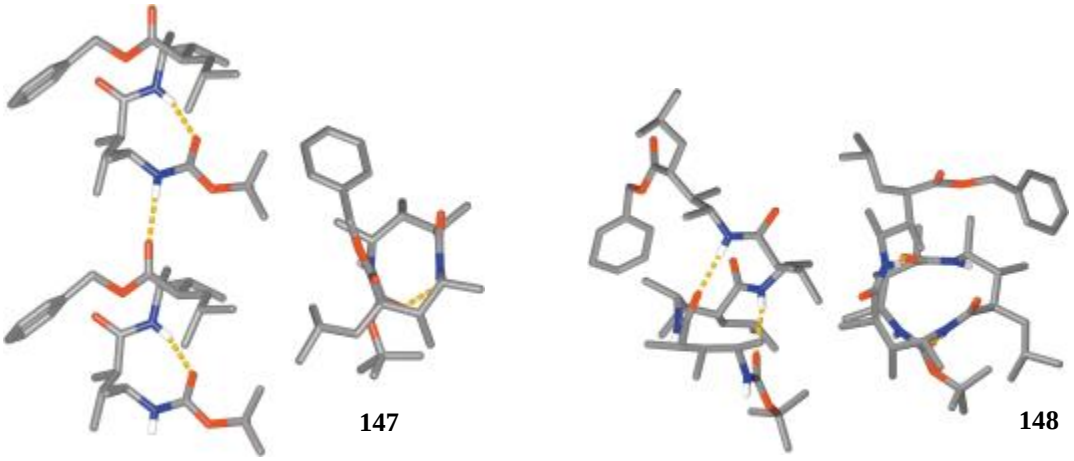


Figure 43 : Structure RX du dipeptide 147 en forme d'hélice C_9 (à gauche) et structure RX du tétrapeptide 148 en forme d'hélice C_{14} (à droite)

Des études RMN exhaustives ont été réalisées sur l'hexapeptide **146** dans le méthanol. Les distances interatomiques ainsi que les angles dièdres, extraits du spectre ROESY et des constantes de couplage, ont été utilisés dans le recuit simulé (Figure 44).

[89] Seebach, D.; Brenner, M.; Rueping, M.; Schweizer, B.; Jaun, B. *Chem. Comm.* **2001**, *2*, 207.

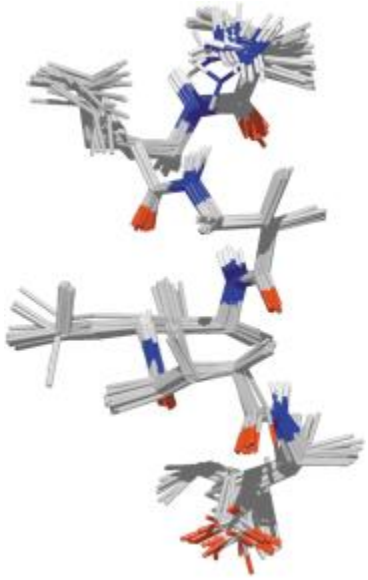


Figure 44 : Dix structures de plus basse énergie montrant l'hélice C_{14} adoptée par l'hexapeptide 146 dans le méthanol

Une hélice gauche 2.6_{14} a été obtenue avec des liaisons hydrogènes entre le C=O de résidu *i* et le NH du résidu *i*+3.

3.3. Hétérooligomères contenant des acides γ-aminés

3.3.1. Introduction

Dans le cadre de cette thèse, nous allons synthétiser et étudier des peptides hybrides α/γ comportant des acides β,γ-diaminés. Néanmoins, l'acide β,γ-diaminé peut être utilisé non seulement en tant qu'acide γ-aminé mais également en tant qu'acide β-aminé grâce au groupement amine en position β. Dans ce paragraphe nous allons brièvement présenter les structures secondaires adoptées par des peptides hybrides β/γ et parler plus en détail de la structuration des peptides hybrides α/γ.

3.3.2. Oligomères hybrides β/γ

Les calculs théoriques effectués par l'équipe de Hoffman en 2006[90] montrent que les peptides hybrides β/γ comportant des acides aminés non-substitués peuvent adopter une hélice 13 (présente dans les peptides naturels) ou 11/13 Figure 45).

[90] Baldauf, C.; Gunther, R.; Hofmann, H. J. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1200.

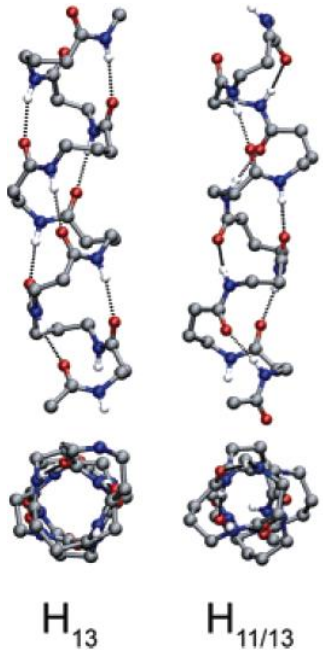


Figure 45 : Hélice 13 (à gauche) et hélice 11/13 (à droite) prédites par les calculs théoriques

En 2007, l'équipe de Balaram[91] a publié les travaux sur un tripeptide α/β/γ Boc-βLeu-Gpn-Val-OMe **149** (Figure 46). La structure RX a montré que le trimère **149** adopte une structure secondaire stabilisée par une liaison hydrogène à 13 atomes entre le carbonyle du résidu *i* et l'amide du résidu *i*+3. Les angles dièdres de l'hélice observée sont très proches de ceux prédits par Hoffman.

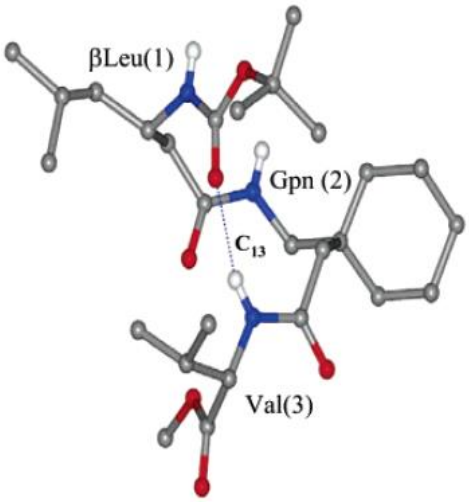


Figure 46 : Structure RX du tripeptide 149 stabilisée par une liaison hydrogène C_{13}

[91] Vasudev, P. G. ; Ananda, K.; Chatterjee, J.; Aravinda, S.; Shamala, N. ; Balaram, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4039.

En 2010, l'équipe de Gellman[92] présente une première hélice 13 adoptée par un pentapeptide comportant l'alternance d'un acide γ-aminé contraint et l'acide cyclique β-aminé ACPC. La structure cristalline met en évidence une hélice 13 droite formée par le pentamère **150** constitué des résidus de configuration *S* (Figure 47). Le pentapeptide **151** comportant les résidus *R* adopte une hélice 13 droite.

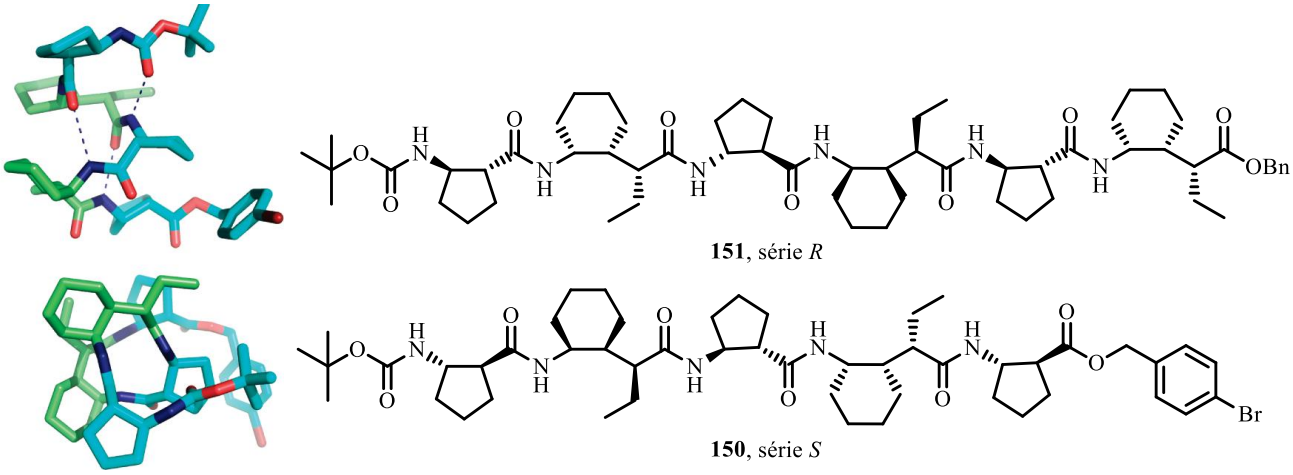


Figure 47 : Structure RX du pentapeptide 150 à l'axe verticale (à gauche, en haut), le long de l'axe (à gauche, en bas), structure du pentapeptide 150 (en bas) et du pentapeptide 151 (en haut)

En 2006, les travaux de l'équipe de Sharma et Kunwar[93] ont montré un nouveau type d'hélice 11/13 adopté par un peptide hybride β/γ alterné **152** constitué de dérivés d'acide carbofuranosyle β- ou γ-aminés (Figure 48). Les angles dièdres obtenus après la dynamique moléculaire sont en concordance avec ceux déterminés par Hoffman.

[92] Guo, L. ; Almeida A. M. ; Zhang, W. ; Reidenbach, A. G.; Hyuk Choi, S.; Guzei, I. A.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7868.
[93] Sharma, G. V. M. ; Jadhav, V. B. ; Ramakrishna, K. V. S.; Jayaprakash, P.; Narsimulu, K.; Subash, V.; Kunwar, A. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14657.

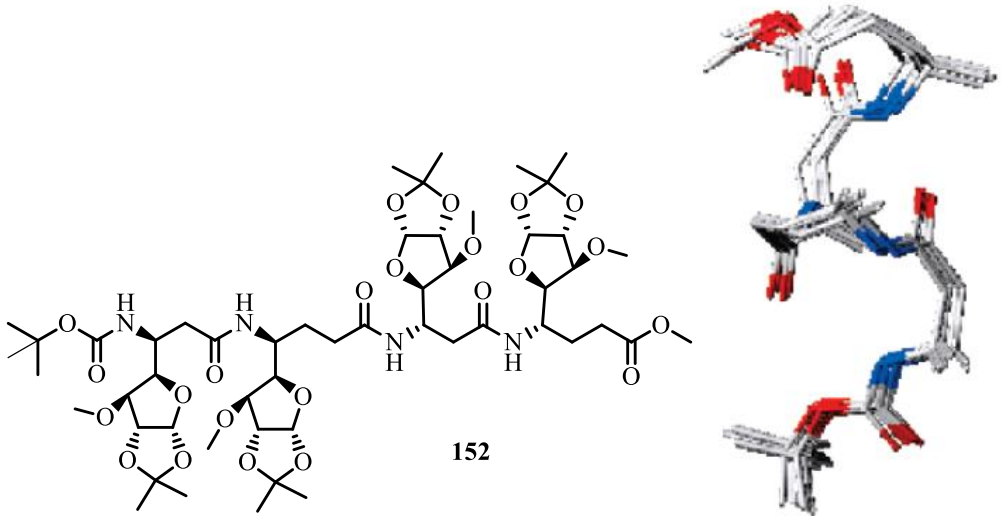


Figure 48 : Structure du tétramère 152 (à gauche) et superposition des 20 structures de plus basse énergie issues de la modélisation moléculaire sous contraintes RMN (à droite)

3.3.3. Oligomères hybrides α/γ

Afin d'élargir le nombre de structures secondaires de γ-peptides, plusieurs équipes scientifiques ont commencé à étudier la structuration des peptides hybrides α/γ. Des calculs théoriques, effectués par l'équipe d'Hoffmann[89], ont montré que les octapeptides alternés α/γ devraient adopter préférablement des hélices stabilisées par des liaisons hydrogènes C_{12}, $C_{12/10}$ ou $C_{18/20}$ (Figure 49).

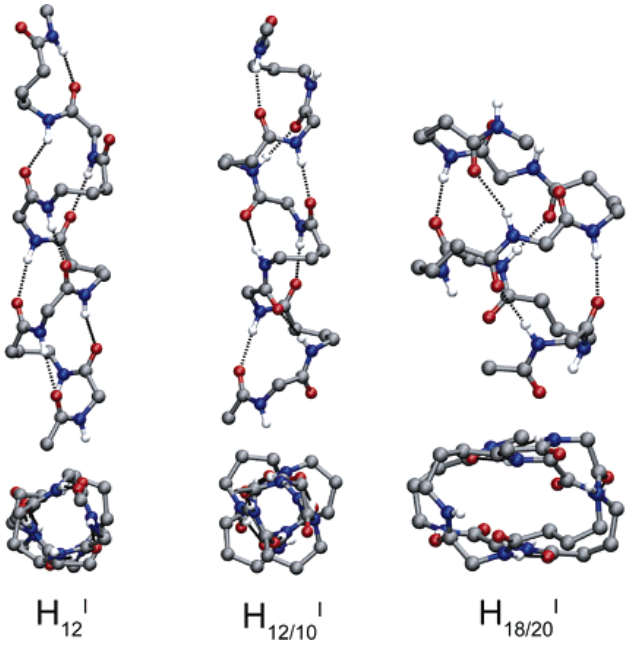


Figure 49 : Hélices stabilisées par des liaisons hydrogènes C_{12}, $C_{12/10}$ ou $C_{18/20}$ issues de calculs théoriques

Les travaux de Shamala et Balaram[94] sur les peptides hybrides α/γ, comportant le motif gabapentine, ont montré que le tétramère Boc-Aib-Gpn-Aib-Gpn-OMe **153** existait sous la forme d'une hélice C_{12} à l'état solide (Figure 50). Les calculs moléculaires sur un polymère $(Aib\text{-}Gpn)_n$ ont généré la même hélice stabilisée par des liaisons hydrogènes consécutives à 12 atomes.

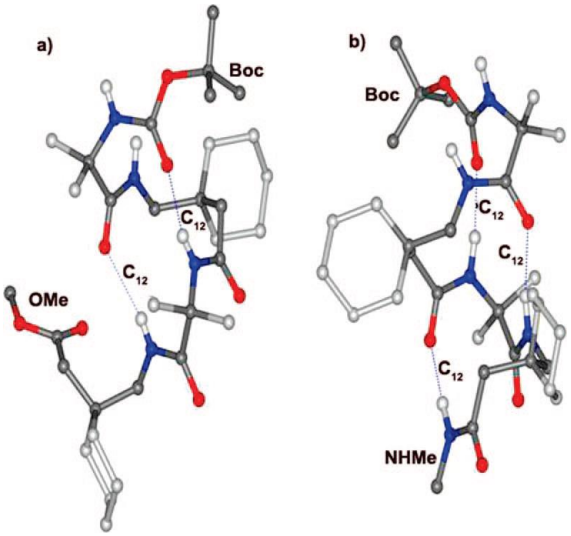


Figure 50 : Structure RX du tétrapeptide 153 (à gauche) et modélisation du tétrapeptide 154 allongé avec le NHMe de côté C_{ter} (à droite) La modélisation a été effectuée en fixant les angles observés sur la structure RX du tétrapeptide 153

Les auteurs ont décidé d'allonger la chaîne avec le groupement NHMe[95] afin d'obtenir une liaison hydrogène C_{12} supplémentaire pour stabiliser l'hélice (Figure 46). De façon surprenante, ce petit changement a donné trois structures RX différentes contenant l'hélice attendue mais du côté C_{ter} des liaisons différentes : C_7 ou C_9 ou un nouveau C_{17}. Les analyses RX sur l'octapeptide[96] **155** (Figure 51) et les études RMN sur le nonapeptide **156** ont montré que l'allongement de la chaîne peptidique stabilise l'hélice C_{12} qui peut être considérée comme un analogue de l'hélice 3_{10} naturelle.

[94] Ananda, K.; Vasudev, P. G. ; Sengupta, A.; Poopathi Raja, K. M. ; Shamala, N. ; Balaram, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16668.
[95] Chatterjee, J.; Vasudev, P. G. ; Ananda, K.; Raghotama, S.; Shamala, N. ; Balaram, P. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6595.
[96] Chatterjee, J.; Vasudev, P. G. ; Raghotama, S.; Ramakrishnan, C.; Shamala, N. ; Balaram, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5956.

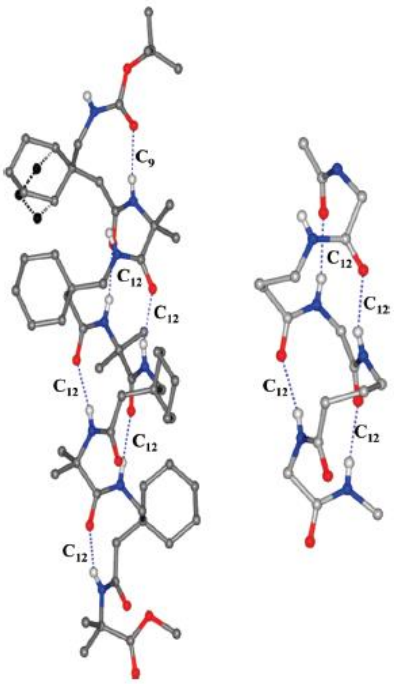
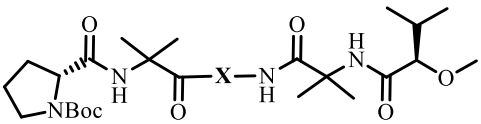


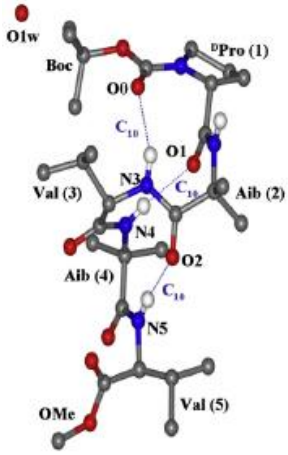
Figure 51 : Structure RX de l'octapeptide 155 (à gauche) et chaîne carbonée de l'hélice 12 (à droite)

La même équipe a publié[97] des travaux sur l'influence de la configuration de l'acide γ aminé ((*R*) ou (*S*)) sur la structuration du pentapeptide **157** (Figure 52). Pour effectuer cette étude, les pentapeptides **158** et **159** ont été synthétisés et les structures cristallines ont été obtenues (Figure 48). Dans le cas du pentapeptide **157** une hélice stabilisée par des liaisons hydrogènes à 10 atomes a été observée. Le pentapeptide **158** cristallise dans deux formes polymorphes **158A** et **158B**. Les deux structures possèdent deux boucles C_{12}. La première forme co-cristallise avec une molécule d'eau à l'endroit d'une boucle à 10 (**158A**), tandis que la deuxième crée une liaison hydrogène avec de l'éthanol. La participation des solvants dans la formation des liaisons hydrogènes des structures secondaires est déjà connue dans les hélices α des peptides naturels[98]. Les deux formes adoptent une structure hélicoïdale *droite*.

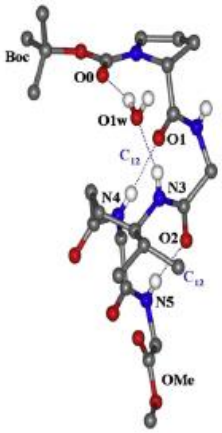
[97] Dinesh, B.; Basuroy, K.; Shamala, N.; Balaram, P. *Tetrahedron*, **2012**, *68*, 4374.
[98] a). Karle, I. L.; Flippen-Anderson, K. Uma; Balaram, P. *Biopolymers* **1993**, *33*, 827. b). Karle, I. L.; Flippen-Anderson, K. Uma; Balaram, P. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, *44*, 491.



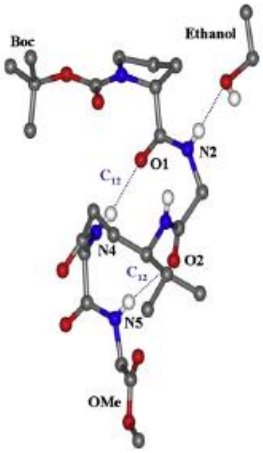
157 : X = L-Val
158 : X = γ^4-(R)Val
159 : X = γ^4-(S)Val



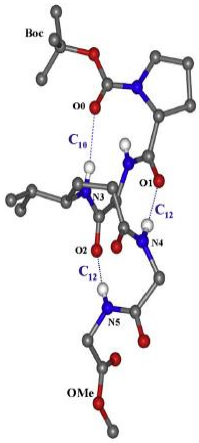
157



158A



158B

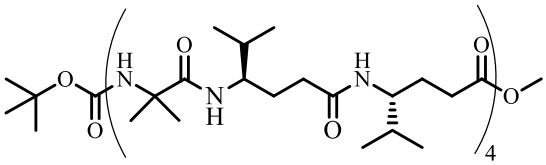


159

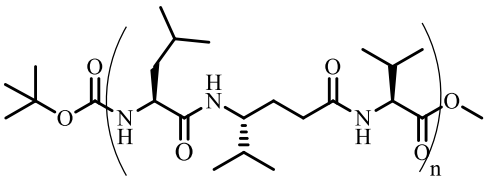
Figure 52 : Structure cristallographique du pentapeptide 157, du pentapeptide 158A contenant une molécule d'eau à l'endroit de la liaison à 10 atomes, du pentapeptide 158B contenant une molécule d'éthanol et du pentapeptide 159

La structure du pentapeptide **159** est stabilisée par trois liaisons hydrogènes C_{12} et adopte une forme d'hélice *gauche*, inverse de celle du pentapeptide **158**. Il faut remarquer que le groupement méthylène supplémentaire dans la chaîne de l'acide γ-aminé ne perturbe pas la formation des liaisons hydrogènes et la structuration des molécules.

Récemment, en 2013, Balaram et Shamala[99] ont publié leurs travaux sur les oligopeptides mixtes (αγγ) et (αγα) présentés sur la Figure 53.



160



161 : n = 1
162 : n = 2

Figure 53 : Oligopeptides mixtes (αγγ) et (αγα)

[99] Basuroy, K.; Dinesh, B.; Shamala, N.; Balaram, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 3136.

Les structures cristallines montrent que le peptide **160** cristallise dans le groupe spatial monoclinique $P2_1$ avec 3 molécules indépendantes dans une unité cristallographique. Les trois structures adoptent une hélice stabilisée par des liaisons hydrogènes à 12 et 14 atomes (Figure 54). Il faut remarquer que le cycle à 12 se forme avec les résidus αγ et le cycle à 14 avec les γγ.

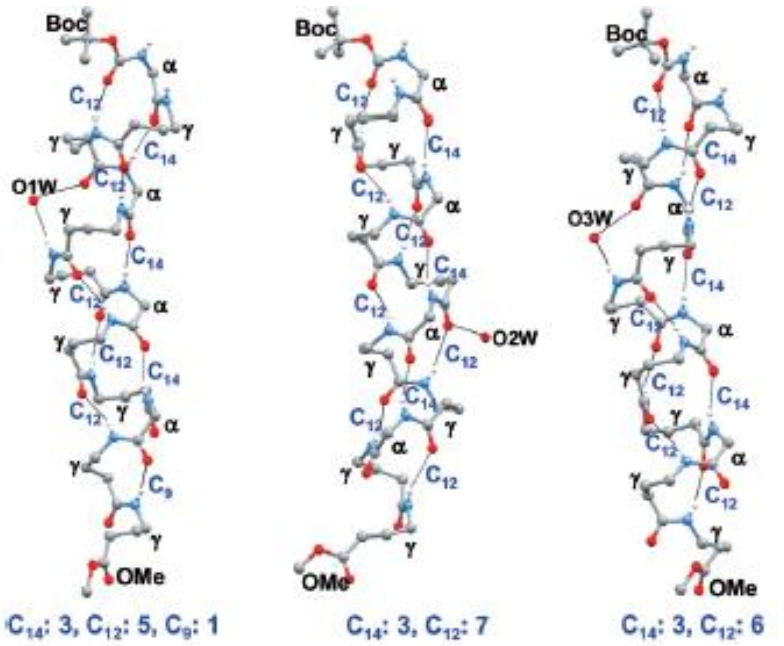


Figure 54 : Trois structures RX différentes du peptide 160

La deuxième molécule possède une alternance parfaite des liaisons $C_{12}/C_{14}/C_{12}$. Dans les structures 1 et 3 une seule molécule d'eau (O1W et O3W) intervient à la place d'une boucle à 12 potentielle.

La structuration des peptides alternés (αγα) a été étudiée avec le tripeptide **161** et l'hexapeptide **162** (Figure 55).

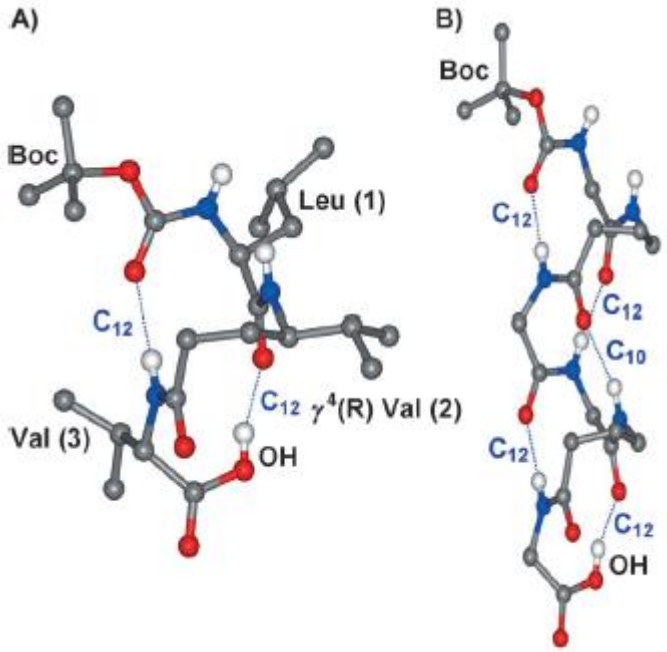


Figure 55 : Structure RX en forme d'hélice C_{12} du tripeptide 161 (à gauche) et de l'hexapeptide 162 (à droite)

D'après les structures cristallines, l'hélice du tripeptide **161** possède 2 liaisons hydrogènes à 12 atomes et l'hélice de l'hexapeptide **162** est stabilisée par 4 liaisons C_{12} entre les résidus γα et une liaison C_{10} entre les résidus αα. Il est intéressant de constater que la dernière liaison hydrogène se forme entre un CO amide et le HO de la fonction acide. Cette liaison peut être considérée comme l'analogue de la liaison CO – HN classique.

En 2012 et 2013 la même équipe a présenté des travaux[100] sur la structuration d'une série de peptides hybrides α/γ alternés (Boc-(Aib-γ^4(*R*)Val)$_n$-OMe, ou n = 2 (**163**), 4 (**164**), 6 (**165**), 8 (**166**)) (Figure 56). Les structures cristallines ainsi que les analyses RMN, IR et de DC[101] ont confirmé une forte structuration en hélice C_{12}.

[100] Basuroy, K.; Dinesh, B.; Shamala, N.; Balaram, P. *Angew. Chem. In. Ed.*. **2012**, *51*, 8736.
[101] Dinesh, B.; Vinaya, V.; Ragothama, S.; Balaram, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013*, 3590.

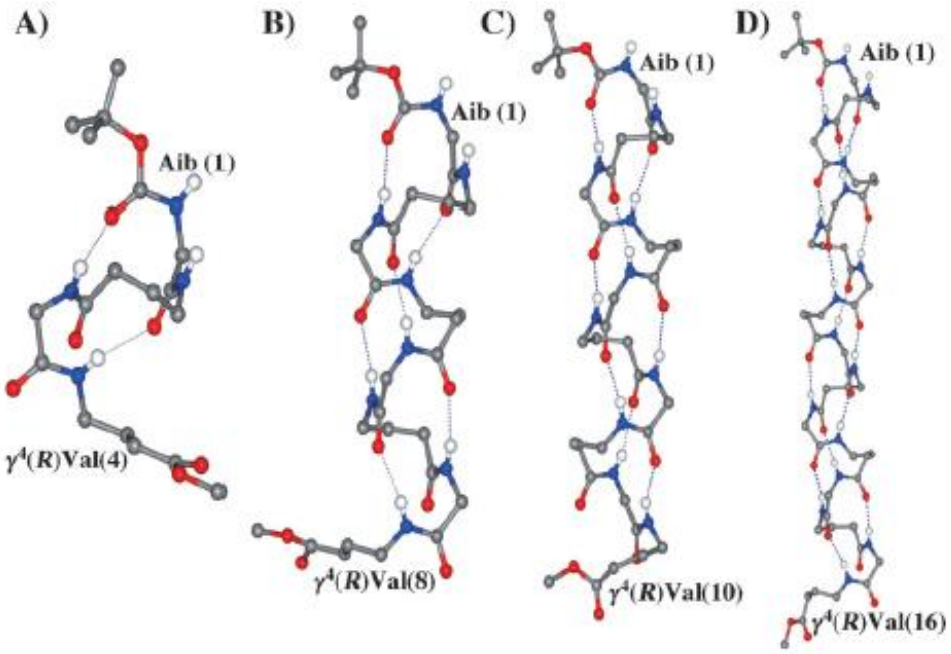


Figure 56 : Structures RX de di- 163 (a), tétra- 164 (b), hexa- 165 (c) et octapeptide 166 (d) qui adoptent une structure secondaire en forme d'hélice C_{12}

En 2014, la même équipe a montré[102] que même le décapeptide sans contrainte au niveau de la chaîne carbonée Boc-(Leu-γ^4(R)Val)$_5$-OMe **167** est capable d'adopter une hélice stable C_{12} (Figure 57). Par contre deux molécules de méthanol interviennent à la place de deux liaisons hydrogènes. Le dosage au DMSO a montré que le décapeptide **167** existe sous forme d'hélice en solution parce que seulement deux NH terminaux sont affectés par l'ajout de DMSO-d_6.

[102] Sont, R.; Dinesh, B.; Basuroy, K.; Raghothama, S.; Shamala, N.; Balaram, P. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 1656.

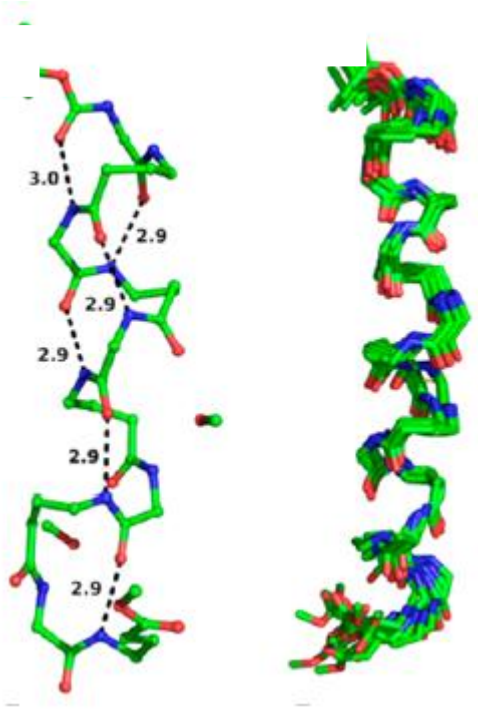


Figure 57 : Structure cristalline en forme d'hélice du décapeptide Boc-(Leu-γ^4(R)Val)$_5$-OMe 167 avec deux molécules d'éthanol à la place de deux liaisons C_{12} (à gauche) et superposition des 10 structures de plus basse énergie du peptide à 16 résidus 168 (à droite)

Encouragé par les résultats obtenus, les auteurs ont synthétisé et étudié le peptide à 16 résidus Boc-(Leu-γ^4(R)Val-Phe-γ^4(R)Val-Ala-γ^4(R)Val-Val-γ^4(S)Ala)$_2$-OMe **168** (Figure 57). Le dosage au DMSO ainsi que les analyses RMN couplées à la modélisation moléculaire ont confirmé la forte structuration du peptide **168** sous la forme d'une hélice 12. Ce résultat a montré que les peptides hybrides α/γ ont une forte tendance à adopter une conformation secondaire même en absence de résidus contraints.

En 2009, Gellman et coll.[103] ont publié leurs travaux sur les peptides α/γ-alternés contenant un acide γ-aminé cyclique **169**. En s'appuyant sur les simulations d'Hoffman, ils ont prédit qu'un peptide alterné α/γ comportant un acide D-α-aminé et un acide (*R, R, R*)-γ-aminé adopterait une hélice 12.

Cette idée a été confirmée après avoir examiné les structures d'un tétrapeptide **170** et d'un hexapeptide **171** (Figure 58). Les analyses RMN, UV, IR[104] et la diffraction des rayons X ont montré que les deux peptides adoptaient une forme d'hélice 12, prédite par Hoffman.

[103] Guo, L. ; Chi, Y. ; Almeida, A. M. ; Guzei, I. A. ; Parker, B. K. ; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 1601.

[104] Kusaka, R.; Zhang, D.; Walsh, P. S.; Gord, J. R.; Fisher, B. F.; Gellman, H. S. *J. Phys. Chem. A*, **2013**, *117*, 10847.

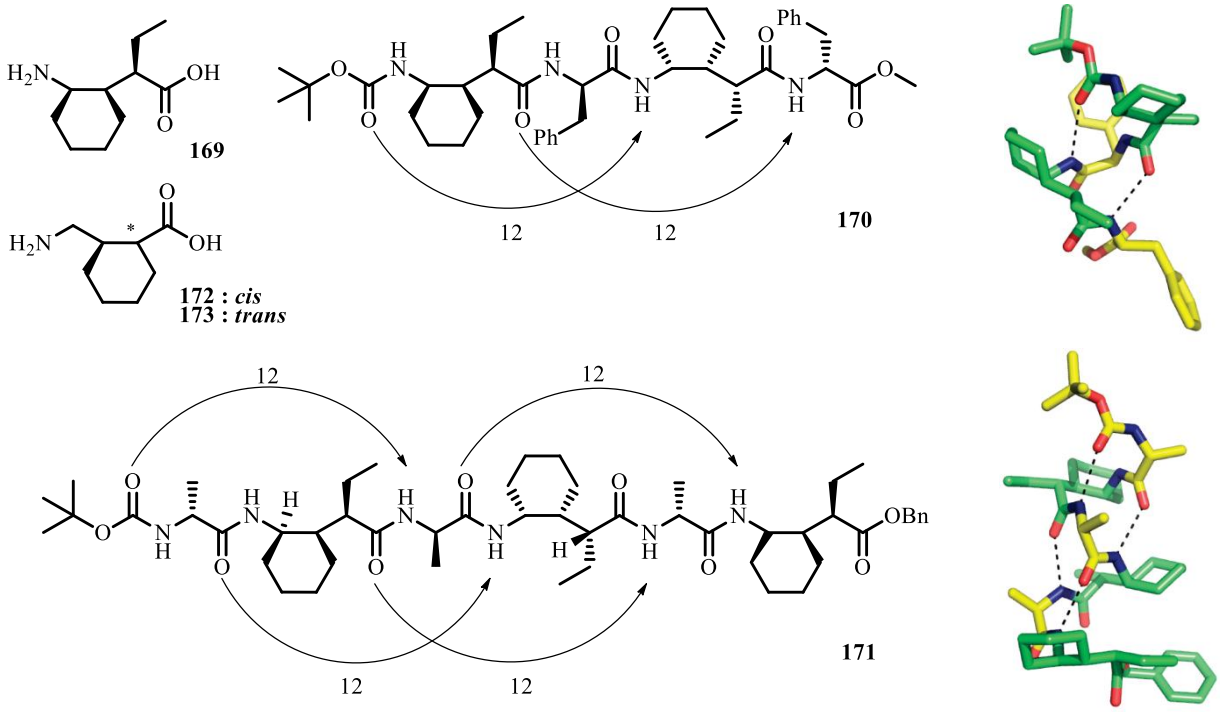


Figure 58 : Hélice 12 adoptée par le tétrapeptide 170 avec sa structure cristalline (en haut) et hélice C_{12} adoptée par l'hexapeptide 171 avec sa structure RX (en bas)

Les dérivés cycliques **172** et **173** ont été également étudiés[105]. D'après les résultats obtenus, les peptides hybrides α/γ comportant l'acide aminé **172** *cis* adoptent une hélice 12 comme dans les cas précédents. Par contre, aucune information sur la structuration des peptides avec le dérivé **173** *trans* n'a été obtenue.

En 2013, l'équipe de Gellman a publié une étude sur les peptides hybrides α/γ contenant un analogue de l'acide **174** *trans* avec un cycle à 5. Malgré la contrainte présente, le peptide **175** n'adoptent pas une seule conformation stable d'hélice 12/10, et les analyses RMN montrant la présence d'autres conformations en solution (Figure 59).

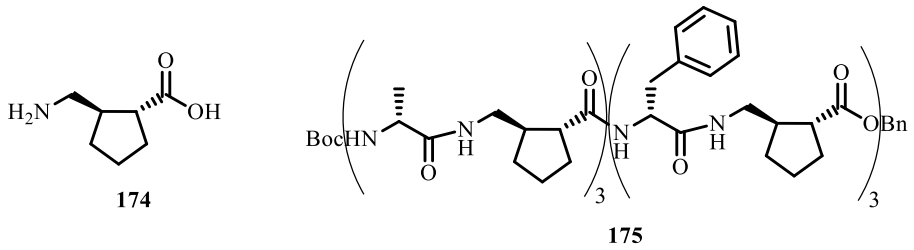


Figure 59 : Acide 174 *trans* (à gauche) et hexapeptide hybride α/γ 175 (à droite)

[105] Guo, L.; Zhang, W.; Guzei, I. A.; Spencer, L. C.; Gellman, S. H. *Org. Lett.*, **2012**, *14*, 2582.

L'équipe de Gopi[106] s'est intéressée à l'étude des tétrapeptides α/γ **176** et **177** comportant un acide γ-aminé β-hydroxylé (Figure 60). Ils ont montré que ces peptides adoptent une structure d'hélice C_{12}. Les groupements hydroxyles participent dans la formation des liaisons hydrogènes à 6 et 10 chaînons respectivement dans les diastéréomères *syn* et *anti*.

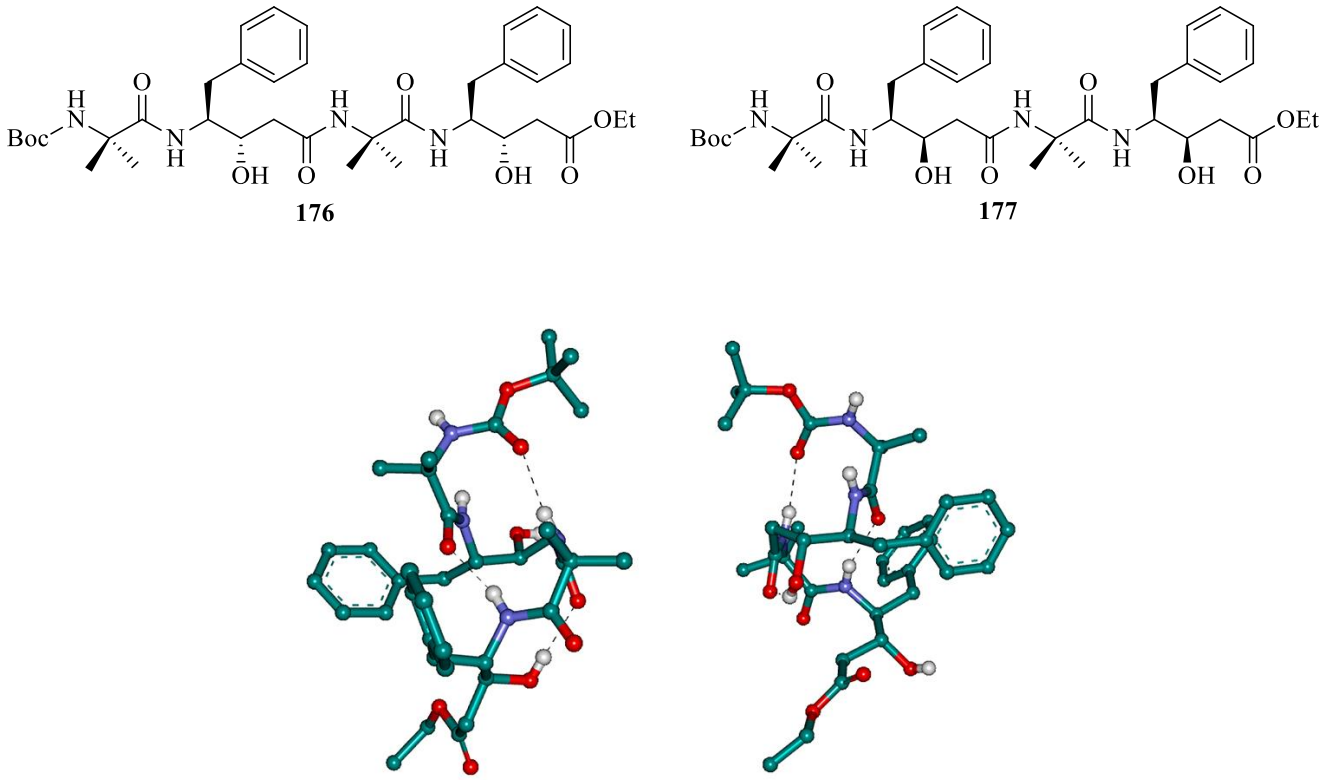


Figure 60 : Hélice C_{12} adoptées par tétrapeptides α/γ 176 (à gauche) et 177 (à droite) comportant un acide γ-aminé β-hydroxylé. Les chaînes latérales ne sont pas montrées

Une hélice mixte 12/10 a été découverte par une équipe de Sharma et Kunwar[92] dans une série de peptides α/γ constitués de L-alanine et d'un dérivé du D-mannose (γ-Caa) (Figure 61).

[106] Bandyopadhyay, A.; Malik, A.; Kumar, G. M.; Gopi, H. N. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 294.

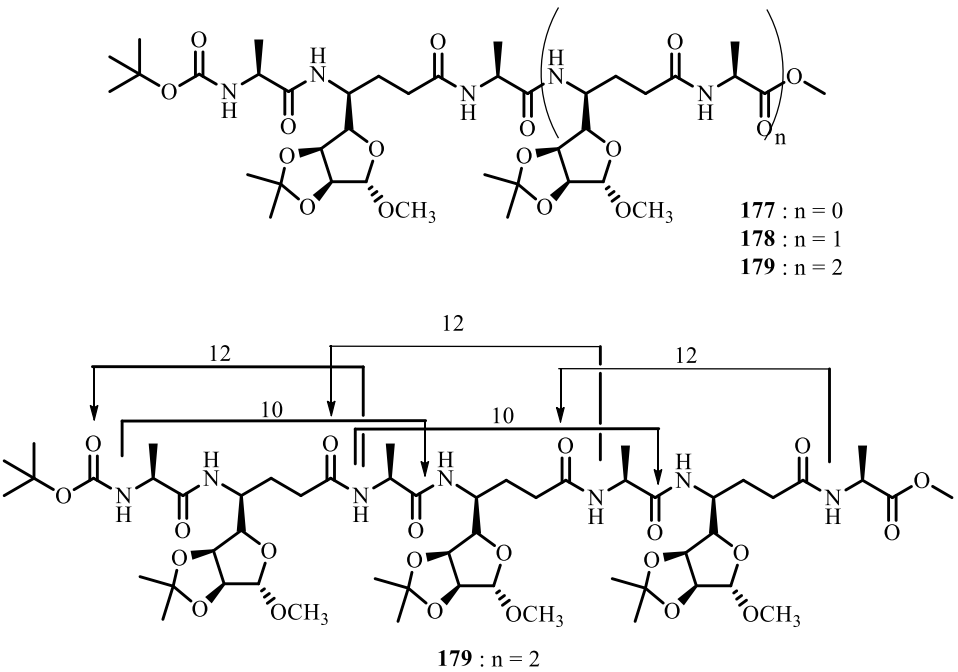


Figure 61 : Représentation d'une hélice 12/10 du peptide α/γ constitué d'un dérivé du D-mannose (γ-Caa) couplé avec la L-alanine

La structure obtenue a été confirmée par le dosage avec le DMSO-d_6 et les analyses RMN dans le chloroforme couplées à la modélisation moléculaire en appliquant des contraintes conformationnelles. Les 20 structures de plus basse énergie pour le pentapeptide **178** et l'heptapeptide **179** sont présentées sur la Figure 62.

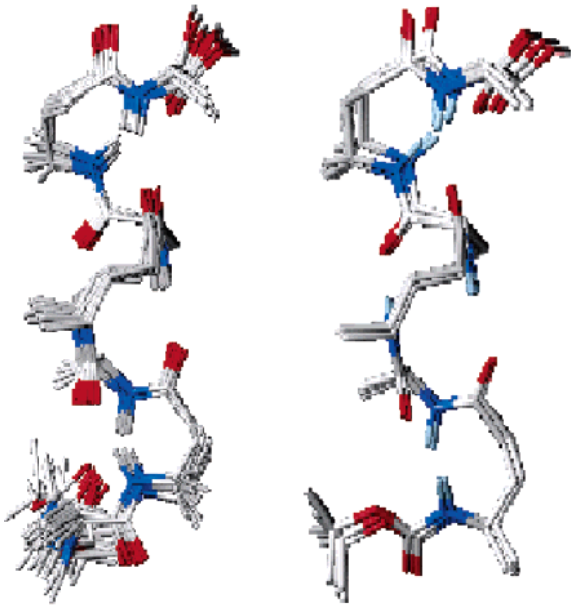


Figure 62 : 20 structures de plus basse énergie pour le pentapeptide 178 (à gauche) et l'heptapeptide 179 (à droite) adoptant une hélice 12/10

3.3.4. Oligomères contenant un seul acide γ-aminé dans la chaîne des acides α-aminés

La forte capacité des acides γ-aminés à adopter une structure secondaire en forme d'hélice ou de ruban dans les peptides hybrides α/γ, présentée dans le paragraphe précédent, a poussé les chercheurs à explorer d'autres structures secondaires notamment en insérant l'acide γ-aminé dans une chaîne d'acides naturels.

Dans ce paragraphe nous allons présenter différents α/γ-peptides qui sont capables de mimer un 'reverse turn' et un 'β-hairpin'. Ces deux structures secondaires jouent un rôle très important en tant qu'éléments de reconnaissance des interactions intermoléculaires[107]. Les 'β-hairpins' sont constitués de deux feuillets parallèles stabilisés par des liaisons inter-brins.

Le dérivé 7-*endo*-**BTL** (**B**icycle provenant de l'acide **T**artrique et de la **L**eucine)[108] introduit un « reverse turn » dans une chaîne peptidique courte. En solution, le peptide **180** contenant 7-*endo*-**BTL** existe sous la forme d'un mélange des deux structures secondaires : 'β-hairpins' (majoritaire) et 'γ-turn' (minoritaire). La stabilisation de cette structure secondaire provient de la nature de l'acide γ-aminé (Figure 63).

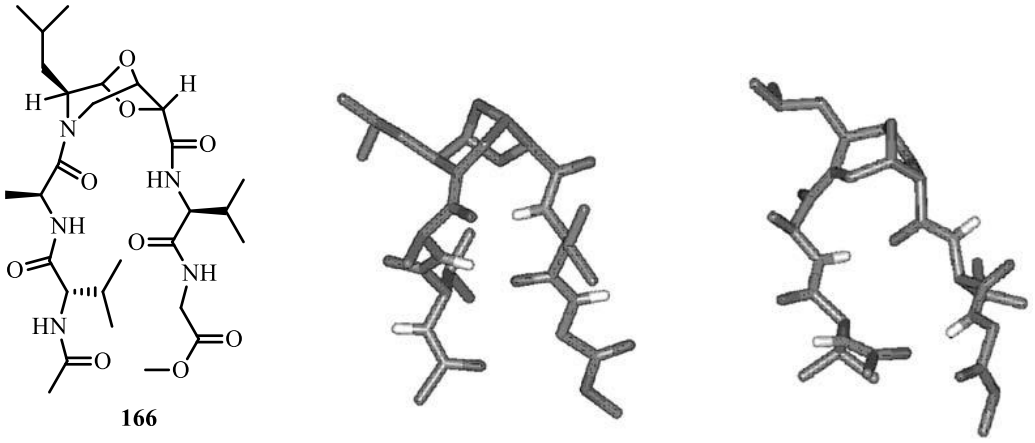
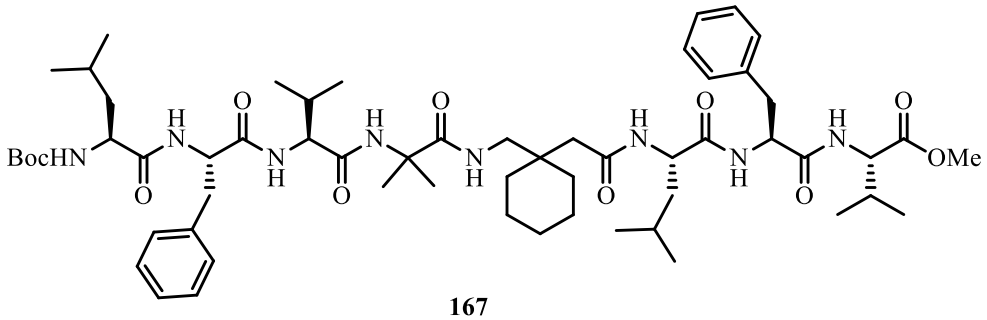


Figure 63 : Structure du peptide 180 contenant l'acide 7-*endo*-BTL (à gauche) et ses deux structures secondaires adoptées 'β-hairpins' (majoritaire) (au centre) et 'γ-turn' (minoritaire) (à droite)

En 2009, l'équipe de Balaram[109] a publié une étude sur un octapeptide **181** comportant des acides aminés naturels, un motif Aib et le gabapentine (Gpn) au milieu de la chaîne. Ils ont montré que le peptide **181** existe sous forme de β-hairpin à l'état solide et en solution dans le méthanol (Figure 64). Le

[107] Stanfield, R. L.; Fieser, T. M.; Lerner, R. A.; Wilson, I. A. *Science* **1990**, *248*, 712.
[108] Trabocchi, A. ; Occhiato, E. G. ; Potenza, D.; Guarna, A. *J. Org. Chem*. **2002**, *67*, 7483.
[109] Chatterjee, J.; Vasudev, P. G. ; Raghotama, S.; Ramakrishnan, C.; Shamala, N. ; Balaram, P. *J. Am. Chem. Soc*. **2009**, *131*, 5956.

segment central Aib(4)-Gpn(5) introduit une liaison hydrogène à 12 atomes tandis que les deux brins sont stabilisés par des liaisons hydrogènes inter-brins.



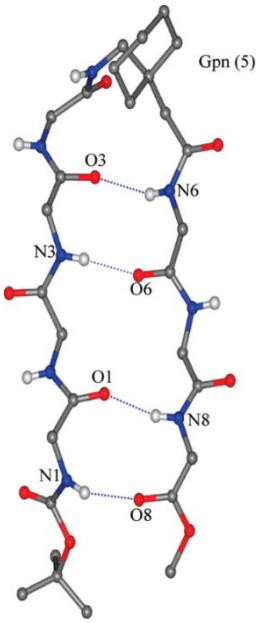


Figure 64 : Structure de l'octapeptide 181 (à gauche) et sa structure RX (à droite) en forme de β-hairpin

En 2006[110] la même équipe a montré que l'insertion d'un acide γ-aminé non substitué dans le décapeptide en position 3 et 8 ne perturbe pas la structure du feuillet antiparallèle.

3.4. Oligomères contenant des analogues d'acides γ-aminés

3.4.1. Oligomères contenant un acide γ-aminé insaturé

Les γ-peptides constitués d'acides vinyliques sont de nouveaux types de building-block dans la synthèse des foldamères. La présence de la double liaison dans la chaîne carbonée apporte une rigidité et la configuration (*E*) ou (*Z*) impose un contrôle sur la formation des structures secondaires.

Les calculs théoriques[111] faits sur les γ-peptides vinyliques ont prédit que la double liaison (*E*) favorise une hélice avec de grands pseudocycles comportant de 14 jusqu'à 27 atomes, tandis que la configuration (*Z*) conduit aux pseudocycles C_9 et C_7.

Ce type de γ-peptides a intéressé l'équipe de Schreiber[112] en 1992. Une série de γ-peptides différents (Figure 65) a été synthétisée afin d'explorer les structures secondaires qui peuvent être adoptées.

---

[110] Roy, R. S.; Gopi, H. N.; Raghothama, S.; Karle, I. L.; Balaram, P. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 3295.
[111] Baldauf, C.; Günther, R.; Hofmann, H.-J. *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 5351.
[112] Hagihara, M.; Anthony, N. J.; Stout, T. J.; Clardy, J.; Schreiber, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6568.

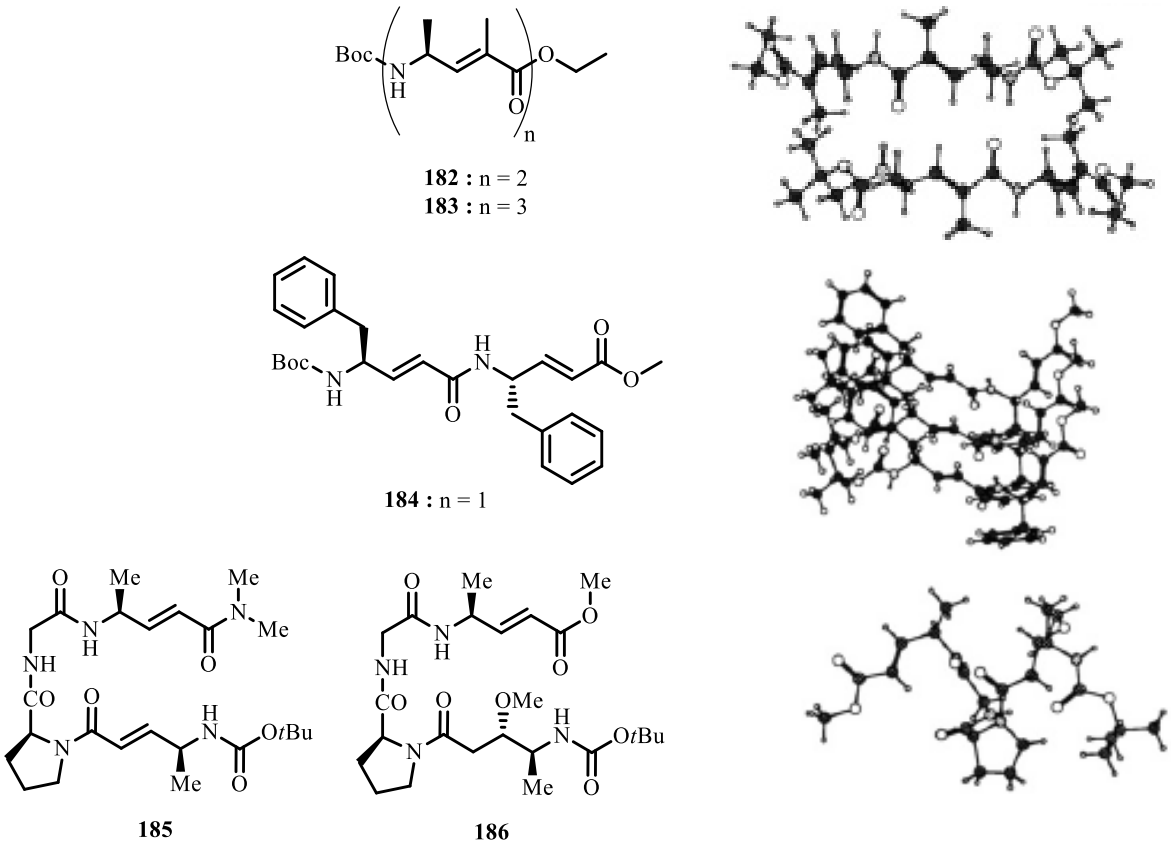


Figure 65 : Structures de peptides (à gauche) avec des structures RX correspondantes (à droite)

Les structures cristallines ont montré la formation de feuillet antiparallèle dans le cas des acides 2,4-disubstitués (**182** et **183**), tandis que le dérivé monosubstitué (**184**) adopte un feuillet parallèle. Les tétramères **185** et **186** cristallisent sous la forme d'une hélice stabilisée par deux liaisons hydrogène C_{10} et C_{12}.

Des dérivés vinyliques de la proline ont été étudiés par l'équipe de Coutrot[113]. Les analyses RMN et les structures cristallines de quatre peptides (Figure 66) ont montré que la configuration *trans* existe en conformation ouverte sans aucune liaison H intramoléculaire. D'autre part, les peptides avec une configuration *cis* adoptent une conformation analogue de coude β (β-turn) stabilisée par des liaisons C_9 et C_{12}.

[113] Coutrot, P.; Grison, C.; Genève, S.; Didierjean, C.; Aubry, A.; Vicherat, A.; Marraud, M. *Lett. Pept. Sci.*, **1997**, *4*, 415.

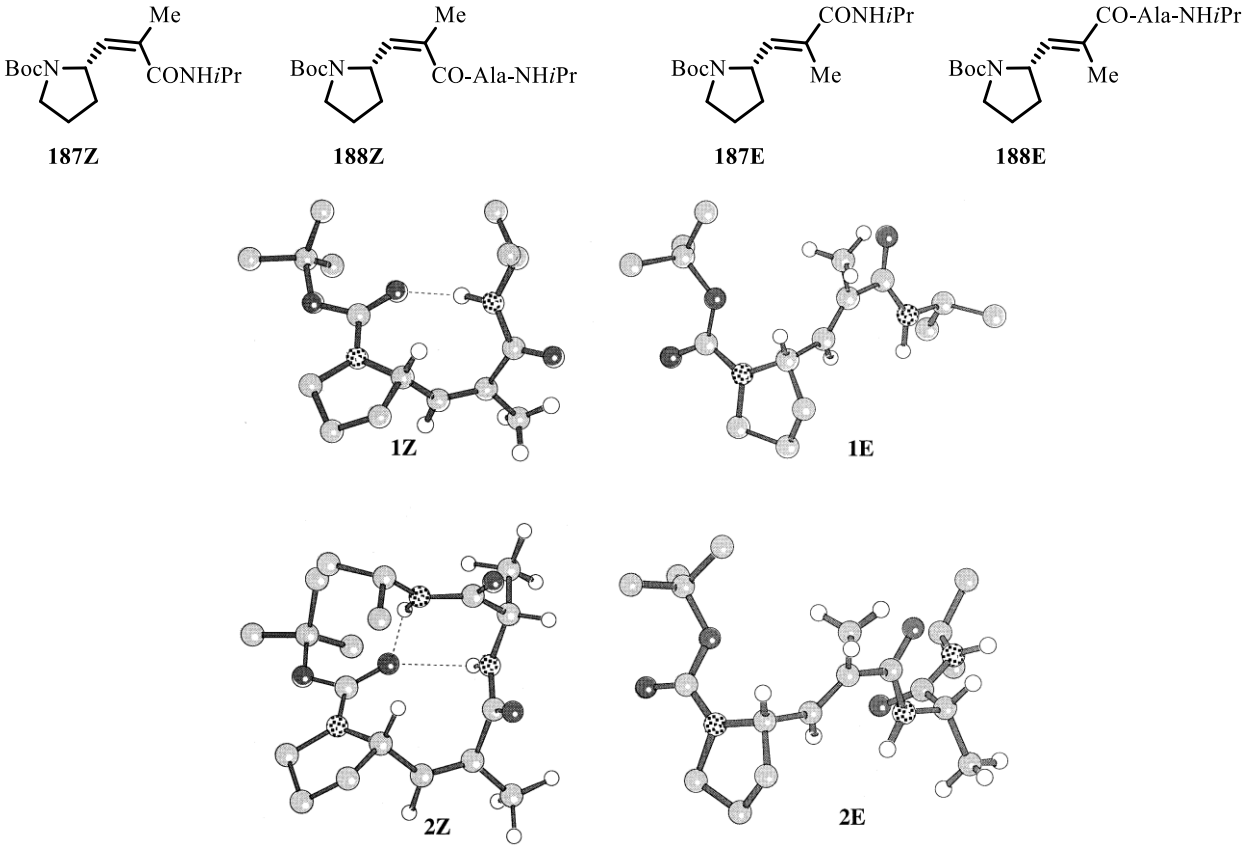


Figure 66 : Structures des amides (187Z et 187E) et des dipeptides (188Z et 188E) (en haut) et structures RX correspondantes (en bas)

Plus tard Grison et al.[114] ont publié des travaux étendus à une série de dérivés vinyliques (aminoamides, dipeptides, tripeptides et dipeptides divinyliques). Le tripeptide **189**, comme dans le cas du dipeptide **188Z** correspondant, adopte une conformation analogue de coude β stabilisée par un cycle à 9 atomes (Figure 67). Il faut remarquer qu'une molécule de dichlorométhane intervient pour créer un pseudocycle à 14 atomes entre les N- et C-terminaux.

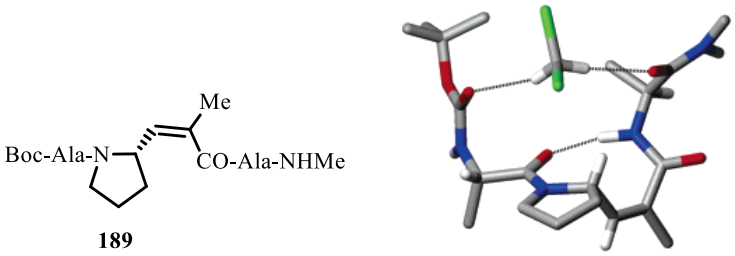


Figure 67 : Pseudocycle à 14 atomes adopté par le tripeptide 189 (à gauche) avec une molécule de dichlorométhane (à droite)

[114] Grison, C.; Coutrot, P.; Genève, S.; Didierjean, C. ; Marraud, M. *J. Org. Chem*. **2005**, *70*, 10753.

Les analyses spectroscopiques ont démontré que le dipeptide divinylique Boc-'Pro^{tr}'-'Ala^{tr}'-NH-*i*Pr **190** existe sous forme étendue en solution, comme c'est le cas pour le dipeptide correspondant. Par contre, le dipeptide divinylique **190** forme deux coudes *cis*-vinylogues avec les liaisons C_9 intramoléculaires (Figure 68).

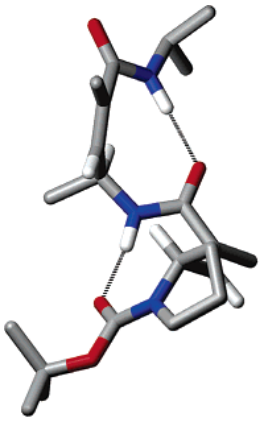


Figure 68 : Deux coudes *cis*-vinylogues stabilisés par des liaisons C_9

3.4.2. Oligomères contenant des β-aminoxypeptides

Les acides β-aminoxy sont des nouveaux analogues d'acides γ-aminés dans lesquels le groupement méthylène en position γ est remplacé par l'atome d'oxygène. Ce changement introduit une rigidification du squelette grâce à la répulsion entre les paires électroniques libres de l'azote et de l'oxygène.

Les premières études structurales sur les acides β-aminoxy ont été publiées par l'équipe de Yang en 2002[115]. Les analyses complètes ont mis en évidence la formation d'une boucle à 9 atomes entre le CO du résidu *i* et le NH du résidu *i*+2. (Figure 69).

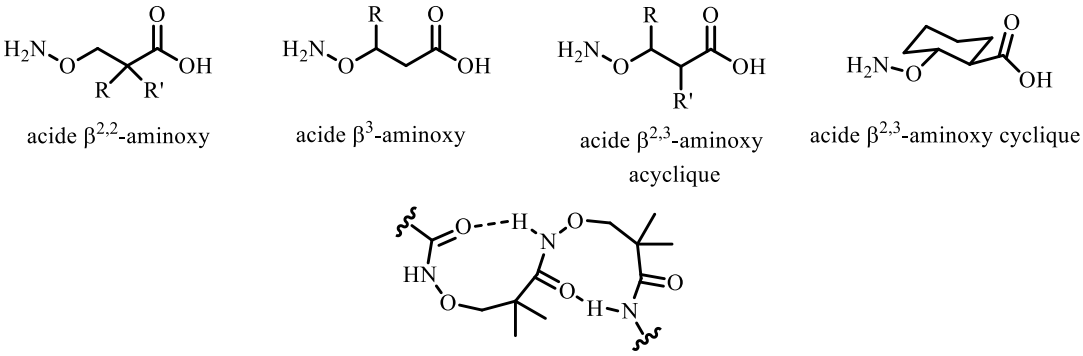


Figure 69 : Structures d'acides β-aminoxy (en haut) et boucles à 9 atomes stabilisées par des liaisons hydrogènes adoptées par les peptides correspondants (en bas)

[115] Yang, D. ; Zhang, Y-H. ; Zhu, N.-Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9966.

La conformation des peptides dépend de la nature des substituants. Les peptides contenant des acides $\beta^{2,2}$-aminoxy[116] adoptent une hélice $1,7_9$, analogue de l'hélice $1,8_8$ trouvée dans les peptides constitués d'acides D-aminoxy. Il faut remarquer que la liaison N-O est en *anti* de la liaison C^{α}-C^{β}. Dans les acides β^3-aminoxy[117] la liaison N-O peut être en *anti* et en *gauche* selon le substituant. Dans le cas d'acides $\beta^{2,3}$- aminoxy[118] acycliques la conformation *gauche* est favorisée par la configuration *syn*. Les acides $\beta^{2,3}$-aminoxy cycliques[119] adoptent une hélice $1,8_9$ avec une conformation *anti* pour la liaison N-O.

3.4.3. Oligomères contenant des oligourées

Les oligourées sont un nouveau type de foldamères contenant des analogues d'acides aminés dans lesquels le groupement méthylène est remplacé par un atome d'azote supplémentaire qui peut apporter des propriétés intéressantes, notamment jouer le rôle de donneur de liaison hydrogène pour stabiliser des structures secondaires.

Les premières travaux sur la synthèse[120] et les études structurales[121] d'oligourées, analogues d'acides γ-aminés, ont été faits par l'équipe de Nowick. Les analyses RMN dans le chloroforme, IR, RX et la modélisation moléculaire ont montré que les oligourées sont capables de créer une liaison hydrogène intramoléculaire à 9 atomes[122] (Figure 66) en adoptant une forme analogue de coude β. Ensuite, l'équipe de Nowick a créé un feuillet β artificiel[123] à partir de l'oligourée **191**, ce qui permet d'attacher des peptides de manière parallèle et de former des feuillets β **192** (Figure 70).

---

[116] Yang, D. ; Zhang, Y-H. ; Zhu, N.-Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9966.
[117] Yang, D. ; Zhang, Y-H. ; Li, B. ; Zhang, D.-W. ; Chan, J. C.-Y. ; Zhu, N.-Y. ; Luo, S.-W. ; Wu, Y.-D. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6956.
[118] Zhang, Y-H. ; Song, K. ; Zhu, N.-Y. ; Yang, D. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 577.
[119] Yang, D.; Zhang, D.-W. ; Hao, Y.; Zhu, N.-Y. ; Luo, S.-W. ; Wu, Y.-D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6719.
[120] Wilson, M. E.; Nowick, J. S. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 6613.
[121] Nowick, J. S.; Powell, N. A.; Martinez, E. J.; Smith, E. M.; Noronha, G. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 3763.
[122] Nowick, J. S.; Abdi, M.; Bellamo, K. A.; Love, J. A.; Martinez, E. J.; Noronha, G.; Smith, E. M.; Ziller, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 89.
[123] Nowick, J. S. *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 287.

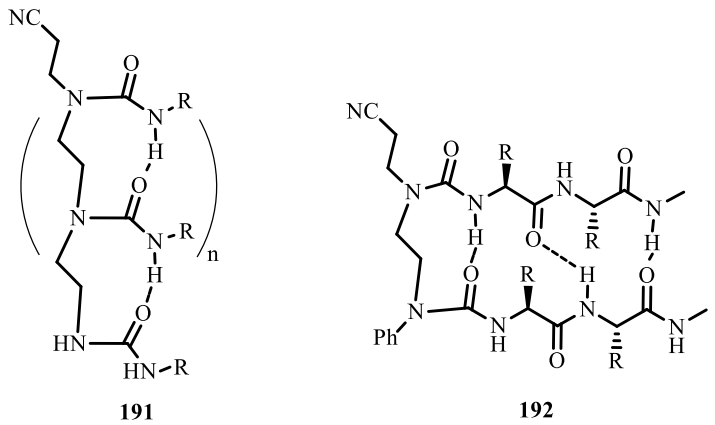


Figure 70 : Structure du peptide 191 (à gauche) et feuillet β adopté par le peptide 192 (à droite)

En 2002, l'équipe de Guichard[124], s'est appuyé sur l'idée que l'azote en α peut fixer l'angle ψ à environ 170-180° et ainsi favoriser la formation d'une hélice 14 (où l'angle ψ est d'environ 140°). Cette étude a été effectuée sur un heptamère **193** (Figure 71) en solution dans la pyridine. Les analyses structurales ont montré que l'oligourée **193** existe sous forme d'hélice-(*P*)-2,$5_{12,14}$[125] stabilisée par des liaisons hydrogènes à trois centres entre le CO du résidu *i* et les NHs des résidus *i*+2 et *i*+3.

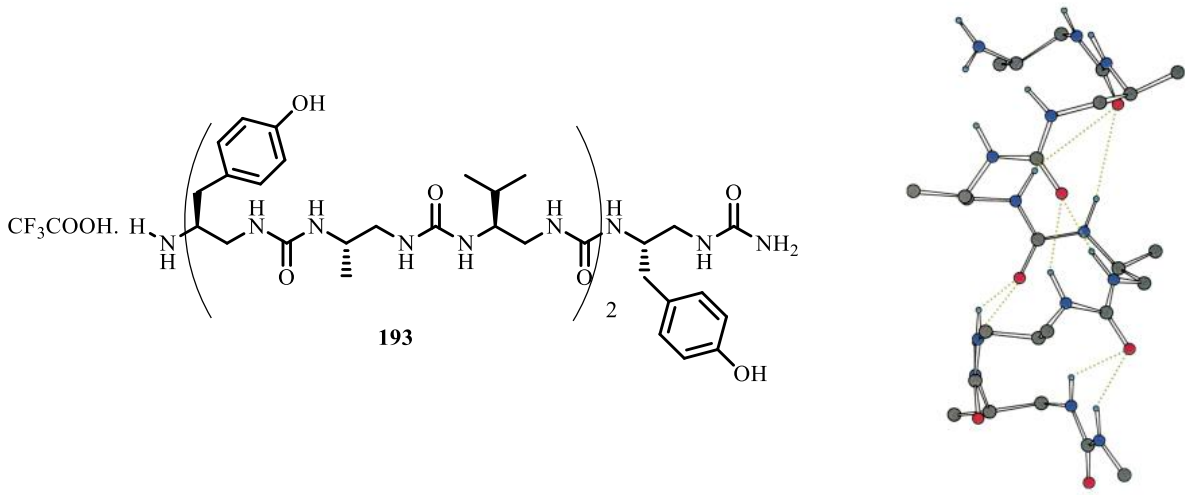


Figure 71 : Structure du peptide 193 (à gauche) et sa structure RX (à droite) en forme d'hélice stabilisée par des liaisons hydrogènes à trois centres

[124] Semetey, V.; Rognan, D. ; Hemmerlin, C.; Graff, R.; Briand, J.-P.; Marraud, M.; Guichard, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1893.
[125] Hemmerlin, C.; Marraud, M.; Rognan, D.; Graff, R.; Semetey, V.; Briand, J.-P.; Guichard, G. *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 3692.

Des études supplémentaires sur l'heptapeptide **193** dans le méthanol ont mis en évidence l'existence d'autres structures secondaires qui sont en échange avec l'hélice 12,14[126]. Ces autres conformations sont probablement dues à une isomérisation partielle *Z-E* de l'urée le long du squelette. Plus tard, des analyses structurales (RMN[127], IR, DC et RX) effectuées sur d'autres oligourées (contenant des dérivés acycliques[128] ou un dérivé de la proline[129]) ont confirmé la formation d'une hélice $2{,}5_{12,14}$. En revanche, le fait d'avoir plusieurs dérivés de la proline[130] ($(Pro^U)_6$ et $(Pro^U)_9$) consécutifs perturbe la structuration hélicoïdale. Ce comportement peut être expliqué par la longueur de la chaîne carbonée insuffisante pour stabiliser la structure, l'isomérisation incontrôlée *cis-trans* et/ou l'agrégation.

En 2013, l'équipe de Guichard a publié des études de stabilité de l'hélice 12,14 comportant dans sa structure un dérivé cyclique[131] (**194** ou **195**), un dérivé avec un *gem*-diméthyle[132] (**196** ou **197**) ou des dérivés isostériques[133] (carbamate **198** ou amide **199**) (Figure 72). Il a été montré que les substituants cyclique ou gem-diméthyle n'influent pas sur la structure secondaire des peptides correspondants et adoptent une hélice 2,5, sauf le composé *trans* **194** qui favorise la formation de conformation *anti*. Dans le cas des dérivés isostériques, la possibilité d'adopter une structure secondaire est plus faible par rapport aux oligourées correspondantes.

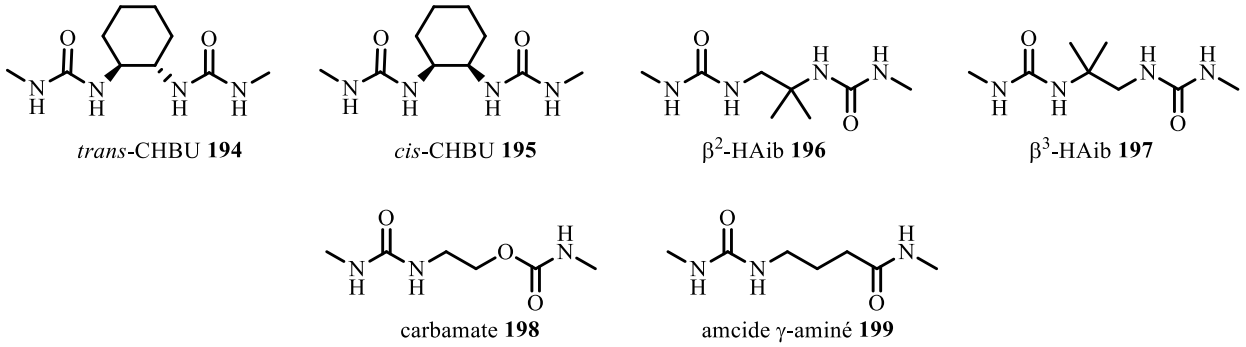


Figure 72 : Divers dérivés d'oligourées

[126] Violette, A.; Averlant-Petit, M. C. ; Sementey, V. ; Hemmerlin, C. ; Casimir, R. ; Graff, R. ; Marraud, M. ; Briand, J. – P. ; Rognan, D. ; Guichard, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2156.
[127] Guichard, G. ; Violette, A. ; Chassaing, G. ; Miclet, E. *Magn. Reson. Chem*. **2008**, *46*, 918.
[128] Fisher, L.; Claudon, P.; Pendem, N.; Miclet, E.; Didierjean, C.; Ennifar, E.; Guichard, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1067.
[129] Fremaux, J.; Fiscer, L.; Arbogast, T.; Kauffmann, B.; Guichard, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11382.
[130] Fremaux, J.; Kauffmann, B.; Guichard, G. *J. Org. Chem.*, **2014**, *79*, 5494.
[131] Pendem, N.; Douat, C.; Claudon, P.; Laguerre, M.; Castano, S.; Desbat, B.; Cavagnat, D.; Ennifar, E.; Kauffmann, B.; Guichard, G. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 4884.
[132] Fremaux, J.; Dolain, C.; Kauffmann, B.; Clayden, J.; Guichard, G. *Chem. Comm.*, **2013**, *49*, 7415.
[133] Pendem, N.; Nelli, Y. R.; Douat, C.; Fischer, L.; Laguerre, M.; Ennifar, E.; Kauffmann, B.; Guichard, G. *J. Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4147.

3.5. Oligomères contenant des amides tertiaires

En 2000, Guarna et coll. [134] ont publié une étude sur une série de peptides courts (jusqu'à 5 résidus) contenant l'acide (1*R*, 7*R*)-3-aza-6,8-dioxabicyclo[3.2.1]octane-7-carboxylique (BTG) (Figure 73).

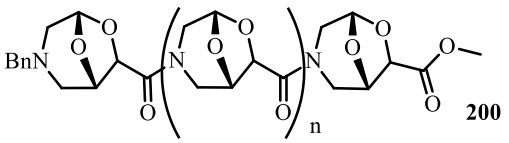


Figure 69 : Structure générale du peptide 200 comportant l'acide (1R, 7R)-3-aza-6,8-dioxabicyclo[3.2.1]octane-7-carboxylique (BTG).

Ce composé, constitué d'un amide tertiaire, ne possède aucun NH pouvant stabiliser une structure secondaire. Néanmoins le dichroïsme circulaire des oligomères étudiés présente des bandes intenses signifiant une structuration en solution. Ce phénomène peut être expliqué par la restriction conformationnelle autour de la liaison amide (isomérisation *s-cis/s-trans*).

3.6. Activité biologique

Les séquences présentant des acides non-naturels dans des peptides hybrides, notamment les acides β- ou γ-aminés, ne peuvent pas être identifiées par les enzymes, ce qui fait qu'ils sont très résistants à l'action de différentes peptidases[119]. Cette propriété est importante dans le domaine de la chimie médicinale pour élaborer de nouveaux médicaments. Cependant, très peu d'études sur l'activité biologique des γ-peptides ont été réalisées jusqu'à maintenant.

L'équipe de Seebach a étudié l'activité peptidomimétique d'une série de γ-dipeptides avec la chaîne du tryptophane en position 2 du premier acide et la chaîne de la lysine en position 4 du deuxième acide γ-aminé. Plusieurs peptides de cette série ont montré une affinité submicromolaire[135] pour les récepteurs de la somatostatine. La somatostatine est une hormone peptidique, comportant 14 acides aminés, qui inhibe la libération de l'hormone de croissance Somatotropine.

De plus, les peptides, composés d'acides γ-aminés, possèdent une autre activité biologique intéressante, notamment la capacité de traverser les membranes cellulaires et de pénétrer à l'intérieur des cellules (CCPs : **C**ell **P**enetrating **P**eptides)[136]. Cette propriété est très importante dans l'étude de nouveaux transporteurs de biomolécules. Certains oligomères de *cis*-γ-amino-L-proline fonctionnalisés en position α, étudiés par l'équipe de Royo[137], sont capables de pénétrer différentes lignées de cellules

[134] Machetti, F. ; Ferrali, A. ; Menchi, G. ; Occhiato, E. G. ; Guarna, A. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3987.
[135] Seebach, D. ; Schaeffer, L. ; Meinrad, B. ; Hoyer, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 776.
[136] Lundberg, P. ; Langel, Ü. *J. Mol. Recognit*. **2003**, *16*, 227.
[137] Farrera-Sinfreu, J.; Giralt, E. ; Castel, S. ; Albericio, F. ; Royo, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9459.

via un mécanisme d'endocytose. De plus ils présentent plusieurs avantages par rapport aux CPPs existants (par exemple le peptide TAT[138]) comme une toxicité moindre et une résistance élevée aux protéases.

Différentes études ont montré que des oligourées amphiphiles comportant un ou plusieurs acides γ^4-aminés possèdent une forte activité antibactérienne vis-à-vis de bactéries Gram négatives et Gram positives[139]. Enfin, il a été montré que la combinaison des peptides antimicrobiens avec un transporteur, constitué de γ-peptides, peut conduire à un agent très efficace contre des cellules cancérogènes[140].

3.7. Conclusion

Pour conclure, les acides γ-aminés sont des building-blocks importants dans l'élaboration de nouveaux foldamères. Les nouveaux peptides non-naturels contenant ce motif adoptent des structures secondaires différentes et possèdent des propriétés uniques.

Les γ-peptides adoptent une structure secondaire définie beaucoup plus facilement que les peptides créés à partir d'acides α-aminés. Des hélices, feuillets β, coudes γ, présents dans les structures naturelles, peuvent être mimés par des peptides courts contenant des acides γ-aminés.

Les homooligomères constitués uniquement d'acides γ-aminés adoptent en général une structure hélicoïdale, stabilisée par des liaisons hydrogènes à 14 ou à 9 atomes. L'alternance avec des acides α-aminés contraints (Aib ou Gpn) ou naturels conduit à un changement de type d'hélice (l'hélice C_{12} ou $C_{10/12}$). Les peptides courts (αγα) ou (αγγ) existent sous forme d'hélice mixte $C_{12/14}$. Les chercheurs ont mis en évidence d'autres mimes de structures secondaires naturelles (feuillet β, coude γ, etc.) adoptées par des γ-peptides hybrides.

Un grand nombre d'études a été fait depuis une dizaine d'années. Néanmoins, les structures secondaires adoptées par des γ-peptides comportant des hétéroatomes en position α, β ou γ, sont très peu présentes dans la littérature.

Notre laboratoire s'est intéressé à la synthèse et à l'étude structurale de γ-peptides créés à partir des acides β,γ-diaminés présentés dans les chapitres précédents. L'introduction d'un groupement amine supplémentaire pourrait augmenter la solubilité des peptides correspondant dans les solvants protiques (notamment dans l'eau) et jouer comme un donneur ou accepteur (sous forme de carbamate) des liaisons hydrogènes. Dans les paragraphes suivants nous allons présenter la synthèse et les études de la structuration des γ-peptides élaborés auparavant dans notre laboratoire.

---

[138] Schwarze, P. M. ; Dowdy, S. F. *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, *21*, 45.
[139] Claudon, P. ; Violette, A. ; Lamour, K. ; Decossas, M. ; Fournel, S. ; Heurtault, B. ; Godet, J. ; Mély, Y. ; Jamaet-Gregoire, B. ; Averlant-Petit, M. C. ; Briand, J. P. ; Duportail, G. ; Monteil, H. ; Guichard, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1.
[140] Rosés, C.; Carbajo, D.; Sanclimens, G.; Farrera-Sinfreu, J.; Blancafort, A.; Oliveras, G.; Cirac, D. A.; Bardaji, E.; Puig, T.; Planas, M.; Feliu, L.; Albericio, F.; Royo, M. *Tetrahedron*, **2012**, *68*, 4406.

Partie III : Synthèse et études de γ-peptides : Résultats antérieurs du laboratoire

1. Synthèse peptidique

Deux types de synthèse de peptides sont possibles, la synthèse sur support solide et la synthèse en solution, et nous allons les présenter brièvement.

1.1 Synthèse peptidique sur support solide ou SPPS (Solid Phase Peptide Synthesis)[141]

La synthèse sur support solide est la plus commune pour synthétiser des peptides, des acides désoxyribonucléiques et d'autres molécules linéaires. Elle est réalisée sur des polymères contenants un site actif sur lequel, dans le cas de la synthèse peptidique, on accroche le premier acide aminé du peptide à synthétiser. Dès que l'acide est connecté le peptide se fait par itération des étapes de déprotection, activation, couplage et décrochage du peptide de la résine (support solide) à la fin de la synthèse.

L'avantage essentiel de la synthèse sur support solide est la purification facile des intermédiaires et du produit final par simple filtration et lavages car les composés, accrochés sur la résine restent insolubles. L'inconvénient de cette méthode est la caractérisation des produits intermédiaires qui nécessite l'application de tests colorimétriques spécifiques (test de Kaiser, test au TNBS etc)[142,143] pour suivre les étapes de couplage ou de déprotection.

Il existe deux stratégies en synthèse sur support solide. Dans les 2 cas, l'acide activé est accroché à la résine par les fonctions acides.

- La stratégie ''Boc'' : l'azote N-terminal de l'acide aminé est protégé par le groupement *tert*-butyloxycarbonyle (Boc). Le peptide synthétisé peut être décroché par une solution de HF dans un réacteur en téflon. Les résines les plus utilisées sont la résine chlorométhylpolystyrène (Merrifield) et la paraméthylbenzhydrilamine (MBHA).
- La stratégie ''Fmoc'' : l'azote N-terminal de l'acide aminé est protégé par le groupement 9-fluorénylméthyloxycarbonyle (Fmoc). La protection peut être clivée avec une solution de pipéridine. Le décrochage du peptide s'effectue à l'aide de TFA. Les résines les plus couramment utilisées sont Rink Amide ((aminométhyle) polystyrène) et Trityle.

1.2 Synthèse peptidique en solution

La synthèse en solution est une méthode classique permettant d'obtenir des peptides par couplage d'acides aminés N-terminaux avec des acides aminés C-terminaux. La synthèse est facilement contrôlable car les produits obtenus sont caractérisés après chaque étape de la synthèse. La faible

[141] Merrifield, R.B.; *JACS*, **1963**, *85*, 2149.
[142] Kaiser; *Anal. Biochem*, **1970**, *34*, 595.
[143] Hancock; *Anal. Biochem*, **1976**, *71*, 260.

solubilité de certains peptides et la purification après chaque étape peuvent limiter l'utilisation de cette technique.

Nous avons choisi la stratégie de synthèse en solution car cela va nous permettre d'étudier la structuration de nouveaux γ-peptides après chaque étape de synthèse.

Depuis plusieurs années notre équipe s'intéresse au couplage peptidique des acides β,γ-diaminés non-naturels obtenus au sein de notre laboratoire. De nombreux peptides courts (jusqu'à 8 résidus) ont été synthétisés en utilisant la synthèse peptidique en solution ou sur support solide. Certains d'entre eux ont fait l'objet d'études structurales, exposées dans ce paragraphe.

1.3 Synthèse d'homo-oligomères en série cyclique

Dans un premier temps, le couplage peptidique a été effectué avec l'acide β,γ-diaminé cyclique issu de l'acide aspartique. Ce composé possède plusieurs intérêts : une structure cyclique rigide, ce qui limite le nombre de conformations accessibles, et la présence d'un azote en β, ce qui permet de fonctionnaliser cette position et également de jouer sur le caractère hydrophobe/hydrophile du peptide.

La synthèse d'oligomères comportant l'acide **4** a été effectuée sur support solide pour gagner du temps et éviter les éventuels problèmes de solubilité (Schéma 39). D'abord, la résine commerciale 2-chlorotrityle avec un taux de substitution de 1,55 mmol/g a été utilisée pour synthétiser les tétra- et hexamère sous forme de sel de TFA.

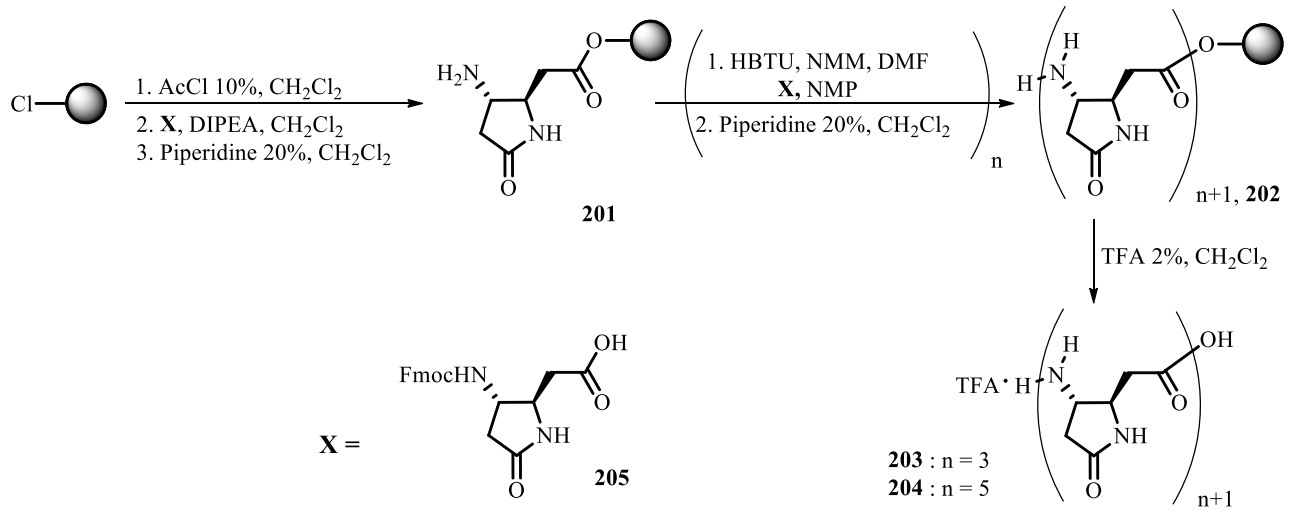


Schéma 39 : Synthèse du tétrapeptide 203 et de l'hexapeptide 204 sur support solide

En début de séquence, la résine a été chlorée pour assurer un taux de substitution correct. Le couplage a été effectué dans des conditions classiques en utilisant du HBTU (4 éq), de la N-méthylmorpholine (4 éq), et **205** (4 éq) dans un mélange de N-méthylpyrrolidone et de diméthylformamide. La présence des groupements amine libre a été vérifiée grâce au test de Kaiser après

chaque étape de couplage. Dans le cas d'un test de Kaiser positif (les billes de la résine sont bleues) la séquence réactionnelle est recommencée. Le décrochage du peptide de la résine a été réalisé avec un mélange de 2% TFA dans le CH_2Cl_2. Les oligomères ont été purifiés par HPLC (RP-C18).

Puis, l'hexamère **210** dont la nature des terminaisons est différente, a été synthétisé en utilisant la résine Rink-amide (Schéma 40). Cette résine permet de remplacer le C_{ter} acide par une fonction amide. De plus, la transformation du $NH_{2\ ter}$ en NH-Acyle donne accès à des liaisons hydrogènes supplémentaires.

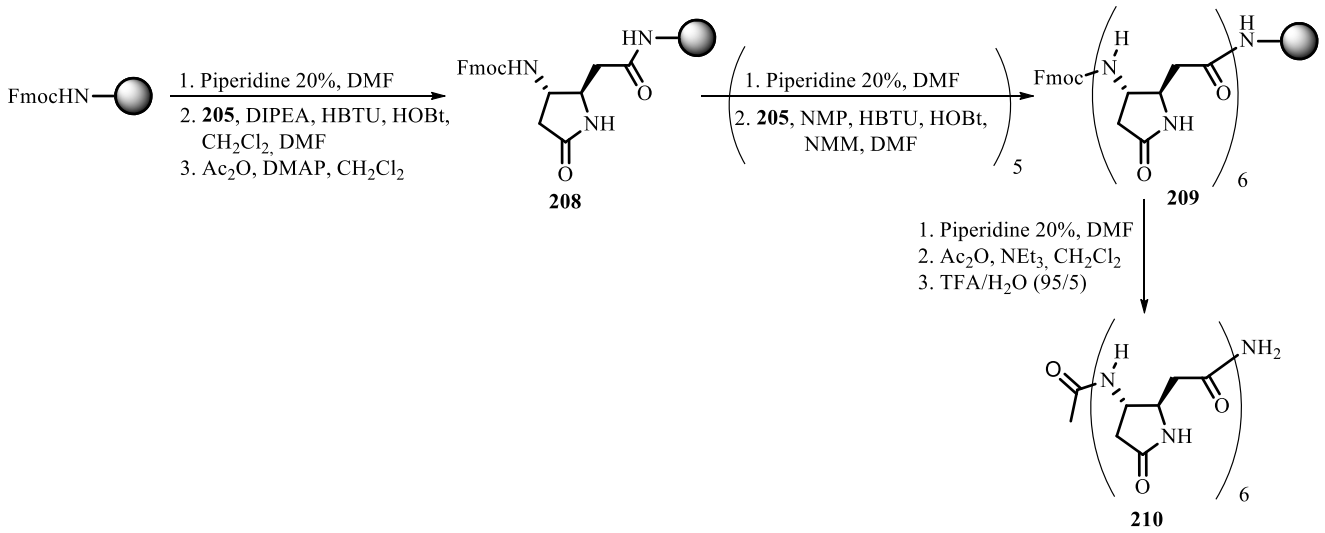
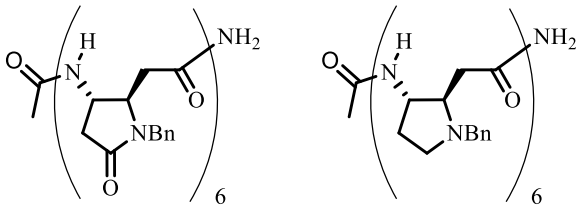


Schéma 40 : Synthèse de l'hexapeptide 210 sur support solide

D'abord, la résine a été déprotégée avec une solution de 20% de pipéridine dans le DMF, puis le premier couplage a été effectué en utilisant les mêmes conditions que dans la synthèse précédente. Après la première étape, la résine a été traitée par de l'anhydride acétique pour bloquer les sites qui n'ont pas réagi. A la fin du couplage, l'oligomère a été acétylé et décroché de la résine avec une solution de TFA/H_2O (95/5).

Deux hexamères **211** et **212** ont également été synthétisés suivant la même séquence, mais en utilisant HATU au lieu de HBTU (Schéma 74). Cet agent de couplage, connu pour être plus puissant, a permis de n'utiliser que 1,5 équivalent d'acide aminé et de raccourcir le temps de réaction jusqu'à 30 minutes au lieu de plusieurs heures.



211 **212**

Figure 74 : Structures de l'hexamère 211 (à gauche) et 212 (à droit)

L'hexamère **212** n'a pas pu être caractérisé par la RMN à cause de spectres mal résolus, probablement dû à la présence de plusieurs conformères.

1.4 Synthèse d'hétéro-oligomères en série cyclique

Plusieurs hétéro-oligomères ont été synthétisés selon la séquence élaborée pour les hexamères **204** et **210** (Figure 75). Ils sont constitués d'une alternance 1 : 1 d'acide α-aminé et d'acide β,γ-diaminé cyclique. La série est obtenue sous forme de sel de TFA.

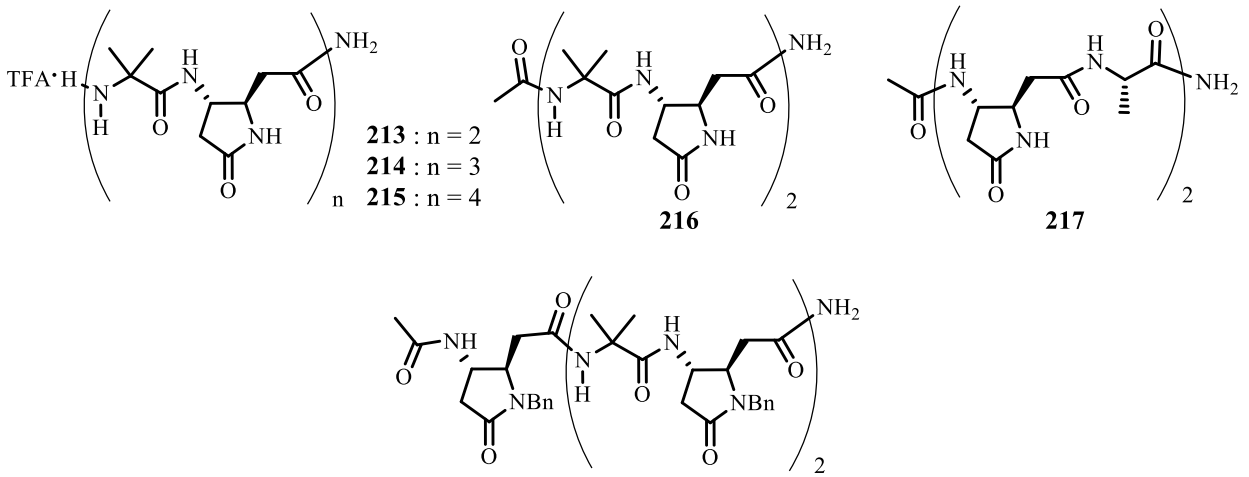


Figure 75 : Structure des peptides hybrides α/γ comportant l'acide β,γ-diaminé cyclique

Dans un premier temps l'Aib (acide aminoisobutirique) a été utilisé car il possède des valeurs d'angles dièdres ϕ et ψ très restreints et favorise la structuration hélicoïdale dans les α-peptides[144]. Puis, la L-alanine a été utilisée pour donner plus de liberté à la chaîne carbonée.

[144] Kaul, R.; Balaral, P. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 105.

1.5 Synthèse d'hétéro-oligomères en série ouverte

Le couplage peptidique en série ouverte a été effectué avec l'acide β,γ-diaminé issu de la L-valine **83b** car sa synthèse a été mise en place à l'échelle de 10 grammes en partant de l'acide aminé naturel correspondant. La synthèse en solution a été choisie à cause de la présence du groupement protecteur Boc en position γ.

Une série de tripeptides α/γ/α a été synthétisée en commençant par le couplage avec la L-valine sous forme d'ester méthylique (Schéma 41). Des conditions classiques ont été utilisées, à savoir HOBt, EDCI et DIPEA dans le DMF[145]. Après la déprotection du Boc avec le TFA dans le dichlorométhane, un second couplage a été effectué avec les acides naturels L-alanine, L-leucine et L-phénylalanine.

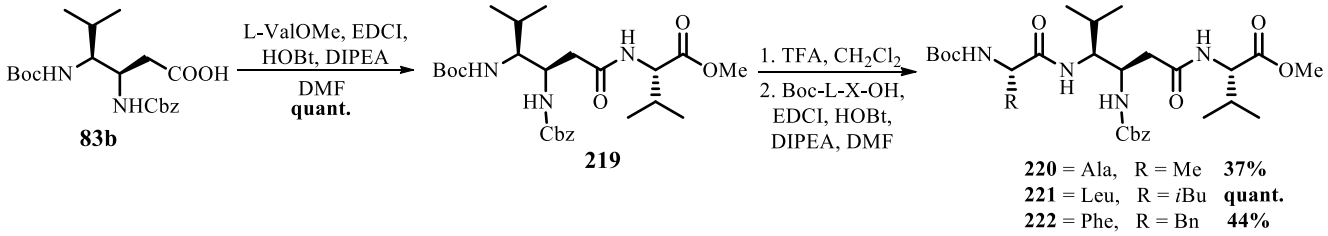


Schéma 41 : Synthèse des tripeptides 200, 221 et 222

Le tripeptide **221** a été obtenu avec un excellent rendement. Dans le cas des tripeptides **220** et **222** la séquence réactionnelle n'a pas été optimisée ce qui explique le rendement faible par rapport au tripeptide précédent. Néanmoins, la quantité obtenue a été suffisante pour réaliser les études structurales décrites dans le paragraphe suivant.

Le pentapeptide **223** et l'octapeptide **224** ont été synthétisés en appliquant la même stratégie de couplage (Figure 75). Les études de structuration n'ont pas abouti à cause de l'insolubilité du produit dans les solvants organiques usuels.

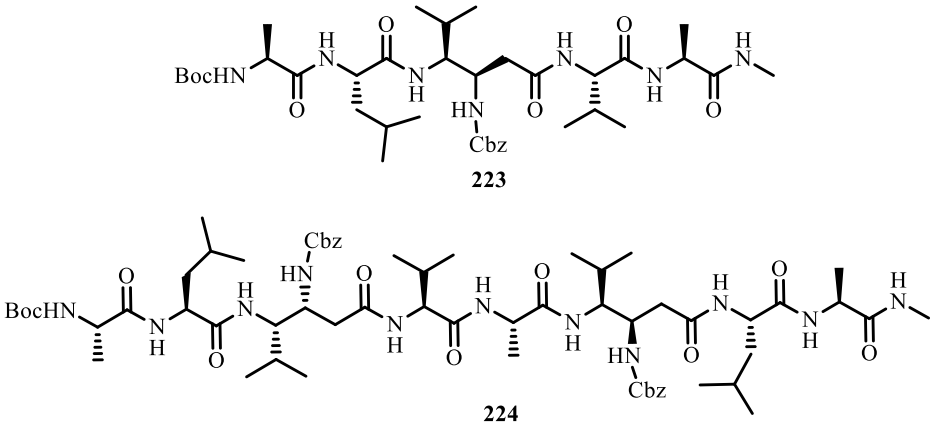


Figure 75 : Structures du pentapeptide 223 et de l'octapeptide 224

[145] Thétiot-Laurent, S.; Bouillère, F.; Baltaze, J.-P.; Brisset, F.; Feytens, D.; Kouklovsky, C.; Miclet, E.; Alezra, V. *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, *10*, 9660.

En même temps, le tétrapeptide alterné γαγα a été synthétisé en utilisant une stratégie de couplage convergente [2+2] (Schéma 42). D'abord, le dipeptide **219** a été synthétisé en utilisant les mêmes conditions. Après avoir déprotégé une partie du dipeptide **219** avec l'acide trifluoroacétique et saponifié l'autre avec du NaOH 4N, les deux fragments ont été couplés pour donner le tétrapeptide **225**.

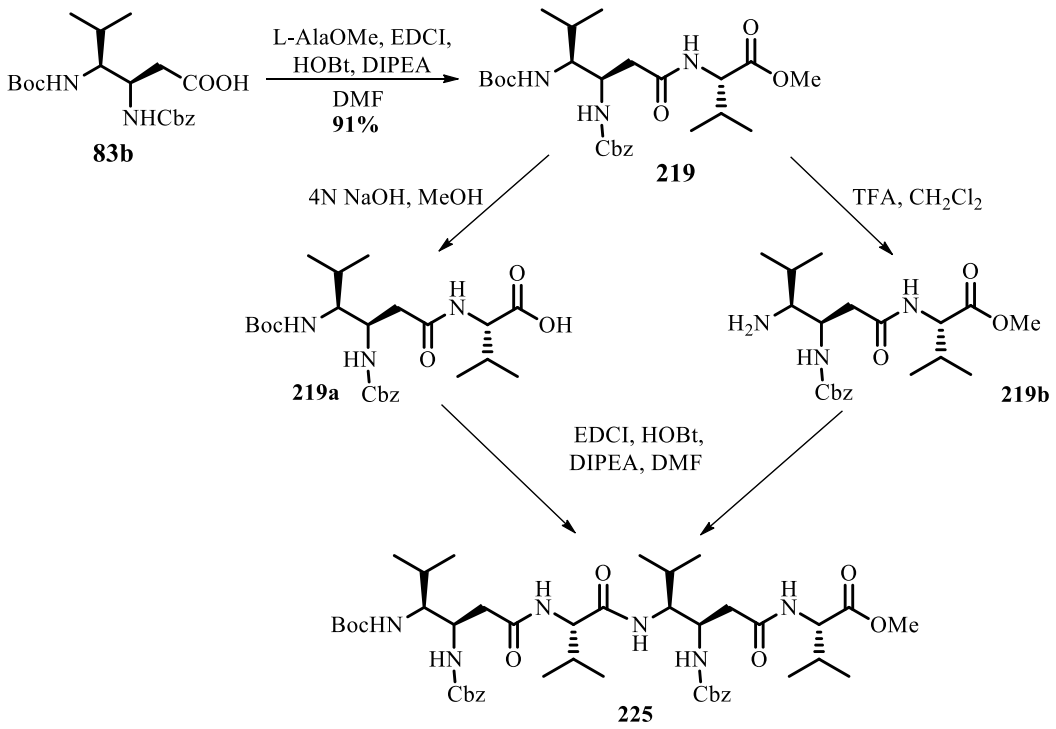


Schéma 42 : Synthèse du tétrapeptide 225

L'insolubilité dans les solvants organiques usuels a rendu difficile la purification du tétrapeptide **225** synthétisé et l'élongation de la chaîne peptidique a été abandonnée. Le rendement n'a pas été calculé.

2. Etudes structurales des peptides synthétisés

2.1 Etudes structurales d'homo-oligomères en série cyclique

Les premières études structurales ont été effectuées sur le tétramère **203** (Figure 77) constitué de la répétition de l'acide β,γ-diaminé cyclique issu de la série acide aspartique. A cause de l'azote supplémentaire en position β et des terminaisons, qui donnent un caractère hydrophile au peptide, les spectres RMN ont été enregistrés dans l'eau.

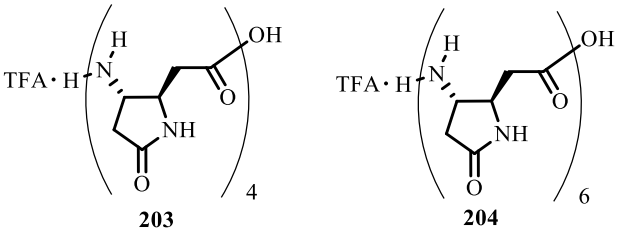


Figure 77 : Structures du tétrapeptide 203 et de l'hexapeptide 204

Après avoir analysé les spectres RMN obtenus, aucun signe de structuration n'a pu être observé :

- Les déplacements chimiques des protons correspondant à une même fonction sont très proches. Dans le cas d'une structuration nous devons observer un éclatement de déplacement assez important à cause de l'anisotropie magnétique sensible, même dans un motif identique.
- Les écarts diastéréotopiques sont faibles (0.2 ppm maximum) pour les fonctions méthylènes, ce qui indique une forte mobilité de la chaîne peptidique.
- Les valeurs des constantes de couplage correspondent à des ^3J moyennes sur l'ensemble des angles dièdres (^3J (HN, H-Cγ) = 7-7.5 Hz).
- Les couplages ^3J (HN, Cβ) ne sont pas observés sur le spectre HMBC. Les faibles valeurs des constantes de couplage hétéronucléaires ^3J pour ces NH sont probablement dues à la mobilité du squelette.
- De plus, aucune tâche de corrélation de moyenne ou longue distance n'a été observée sur le spectre NOESY.

En conclusion, d'après les résultats obtenus en analyse RMN nous avons pu constater que le tétrapeptide **203** ne se structure pas dans l'eau.

L'hexamère **204** (Figure 77) a également été étudié afin de voir l'influence de l'allongement de la chaîne peptidique. Cependant, les mêmes caractéristiques sont observées sur son spectre RMN non seulement dans l'eau, mais aussi dans le CD_3OH, DMSO-d_6 et la pyridine-d_5. Les résultats obtenus laissent penser que l'hexamère **204**, comme le tétramère **203**, n'adopte pas de structuration définie.

Les hexapeptides **210** et **211** protégés par un groupement acyle ont été synthétisés pour pouvoir faire des études dans les solvants moins polaires (Figure 78). Cependant, l'hexamère **210** n'est que partiellement soluble que dans l'eau et le DMSO-d_6. Les études RMN réalisées ont montré qu'il n'y a probablement pas de structuration.

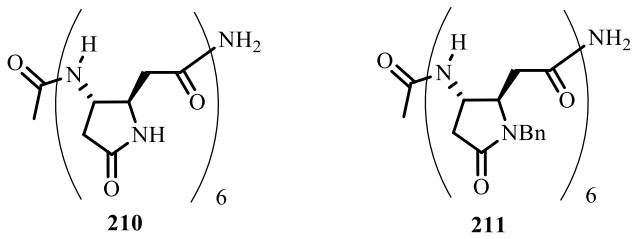


Figure 78 : Structures de l'hexapeptide 210 et l'hexapeptide 211

L'hexapeptide **211** est bien soluble dans les solvants deutérés usuels, mais un léger éclatement des déplacements chimiques a été observé seulement dans la pyridine-d_6. Des expériences NOESY avec différents temps de mélange n'ont pas donné de résultats convaincants quant à la structuration de l'hexapeptide **211**.

2.2 Etudes structurales d'hétéro-oligomères en série cyclique

Des études RMN exhaustives ont été réalisées sur une série d'hétéro-oligomères ; un tétra- **213**, un hexa- **214** et un octapeptides **215** sont présentés sur la Figure 79[146] :

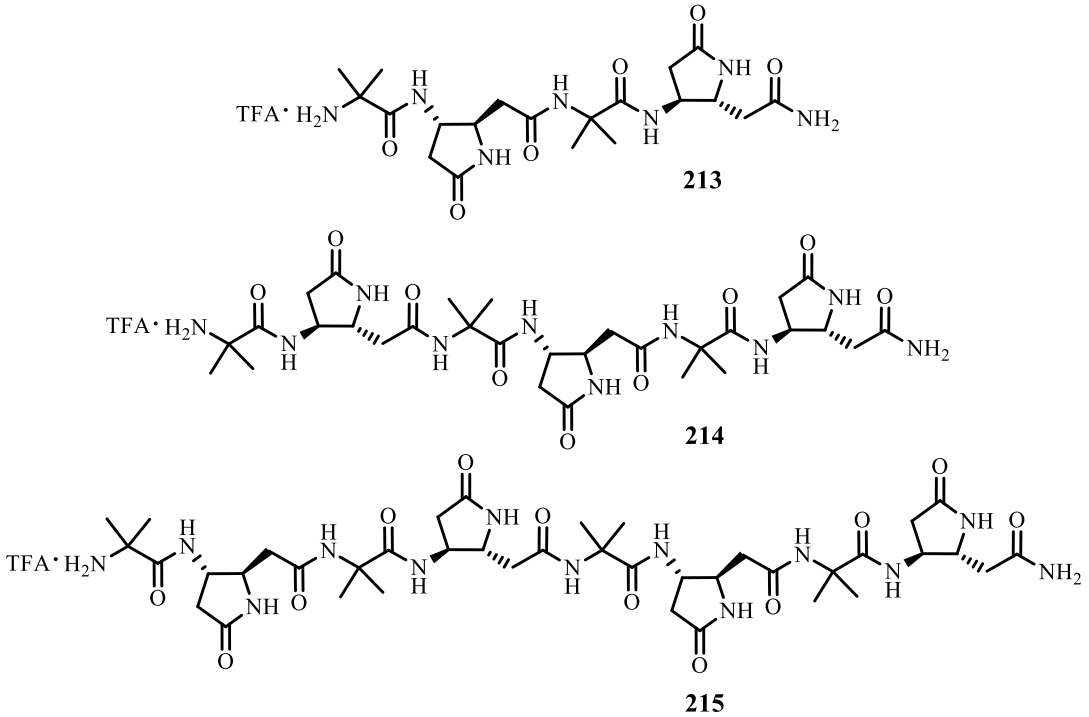


Figure 79 : Structure du tétrapeptide 213, de l'hexapeptide 214 et de l'octapeptide 215

[146] F. Bouillère, D. Feytens, D. Gori, R. Guillot, C. Kouklovsky, E. Miclet, V. Alezra *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 1982.

Une batterie d'analyses RMN (HSQC, TOCSY, ROESY, CH_2-TROSY)[147] a été effectuée afin d'attribuer les protons de tous les résidus à 298K. La séquence CH_2-TROSY, optimisée par le docteur Emeric Miclet, est une analyse qui permet de supprimer la constante de couplage géminale $^2J_{HH}$, ce qui simplifie le spectre et facilite l'extraction des constantes ^3J. Ces dernières donnent des informations sur les angles dièdres (courbes de Karplus).

L'influence de la concentration (1-20 mM) ainsi que la variation de la température (entre 293K et 321K) sur les déplacements chimiques des protons ont également été étudiées. L'ensemble des données obtenues n'indique ni l'agrégation des peptides, ni la présence de liaisons hydrogènes intermoléculaires.

Ensuite, les spectres ROESY ont été analysés en détail. Les tâches de corrélations NOE extraites ont été utilisées dans des calculs de dynamique moléculaire sous contraintes. Ces calculs ont été effectués sur le logiciel DYNAMO 2.1[148]. Au cours du recuit simulé, les 10 structures de plus basse énergie ont été obtenues.

Nous pouvons constater que les trois peptides étudiés adoptent une structure secondaire étendue sans aucune liaison hydrogène (Figure 80). La superposition des trois peptides montre que cette conformation est stable à partir de seulement 4 résidus. (Figure 81).

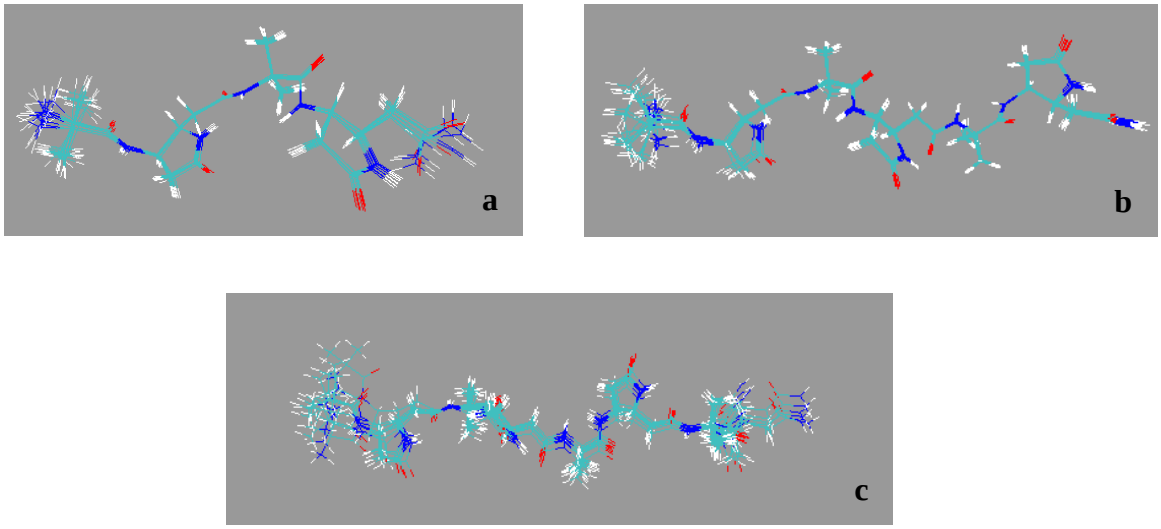


Figure 80 : 10 structures de plus basse énergie obtenues au cours du recuit simulé pour : le tétramère 213 (a), l'hexamère 214 (b) et l'octamère 215 (c)

[147] Guichard, G.; Violette, A.; Chassaing, G.; Miclet, E. *Magn. Reson. Chem.* **2008**, *46*, 918.
[148] Delaglio, F.; Dynamo NMR molecular structure engine, version 2.1, http.//spin.niddk.nih.gov/NMRPipe/dynamo/

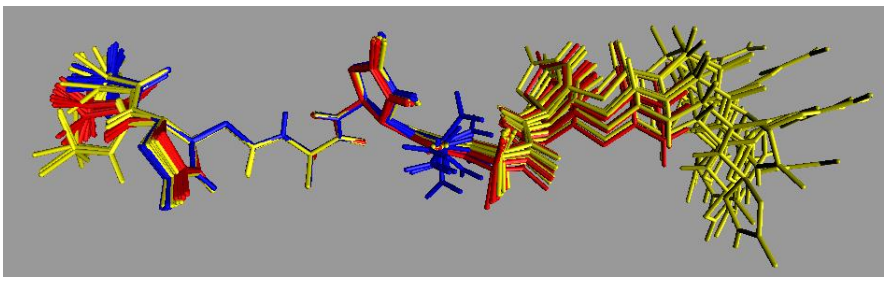


Figure 81 : superposition des structures de plus basse énergie du tétramère 213, de l'hexamère 214 et de l'octamère 215

La structure de plus basse énergie de l'octapeptide est montrée sur la Figure 82. Il s'agit d'une structure hélicoïdale sans liaison hydrogène qui présente un axe de symétrie d'ordre 4 pour les résidus pyrrolidinones.

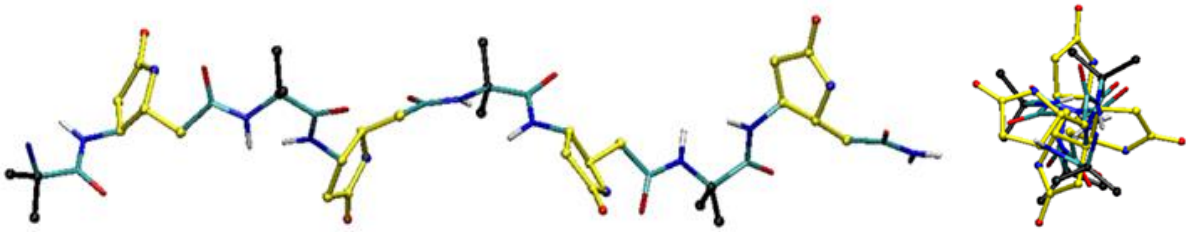
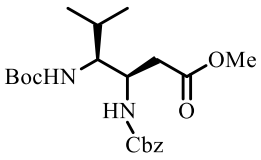


Figure 82 : Structure de plus basse énergie vue de côté (à gauche) et vue de haut (à droite)

2.3 Etudes structurales d'hétéro-oligomères en série ouverte

2.3.1 Etudes structurales de l'acide β,γ-diaminé 87b

Les études structurales en série ouverte ont commencé avec l'acide β,γ-diaminé issu de la L-valine sous forme d'ester méthylique **87b** (Figure 83).



87b

Figure 83 : Acide β,γ-diaminé 87b orthogonalement protégé (configuration *cis*) issu de la L-valine

Les analyses IR ainsi que les spectres du proton dans le $CDCl_3$ et dans le CD_3OD (par échange isotopique avec le deutérium) ont montré que les NH et certains groupements carbonyles sont engagés dans des liaisons hydrogènes intermoléculaires, ce qui fait penser que molécules **87b** s'auto-assemblent de manière ordonnée en solution et à l'état solide.

L'analyse par diffraction RX[149] du monocristal (Figure 84), obtenu par évaporation lente d'une solution dans l'éthanol, révèle un empilement des monomères stabilisé par des liaisons hydrogènes intermoléculaires, empilement qui ressemble à un feuillet β.

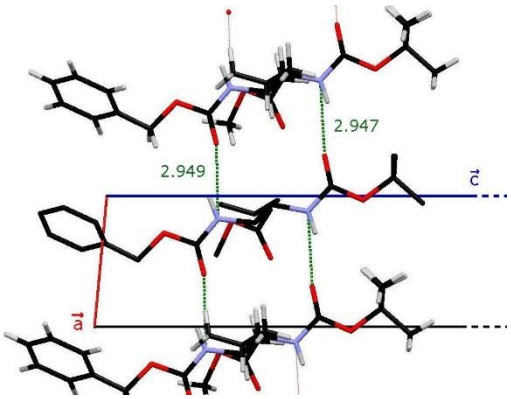
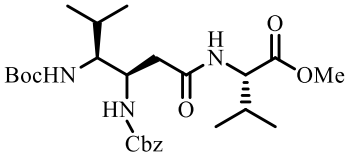


Figure 84 : Structure RX d'acide β,γ-diaminé 87b de configuration *cis* issu de la L-valine

2.3.2 Etudes structurales du dipeptide γ/α 219

Le dipeptide mixte γ/α **219** avec la valine a été synthétisé et sa structuration en solution a été étudiée par RMN et spectroscopie infra rouge (Figure 85).

Le spectre IR a été enregistré à 5mM dans le dichlorométhane pour éviter la formation de liaisons hydrogènes intermoléculaires. Les deux bandes observées à 3423 cm^{-1} et 3291 cm^{-1} correspondent respectivement aux protons amides non liés et liés par liaison H.



219

Figure 85 : Dipeptide 219

Le dosage DMSO[150] du dipeptide a montré que les déplacements d'un seul hydrogène de type amide ne varient pas (Figure 86). Cette observation indique que le NH valine est impliqué dans la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire.

[149] Thétiot-Laurent, S.; Bouillère, F.; Baltaze, J.-P.; Brisset, F.; Feytens, D.; Kouklovsky, C.; Miclet, M.; Alezra, V. *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, *10*, 9660.
[150] Copeland, G. T. ; Jarvo, E. R. ; Miller, S. J. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6784.

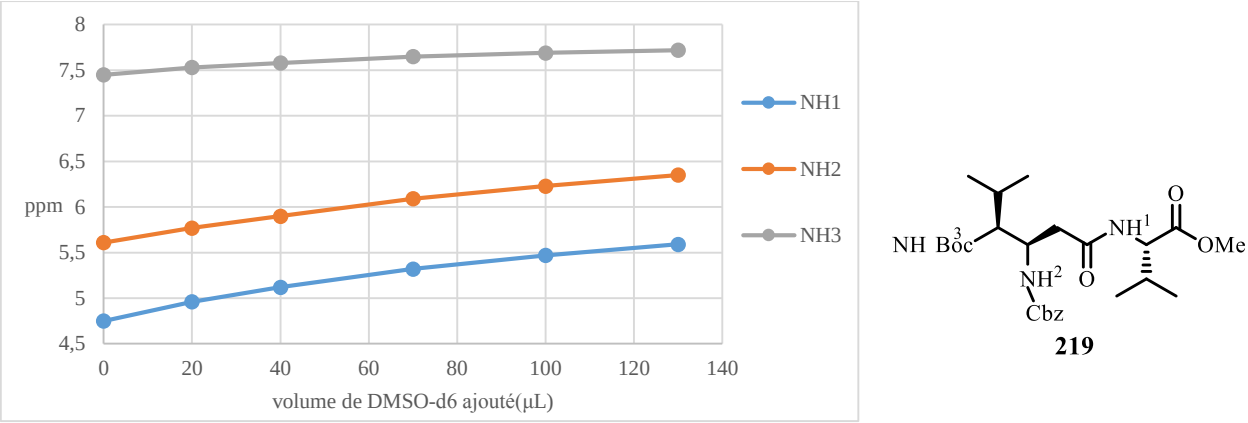


Figure 86 : Dosage DMSO-d_6 du dipeptide 219

Ensuite, une expérience ROESY a été enregistrée dans le $CDCl_3$ et les tâches NOE ont été intégrées pour établir la structuration du dipeptide **219** dans la solution. Deux interactions interrésidus entre le NH de la valine et le NH en γ de l'acide β,γ-diaminé (intensité moyenne) et entre le NH de la valine et le méthyle du Boc (intensité faible) ont été identifiées, ce qui indique la présence possible de liaisons hydrogènes (Figure 87).

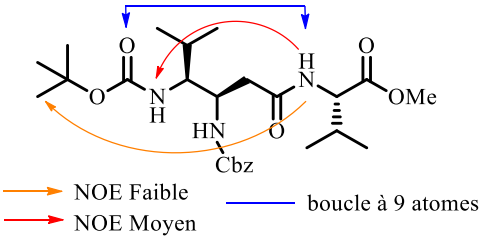


Figure 87 : Représentation de la structure du dipeptide 219 issu du recuit simulé sous contraintes RMN

Les interactions NOE et les constantes de couplages ^3J observées ont été utilisées dans la modélisation moléculaire effectuée à l'aide du logiciel DYNAMO. La structure du dipeptide obtenue prouve l'établissement d'une liaison hydrogène formant une boucle à 9 entre le proton amide de la valine et le carbonyle du Boc (Figure 88).

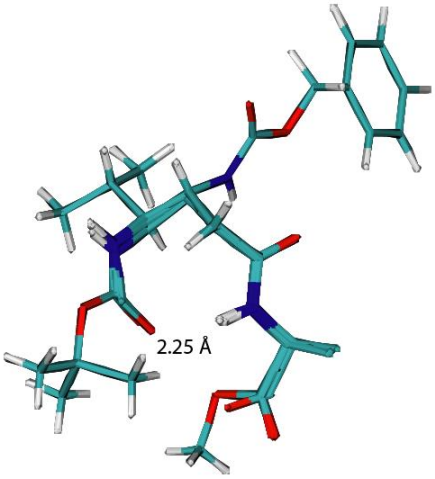
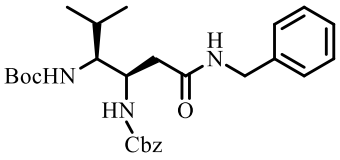


Figure 88 : Superposition des 10 structures de plus basse énergie du dipeptide 219

Ensuite, la valine a été remplacée par la fonction NHBn afin d'étudier l'influence de l'acide aminé sur la structuration du peptide (Figure 89).



225

Figure 89 : Composé 225

Les mêmes démarches d'études structurales par RMN et IR ont été réalisées sur le composé **225**. Le dosage avec le DMSO montre des déplacements chimiques importants vers les champs forts. Le spectre infrarouge à 5 mM indique une bande très faible à 3340 cm^{-1}. Ces deux expériences indiquent que le composé **225** n'adopte pas de conformation stable dans la solution. La présence d'un acide α-aminé est donc importante pour avoir une structuration.

2.3.3 Etudes structurales de tripeptides α/γ/α 220, 221 et 222

Une série de tripeptides[148] a été synthétisée pour explorer l'influence de l'allongement de la chaîne peptidique par le côté N_{ter}. Des études de RMN, de dosage DMSO, d'IR et de modélisation moléculaire ont été effectuées (Figure 90).

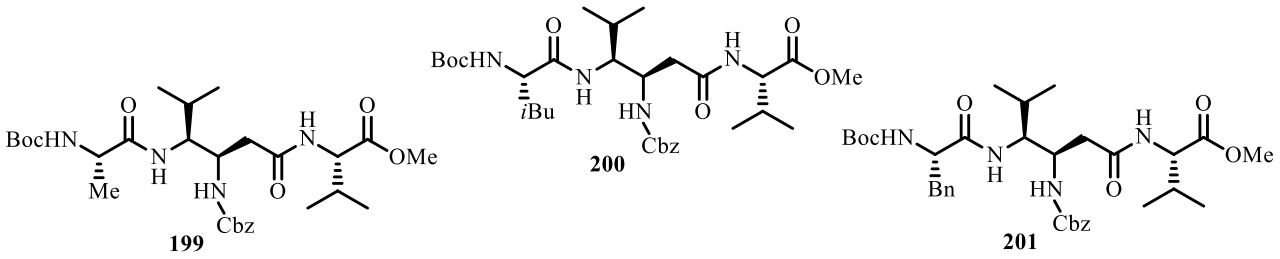


Figure 90 : Tripeptides 220, 221 et 222

Le spectre IR des tripeptides à 5 mM dans le CH_2Cl_2 présente deux bandes vers 3417-3419 cm^{-1} et 3340 cm^{-1} correspondant respectivement aux NH lié et NH non lié par liaison hydrogène.

Le dosage par le DMSO prouve qu'une liaison hydrogène possible peut être établie avec le NH porté par le résidu valine car il résonne à haute fréquence et les déplacements chimiques de ce proton sont peu sensibles à l'ajout du DMSO.

Après avoir analysé les spectres RMN 2D (NOESY, HSQC, TOCSY et HMBC), les tâches NOE (Figure 91) ont été intégrées et converties en distances entre atomes et utilisées dans la modélisation moléculaire à l'aide du programme AMBER.

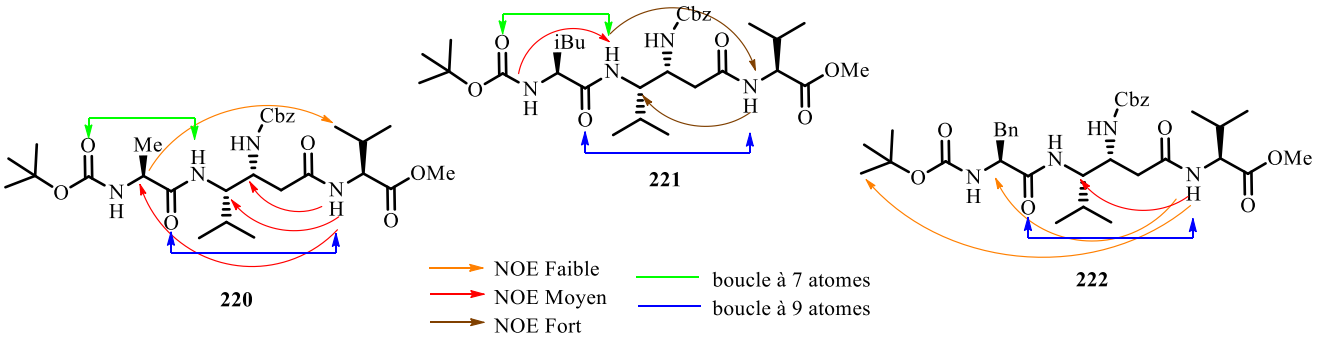


Figure 91 : Représentation de la structure de tripeptide 220 (à gauche), 221 (au centre) et 222 (à droit) issus du recuit simulé sous contraintes RMN

Pour chaque peptide 200 structures ont été calculées. La superposition des 10 structures de plus basse énergie montre la formation de liaisons hydrogènes constituées d'une boucle à 9 atomes et d'une boucle à 7 atomes uniquement dans le cas des tripeptides **220** et **221** (Figure 92).

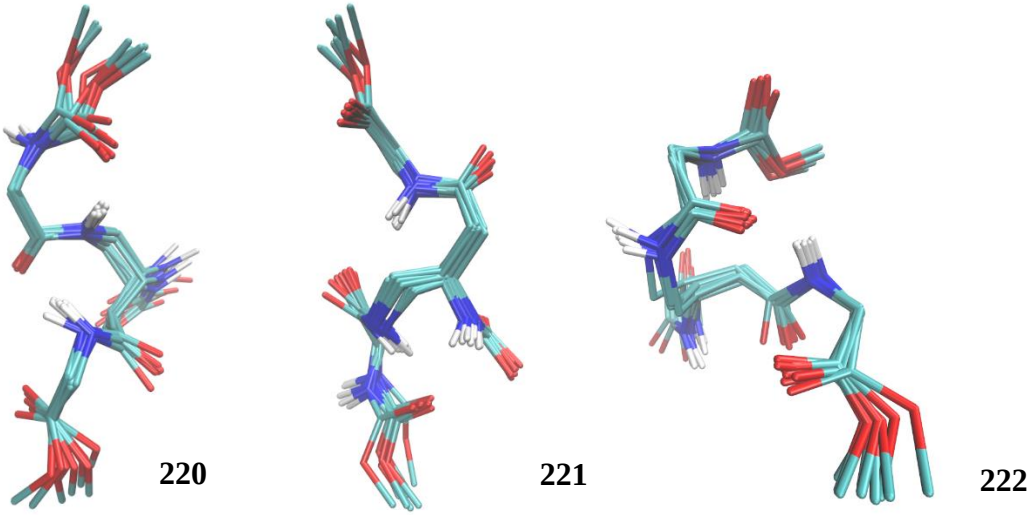


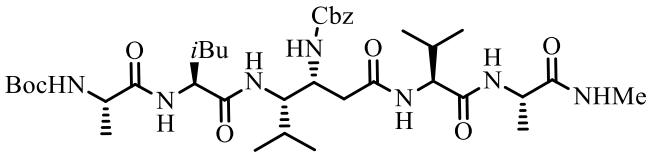
Figure 92 : Superposition des 10 structures de plus basse énergie du tripeptide 220 (à gauche), 221 (au centre) et 222 (à droite)

Les structures obtenues ont été utilisées dans la dynamique moléculaire afin d'étudier leur stabilité. Dans le cas du peptide **220** la boucle C_9 disparait au cours de la dynamique, mais la boucle C_7 est présente 40% du temps. Le peptide **221** montre rarement la présence d'une boucle à 9 atomes, mais la boucle C_7 domine 88% du temps. Dans le cas du tripeptide **222** la boucle à 9 atomes se forme pendant 97% du temps avec parfois une boucle C_7 (24%). Ce phénomène peut être expliqué par l'encombrement stérique du groupement Bn assez important pour induire la formation d'une boucle C_9.[151] La liaison hydrogène est formée entre le CO du résidu *i* et le NH du résidu i+2. Cette boucle peut être considérée comme un mime de coude γ présent dans les peptides naturels, le coude γ étant constitué d'une liaison hydrogène entre le CO du résidu *i* et le NH du résidu *i*+2.

2.3.4 Etudes structurales d'un pentapeptide α/α/γ/α/α

Le tripeptide **221** a été allongé des deux côtés avec un acide aminé supplémentaire. Puis le pentapeptide **223** obtenu a été analysé comme précédemment par dosage au DMSO, analyse RMN et modélisation moléculaire (Figure 93).

[151] (a) Dado, G. P.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 1054; (b) James, W. H.; Buchanan, E. G.; Guo, L.; Gellman, S. H.; Zwier, T. S. *J. Phys. Chem. A.*, **2011**, *115*, 11960.



223

Figure 93 : Pentapeptide 223

Le dosage du pentapeptide par le DMSO montre un faible déplacement chimique des 4 groupements amides et des NH-carbamates de l'acide β,γ-diaminé, ce qui peut être expliqué par la formation de liaisons hydrogènes intramoléculaires (Figure 94).

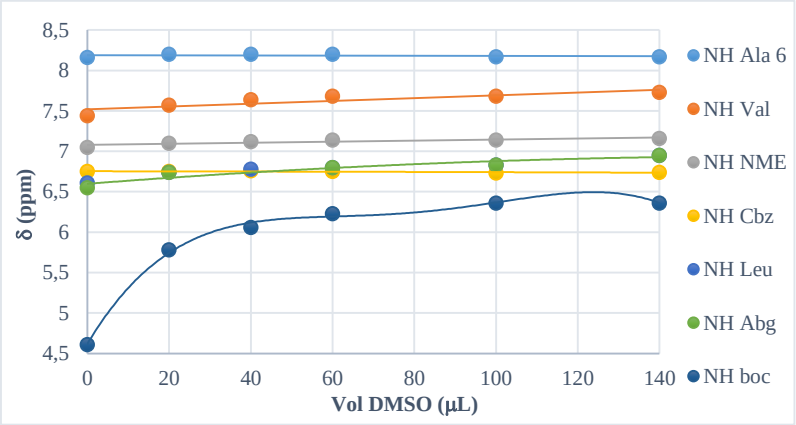


Figure 94 : Dosage DMSO-d_6 du pentapeptide 223

Les analyses RMN ont été effectuées et les tâches NOE obtenues ont été utilisées dans la modélisation moléculaire comme pour les peptides précédents. Le recuit simulé sous contraintes RMN montre la formation d'une structure avec 5 liaisons hydrogènes présentée sur la Figure 95.

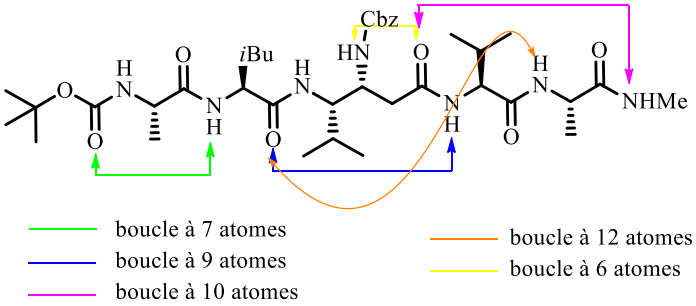


Figure 95 : Représentation de la structure du pentapeptide 223 issu du recuit simulé sous contraintes RMN

Au cours de la dynamique moléculaire à partir de la structure de plus basse énergie deux populations en équilibre (1 : 1) ont été obtenues : hélicoïdale (hélice 10/12) et coude γ (coude C_9) (Figure 96).

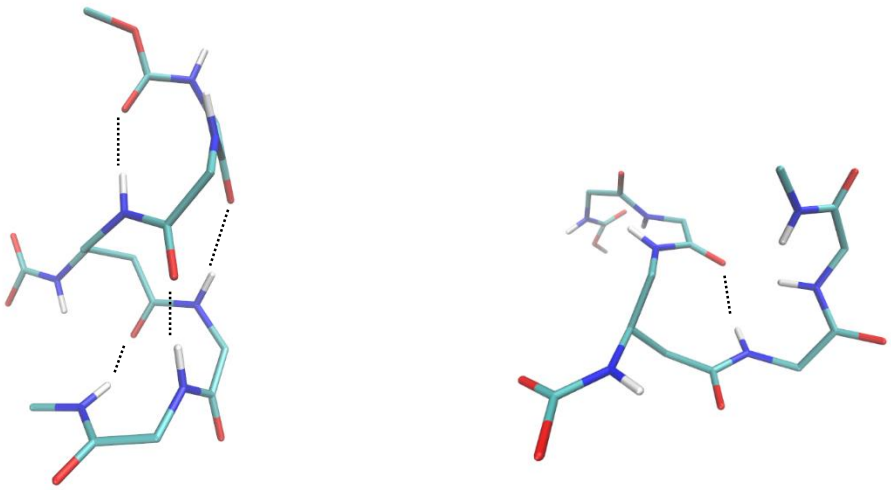


Figure 96 : Hélice 10/12 (à gauche) et coude γ (coude C_9) issus de la dynamique moléculaire (à droite)

3. Conclusion

Plusieurs peptides ont été synthétisés avec un rendement correct dans notre laboratoire en utilisant la synthèse sur support solide ou en solution. La capacité des oligomères obtenus à adopter une conformation stable a été étudiée grâce à la spectrométrie infrarouge, au dosage avec du DMSO-d_6 et aux analyses RMN. La modélisation moléculaire sous contraintes RMN a été ensuite appliquée afin de déterminer les conformations des peptides en solution.

Dans un premier temps, les peptides avec des résidus cycliques issus de l'acide aspartique ont été étudiés. Les études conformationnelles des homooligomères **203** et **204** dans des solvants différents ($CDCl_3$, CD_3OH, pyridine-d_5, et H_2O/D_2O) montrent qu'ils n'adoptent pas de conformation stable en solution.

Les études conformationnelles d'une famille d'hétérooligomères **213**, **214** et **215** constitués de résidus de l'acide cyclique et d'AiB ont été effectuées dans le DMSO-d_6. Ces peptides adoptent une conformation stable hélicoïdale sans aucune liaison hydrogène. Cette hélice étendue présente une symétrie d'ordre 4.

Les peptides en série ouverte avec l'acide β,γ-diaminé issu de la valine ont également montré une structuration intéressante. Les études RMN et la modélisation moléculaire ont mis en évidence la formation d'une boucle à 9 atomes pour les peptides hybrides synthétisés. Cette boucle peut être considérée comme un analogue supérieur d'un coude γ dans les peptides naturels.

Encouragés par les résultats obtenus, nous avons décidé de continuer les études en explorant la structuration des peptides comportant l'acide β,γ-diaminé possédant une conformation relative '*anti*'. Nous avons choisi l'acide β,γ-diaminé issu de la leucine car, comme cela a été mentionné dans la Partie I, les peptides comportant la déoxyaminostatine possèdent une activité biologique intéressante. De plus, la voie de synthèse du diastéréomère '*anti*' a été mise au point contrairement à son analogue issu de la valine (seule la conformation '*syn*' est synthétisée dans l'ancienne stratégie). Les résultats obtenus, ainsi que la modélisation moléculaire des peptides synthétisés sont présentés dans le paragraphe suivant.

Partie IV : Synthèse et études de γ-peptides : Résultats obtenus

1. Synthèse peptidique

La synthèse de nouveaux peptides hybrides avec un acide β,γ-diaminé inséré dans la chaîne des acides α-aminés a été effectuée en solution dans le DMF. Nous avons préféré ce type de synthèse peptidique à la synthèse sur support solide car cela permet d'étudier la structuration après chaque étape d'allongement de la chaîne carbonée. De plus, ni la stratégie « Fmoc », ni la stratégie « Boc » du support solide ne peuvent être utilisées à cause des deux raisons suivantes :

- stratégie « Fmoc » : le groupement Boc en position β de notre acide ne tolère pas la dernière étape du clivage avec la solution de TFA.

- stratégie « Boc » : notre laboratoire ne possède pas le matériel spécial pour cliver le peptide de la résine (clivage effectué avec HF)

Un pentapeptide comportant en troisième position un acide β,γ-diaminé issu de la L-valine avec la configuration *cis* a préalablement été étudié au sein de notre équipe. Au vu des résultats présentés dans le paragraphe précédent, nous avons décidé d'étudier l'influence de la configuration de l'acide β,γ-diaminé clé sur la structuration du pentapeptide.

L'acide β,γ-diaminé *trans* **84c** en série leucine a été couplé avec l'ester méthylique de la L-valine en présence d'agents de couplage classiques, EDCI et HOBt dans le DMF (Schéma 44). Le dipeptide **226** obtenu a été ensuite déprotégé avec du dihydrogène en présence de palladium sur charbon, puis engagé dans le couplage suivant avec la Z-L-leucine. La L-alanine protégée par le groupement Boc a été ajoutée au tripeptide **227** de la même façon. Pour finir la synthèse, le tétrapeptide **228** a été traité avec une solution d'hydroxyde de sodium de 4N dans le méthanol afin de cliver l'ester méthylique et de coupler avec la L-alanine-NHMe. Le pentapeptide **229** désiré a été obtenu avec le rendement total de 20% (non optimisé).

Tous les peptides intermédiaires sont bien solubles dans le dichlorométhane, le chloroforme et le méthanol, et insolubles dans l'eau, l'éther et les solvants apolaires.

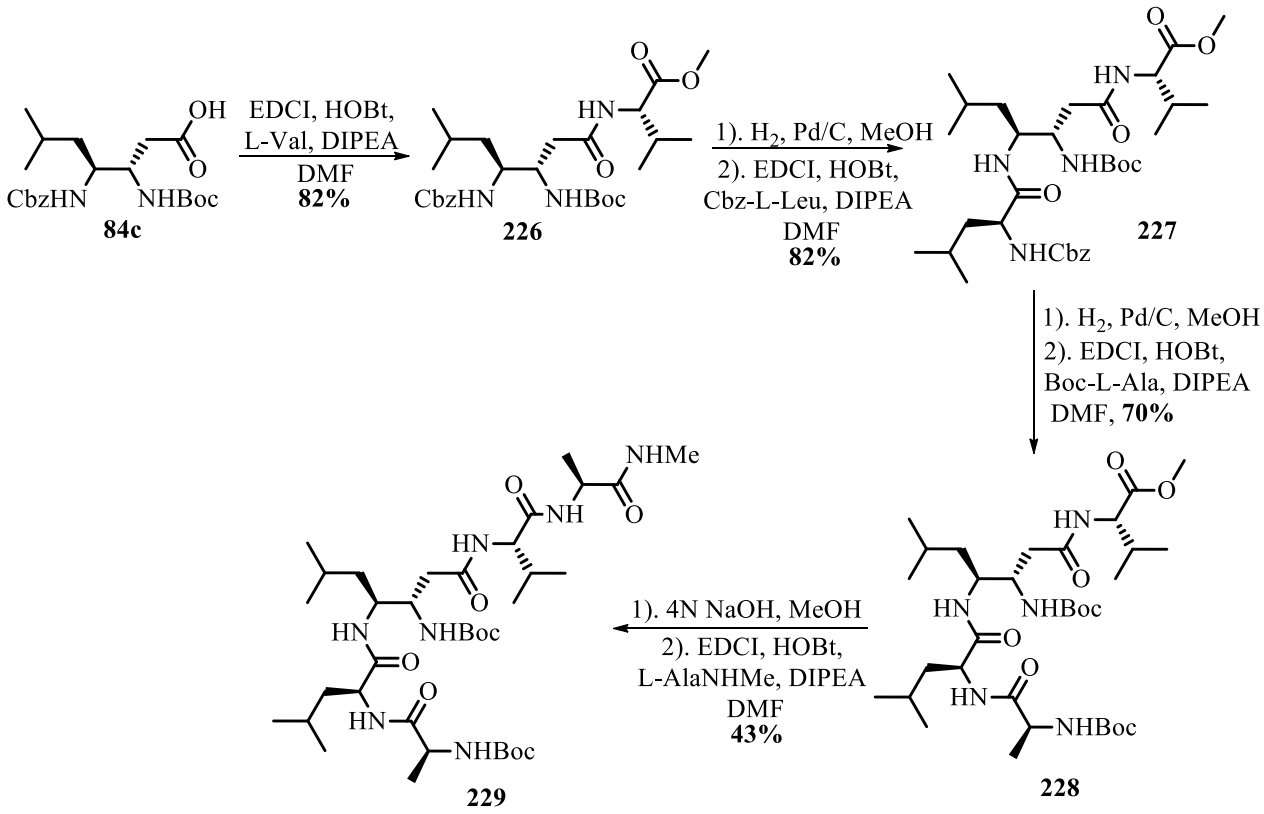


Schéma 44 : Synthèse du pentapeptide 229

La même stratégie a été utilisée pour la synthèse d'un analogue du pentapeptide **229** où les acides D-aminés sont utilisés à la place des acides L-aminés. A cause des faibles rendements après chaque couplage, nous n'avons réussi à obtenir que le tétrapeptide **232** avec un faible rendement global de 24% (Schéma 45).

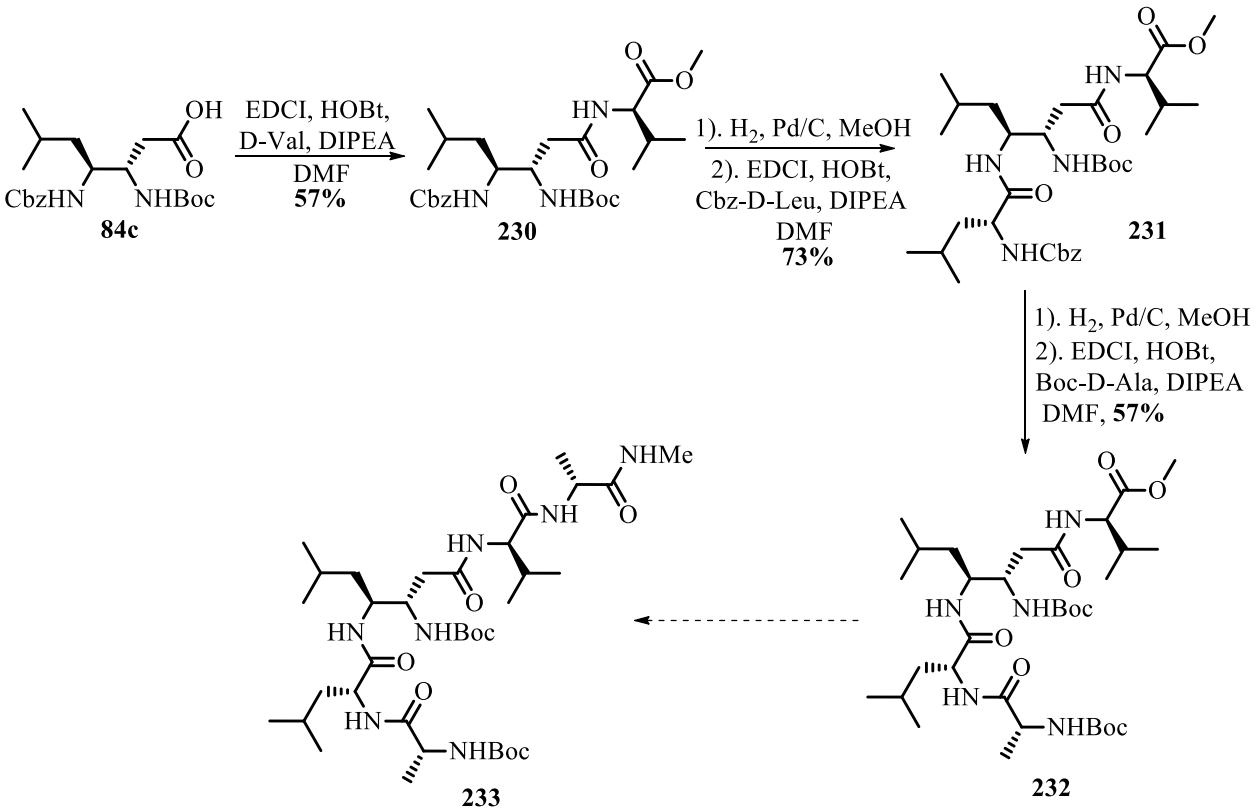


Schéma 45 : Essai de synthèse du pentapeptide 233

Comme nous avons pu le remarquer, la stratégie de synthèse peptidique linéaire [1+1] (où la chaîne est allongée d'un acide aminé par couplage) n'est pas très efficace car demande beaucoup de temps même pour obtenir des peptides courts (à partir de 5 résidus). Il ne faut pas oublier que le rendement baisse après chaque étape de couplage. C'est pourquoi nous avons tenté la stratégie de synthèse convergente [3+2] dans le pentapeptide **233** de série D où le tripeptide H_2N-β,γ-Leu-D-Val-D-Ala-NHMe est couplé avec le dipeptide Boc-D-Ala-D-Leu-OH. Les tentatives effectuées avec les agents de couplages HOBt et HBTU n'ont pas donné de résultats fructueux. Seul HATU, agent de couplage connu pour les couplages difficiles, a permis de réaliser cette synthèse.

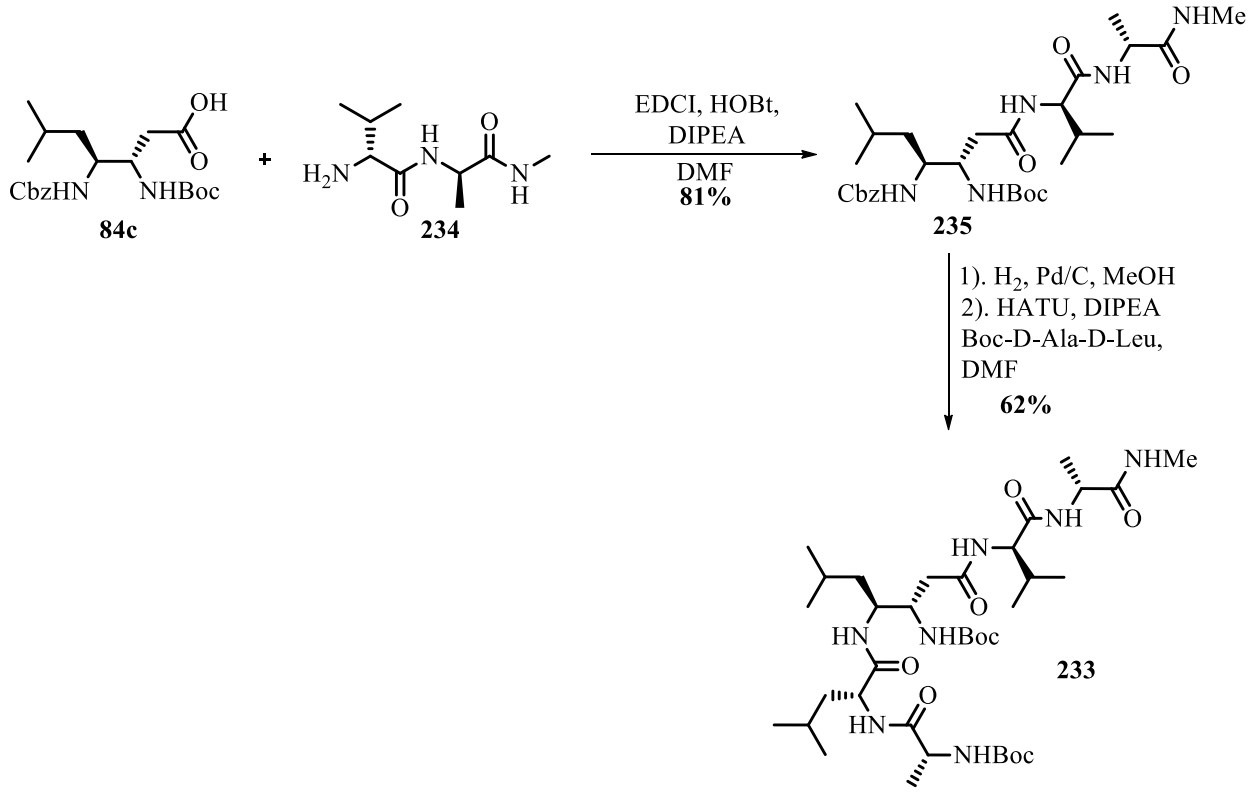


Schéma 46 : Synthèse du pentapeptide 233

Le dipeptide H_2N-D-Val-D-Ala-NHMe a été couplé avec l'acide β,γ-diaminé **84c** (Schéma 46), puis le groupement Cbz a été déprotégé avec du dihydrogène en présence de palladium sur charbon. Ensuite, le tripeptide **235** obtenu a été couplé avec le Boc-D-Ala-D-Leu-OH en utilisant HATU, DIPEA dans le DMF anhydre. Le pentapeptide désiré **233** a été synthétisé en utilisant la stratégie [3+2] avec un rendement global de 50% ce qui est 2 fois plus grand comparé à la stratégie [1+1] dans le pentapeptide comportant les acides α-aminés.

Après avoir obtenu les pentapeptides en série L et série D, nous avons décidé d'allonger la chaîne peptidique par ajout d'une valine du côté N terminal et une leucine du côté C terminal. Pour effectuer cette synthèse nous avons appliqué la stratégie [1+3] et ensuite [4+3]. Cet allongement nous permet d'étudier l'influence des acides α-aminés supplémentaires sur la structuration d'un peptide plus long.

L'acide β,γ-diaminé **84c** a d'abord été couplé avec un tripeptide **236** (dans le cas de la série L) ou **237** (dans le cas de la série D) en utilisant HATU et DIPEA dans le DMF (Schéma 47). Puis, le groupement Cbz a été déprotégé et le tripeptide Boc-Val-Ala-LeuOH (L ou D) a été ajouté dans les mêmes conditions pour conduire à l'heptapeptide **240** ou **241**.

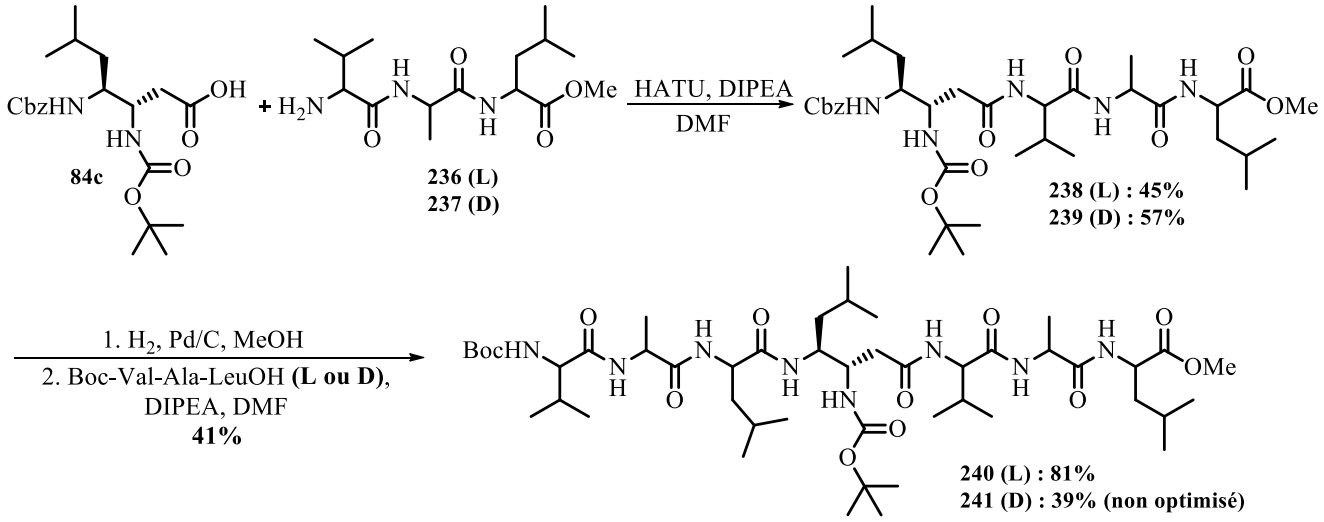


Schéma 47 : Synthèse des heptapeptides 240 et 241

Ensuite, une série d'heptapeptides **242** et **243** comportant deux résidus d'acide β,γ-diaminé en position 3 et 5 ont été préparés afin d'étudier la structuration d'une séquence $(\alpha\alpha\gamma)_2$ (Figure 97). Des difficultés de purification ont été rencontrées à la dernière étape de la synthèse. Ils sont en cours de purification par HPLC semi-préparative en phase inverse.

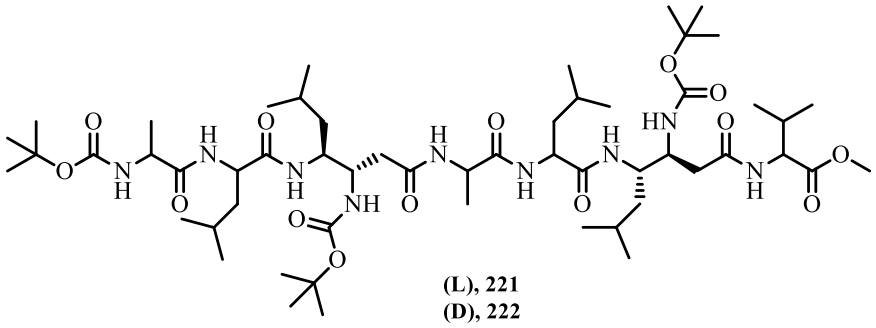


Figure 97 : Heptapetide 242 et 243 comportant respectivement les acides α-aminés L et les acides α-aminés D

En parallèle, une synthèse d'une série d'homooligomères de tailles différentes, comportant uniquement les acides β,γ-diaminés, a été envisagée, mais à cause de la difficulté d'analyse (très probablement due à la présence de plusieurs conformères), les études conformationnelles ont temporairement été abandonnées.

Au cours de ces travaux, nous avons découvert que la plupart de peptides synthétisés forme des gels stables dans les solvants organiques. Le tétrapeptide **228** forme un gel facilement à température ambiante (sans chauffer) dans l'acétate d'éthyle (Figure 98). Il est aussi capable de se gélifier dans les solvants organiques apolaires (comme toluène et cyclohexane à concentration d'environ 40 $mM.L^{-1}$) en

chauffant et laissant la solution se refroidir doucement. Ce gel a été, ensuite, examiné par MEB (microscopie électronique à balayage) (Figure 99). Ces études n'ont pas été poursuivies plus avant.

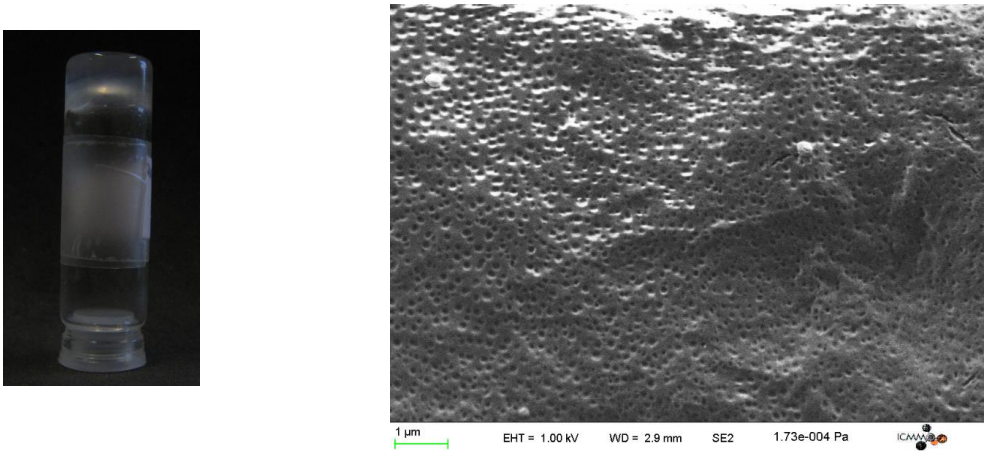


Figure 99 : Gel formé par le tétrapeptide 208 (à gauche) et image MEB du gel (à droite)

2. Etudes conformationnelles des peptides obtenus

2.1 Monomère Cbz-β,γ-Leu-OMe 107c

Dans un premier temps, nous avons étudié le composé **107c** sous forme d'ester méthylique (Figure 100), issu de la L-leucine, afin de déterminer sa structuration à l'état solide et en solution.

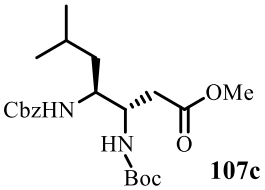


Figure 100 : Acide β,γ-diaminé 107c orthogonalement protégé issu de la L-leucine

Ensuite, le spectre RMN du proton a été enregistré pour étudier la structuration du composé **107c** en solution. Plusieurs jeux de signaux sont présents dans le spectre du proton dans le chloroforme à une concentration élevée (>20 mM) et également dans les solutions dilués (<10 mM). Ce comportement est très probablement dû à l'établissement de liaisons hydrogènes inter- et intramoléculaires. La présence de ces dernières est favorisée grâce à la chaîne carbonée très flexible ce qui facilite l'adoption de différentes conformations dans la solution.

Le spectre ^{1}H du monomère dans le méthanol-*d4* présente un seul jeu de signaux à des concentrations différentes. Il faut remarquer que les déplacements chimiques des protons NH carbamates sont vers les champs faibles et s'échangent rapidement avec le deutérium du méthanol. Cela veut dire que le composé **107c** dans le méthanol-*d4* existe sous forme étendue sans aucune liaison hydrogène.

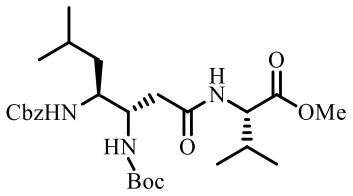
Les résultats obtenus nous laissent penser que le composé **107c** n'adopte aucune structure secondaire bien définie dans le chloroforme, contrairement à son analogue *cis* **87b**. Cependant, les propriétés structurales différentes de son analogue et la facilité avec laquelle ce monomère crée des liaisons hydrogènes pour adopter telle ou telle conformation, présente un intérêt important dans la création de nouveaux foldamères.

2.2 Dipeptide Cbz-β,γ-Leu-Val-OMe 226

Pour étudier les peptides mixtes α/γ, nous avons utilisé la RMN car cette analyse apporte toute l'information nécessaire sur les liaisons hydrogènes présentes dans la molécule ainsi que sur la structuration grâce aux analyses 2D (NOESY et ROESY). L'analyse infrarouge n'a pas été utilisée car le dosage par le DMSO-d_6[152] donne une information plus complète sur tous les NH engagés dans les liaisons hydrogènes.

Nous avons commencé l'étude des peptides par le dimère γ/α **226** comportant l'acide β,γ-diaminé et l'ester méthylique de la L-valine (Tableau X). Le spectre RMN de ce dipeptide dans le chloroforme à une concentration élevée, contrairement au spectre de son analogue de configuration *cis* **219** issu de la valine, présente plusieurs jeux de signaux, ce qui indique la présence soit de différentes conformations, soit de liaisons intermoléculaires. Le spectre RMN du dipeptide **226** à une concentration très diluée (5 mM dans 500 µL de $CDCl_3$) présente un seul jeu de signaux qui peut être expliqué par la disparition des liaisons hydrogènes intermoléculaires. Le spectre RMN dans le méthanol-*d4*, comme dans le cas du monomère, conduit à une seule conformation où les NHs s'échangent assez rapidement avec le deutérium. De plus, les déplacements chimiques (Figure 101) de ces derniers sont plutôt du côté des champs faibles ce qui indique l'absence de liaisons hydrogènes fortes intramoléculaires.

Entrée	NH	δ (ppm)
1	NH-Val	6,6
2	NH-γ	5,8
3	NH-β	6,2



226

Figure 101 : Déplacements chimiques des NH (à gauche) du dipeptide 226 (à droite)

Le monocristal du dipeptide **226** a été obtenu dans un mélange de cyclohexane et d'acétate d'éthyle (8/2). La solution a été chauffée, afin de l'homogénéiser, puis a été refroidie lentement jusqu'à

[152] Copeland, G. T. ; Jarvo, E. R. ; Miller, S. J. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6784.

température ambiante pendant une nuit pour donner des cristaux transparents. Les analyses RX ont montré que le dipeptide **226** cristallise dans le groupe $P2_1$ et dans un système monoclinique (Figure 102).

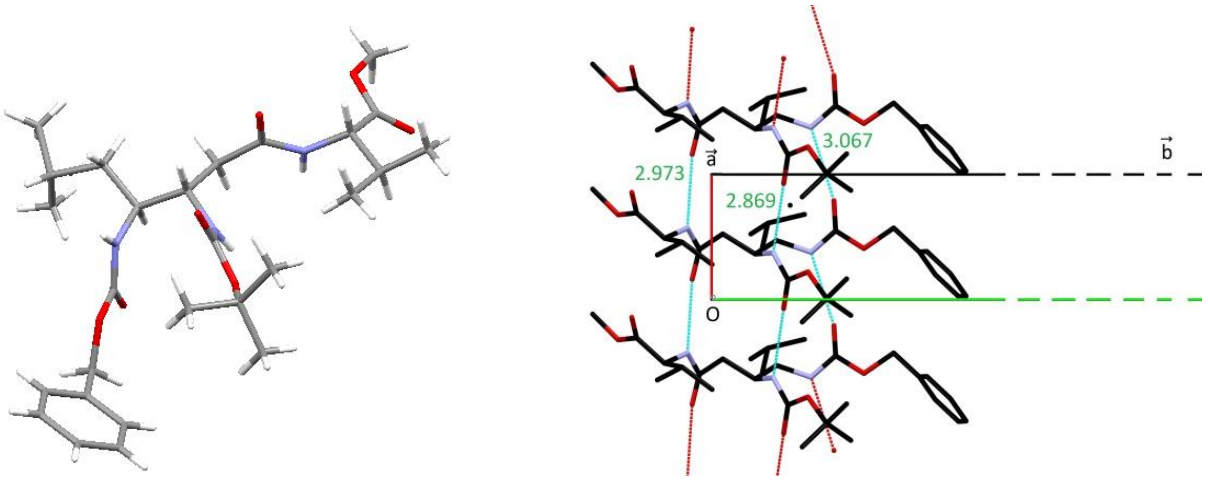


Figure 102 : Structure RX du dipeptide 226 (à gauche) et empilement de plusieurs dipeptides dans une maille de monocristal (à droite)

Le dipeptide **226** existe sous la forme d'un empilement de molécules, stabilisé par des liaisons hydrogènes intermoléculaires. Cet empilement ressemble au feuillet β présent dans les peptides naturels. Les molécules s'autoassemblent parallèlement avec des distances pour les liaisons hydrogènes entre N-H et O=C d'environ 2,10 Å et des angles N-H—O d'environ de 160°.

En conclusion, le dipeptide **226** adopte une forme analogue de feuillet β stabilisée par des liaisons hydrogènes intermoléculaires, ce qui en accord avec les analyses RMN. Ensuite, nous avons voulu étudier l'influence d'un acide α-aminé supplémentaire du côté N_{ter}.

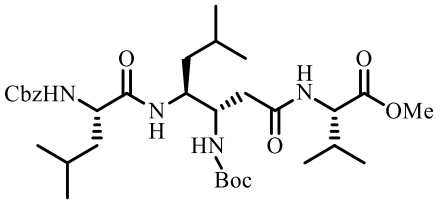
2.3 Tripeptide Cbz-Leu-β,γ-Leu-Val-OMe 227

Le dipeptide **226** a été allongé avec la L-leucine de côté N terminal pour conduire au tripeptide **227**. Ce dernier est bien soluble dans les solvants polaires aprotiques (chloroforme, dichlorométhane) et dans le méthanol, n'est pas soluble dans l'eau et dans l'éther diéthylique.

L'allongement du dipeptide par un acide α-aminé a complétement changé l'allure du spectre ^{1}H. Le spectre proton du tripeptide **227** dans le chloroforme a montré la présence d'une seule conformation, tandis que le dipeptide adoptait plusieurs structures secondaires. Plusieurs observations indiquent la présence d'une structure stabilisée par des liaisons hydrogènes intramoléculaires :

- les déplacements chimiques des protons amides et du NH carbamate en position β sont déplacés vers les champs forts (Figure 103).

Entrée	NH	δ (ppm)
1	NH-Val	7,58
2	NH-γ	7,58
3	NH-β	6,43
4	NH-Leu	5,07



227

Figure 103 : Déplacements chimiques des NH (à gauche) du tripeptide 227 (à droite)

- les protons α des acides naturels et β,γ de l'acide diaminé sont bien éclatés (Figure 104).

- l'écart diastéréotopique des protons de la fonction méthylène de l'acide β,γ-diaminé (CHα-1 et CHα-2) sont importants (0,5 ppm), ce qui indique une rigidité du squelette peptidique (Figure 104).

- les valeurs des constantes de couplage correspondent à des valeurs de structures fixes ($^3J_{HN-HC\beta}$ = 9.6 Hz) (Figure 104).

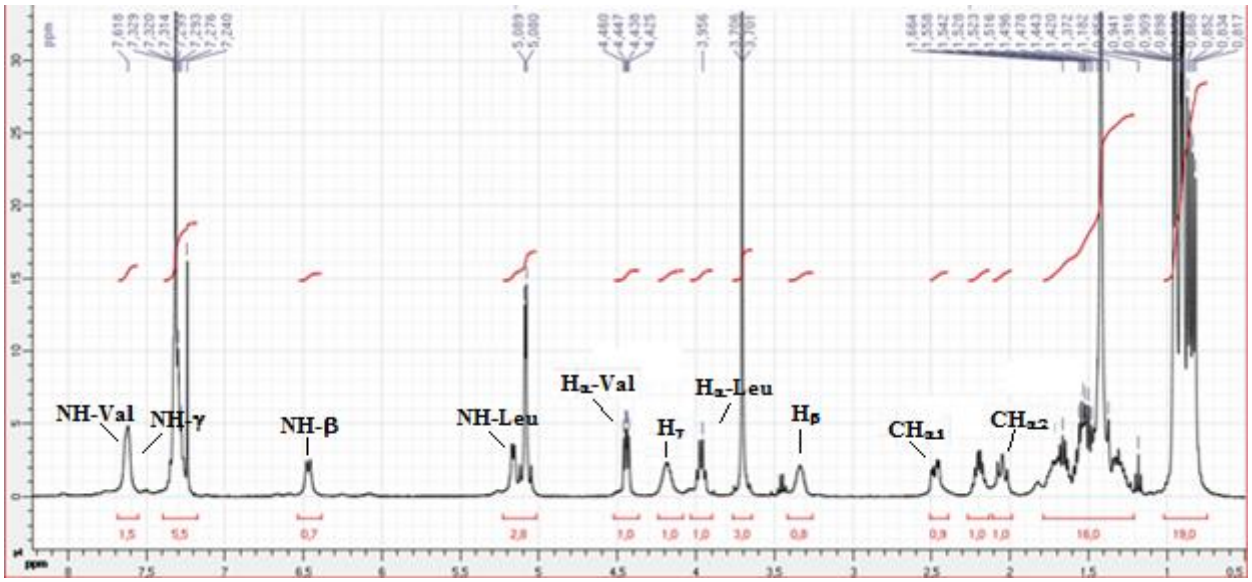


Figure 104 : Spectre du tripeptide 227

Après avoir analysé les spectres proton, nous avons observé l'influence de l'ajout de DMSO-d_6, qui est un accepteur de liaison hydrogène, sur les déplacements chimiques des protons NH. Comme nous l'avons dit précédemment, le dosage DMSO-d_6 est une méthode qui permet de voir les protons amides ou carbamates de peptides qui sont impliqués dans la création des liaisons H.

Le dosage a été effectué dans le chloroforme à une concentration faible de peptide (5 mM) pour éviter la formation de liaisons hydrogènes intermoléculaires. Sur la Figure 105 nous avons la superposition des 6 spectres ^{1}H après chaque ajout de DMSO-d_6 : 0, 20, 40, 60, 100 et 140 µL de DMSO dans 500 µL de $CDCl_3$. Nous pouvons remarquer que les déplacements chimiques des protons du

groupement méthylène de l'acide β,γ-diaminé, ainsi que les protons α (Leu et Val) et en position β et γ (acide β,γ-diaminé) changent et, au bout de la 5ème addition, certains se superposent. Ce phénomène peut être expliqué par la déstructuration de tripeptide sous l'influence du DMSO-d_6 : les protons diastéréotopiques deviennent identiques et l'éclatement entre les protons devient moins important. Ce comportement montre les premiers signes d'existence d'une structure secondaire.

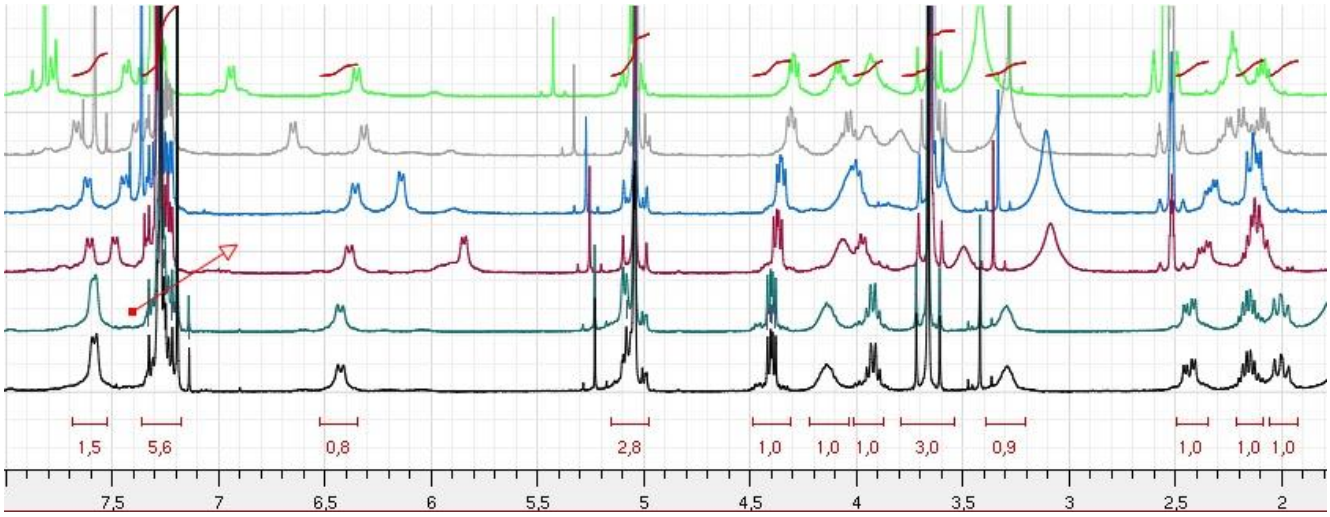
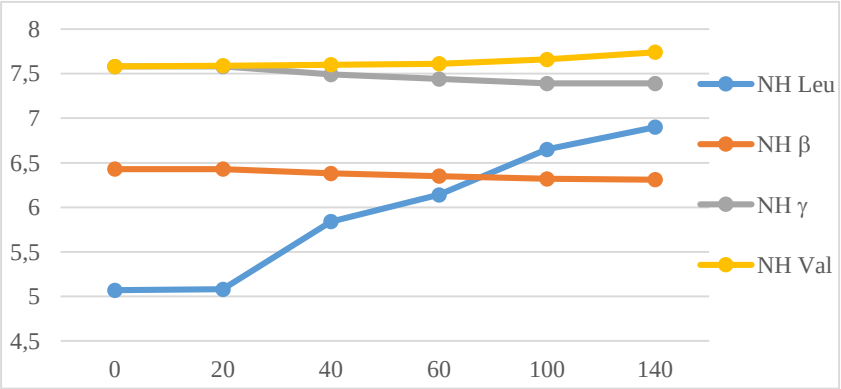
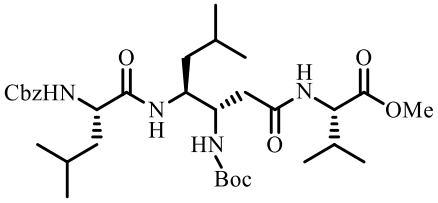


Figure 105 : Superposition des spectres aux concentrations différentes de DMSO-d_6 (0, 20, 40, 60, 100 et 140 µL), du bas vers le haut

Maintenant, nous allons analyser les déplacements chimiques des protons NH afin de déterminer la présence ou non de liaisons hydrogènes.





227

Figure 106 : Différence de déplacements chimiques après l'ajout de DMSO-d_6 progressif

Sur le graphique (Figure 106) nous voyons que les protons NH-Val (Δδ = 0,12 ppm), NH-β (Δδ = 0,12 ppm) et NH-γ (Δδ = 0,19 ppm) ne sont pas très affectés par l'ajout de DMSO-d_6. Tandis que le proton NH-Leu est très sensible et se déplace significativement vers les champs forts (Δδ = 1,83 ppm).

Cela signifie que les protons NH-Val, NH-β et NH-γ sont très probablement engagés dans l'établissement de liaisons hydrogènes. De plus, comme nous l'avons dit précédemment, les déplacements chimiques du NH-carbamate (6,43 ppm) et des deux amides (7,58 ppm) sont plus élevés que ceux des protons non liés, ce qui confirme notre hypothèse.

Malgré plusieurs tentatives de cristallisation, en appliquant différentes conditions dans différents solvants, nous n'avons pas réussi à cristalliser le tripeptide **227**. Dans ce cas, nous avons effectué l'expérience NOESY 2D afin de déterminer sa structure secondaire en solution. Parmi toutes les tâches de corrélation, un contact NOE d'intensité faible a été trouvé entre le NH du résidu valine et le groupement méthylène du Cbz. Cette corrélation lointaine indique, une fois de plus, la présence d'une structure secondaire en solution.

Les tâches NOEs observées ont été intégrées pour déduire la distance interatomique. Puis, les distances obtenues ainsi que les constantes de couplage ont été utilisées dans la modélisation moléculaire avec le logiciel Amber.

Le recuit simulé sous contraintes RMN a donné 200 structures de plus basse énergie. La superposition des 10 structures de plus basse énergie a mis en évidence la présence d'une structure secondaire stabilisée par deux liaisons hydrogènes à 7 (entre NH-β et CO_{Leu}) et 12 (entre NH_{Val} et CO_{Cbz}) atomes (Figure 107). Le NH-γ n'est pas vraiment impliqué dans une liaison hydrogène classique, mais les interactions avec le carbonyle du Cbz, qui est très proche, expliquent sa sensibilité faible à l'ajout de DMSO-d_6.

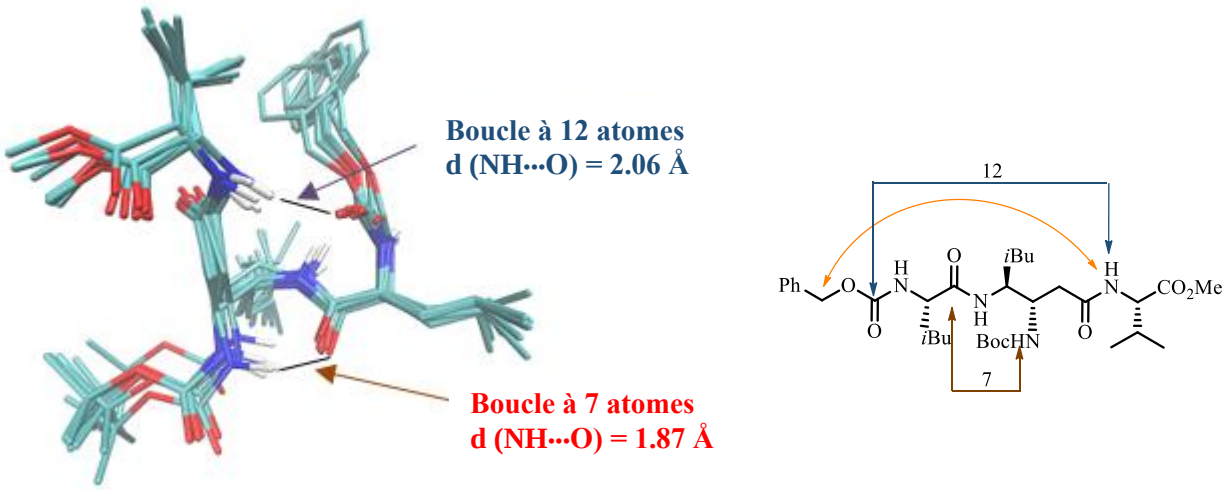


Figure 107 : 10 structures de plus basse énergie du tripeptide 227 issues du recuit simulé (à gauche) et représentation des tâches NOE observées (flèches arrondies) avec les liaisons hydrogènes (flèches carrées) (à droite)

Le résultat obtenu a été très encouragent car nous n'avions jamais observé auparavant la participation du groupement amine en β dans la formation des liaisons H. Pour mémoire, le tripeptide **200** de l'acide β,γ-diaminé issu de la L-valine de configuration *cis* et comportant les mêmes acides α-aminés, possède une boucle à 9 atomes, tandis que le tripeptide **227** est stabilisé par deux liaisons hydrogènes.

Pour vérifier la stabilité de la structure obtenue, nous avons effectué la dynamique moléculaire dans une boite de solvant de chloroforme à 300 K en impliquant une contrainte entre NH_{Val} et $CH_{2\ Cbz}$, observée dans le spectre NOE. Sur la Figure 108 nous voyons les trajectoires des liaisons hydrogènes à 7 (**a**) et à 12 (**b**) atomes. Nous pouvons remarquer que les deux liaisons existent tout au long de la dynamique moléculaire, lancée sur 50 ns (période de temps pendant lequel un certain nombre de structures sont générées. Dans notre cas il y a 500 structures, générées dans une nanoseconde). La boucle à 7 atomes est perturbée parfois, mais après quelques nanosecondes, la distance de la liaison hydrogène revient vers 2Å.

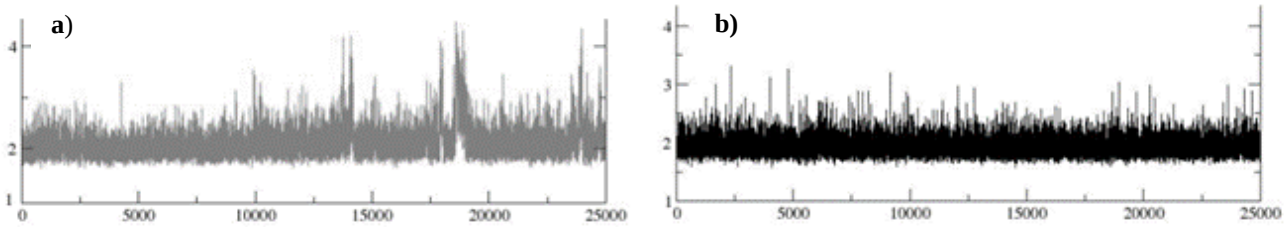


Figure 108 : Trajectoires des liaisons hydrogènes à 7 (a) et à 12 (b) atomes

Nous avons donc modélisé le tripeptide **227** et confirmé la présence d'une structure secondaire stabilisée par deux liaisons hydrogènes C_7 et C_{12}, ce qui est en accord avec les analyses RMN et le dosage DMSO-d_6.

Encouragé par les résultats obtenus, nous avons décidé de continuer l'allongement de la chaîne peptidique du côté N_{ter} jusqu'au tétrapeptide.

2.4 Tétrapeptide Boc-Ala-Leu-β,γ-Leu-Val-OMe 228

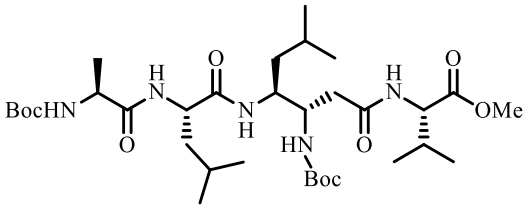
Le tripeptide **227** a été allongé avec une L-alanine protégée par un groupement Boc du côté N_{ter} pour conduire au tétrapeptide **228** (Figure 109). Pour l'étude structurale de cet oligomère, nous avons suivi la même démarche que pour le tripeptide.

Le spectre proton du tétrapeptide **228** dans le chloroforme (c = 10 mM) montre la présence de deux conformations, une majoritaire (> 95%) et une minoritaire (< 5%) en équilibre. Nous allons nous concentrer sur les analyses de la conformation majoritaire.

Comme dans le cas du tripeptide **227**, le tétrapeptide **228** présente plusieurs signes de la structuration stabilisée par des liaisons hydrogènes intramoléculaires :

- les déplacements chimiques des deux protons amides (NH-Val et NH-γ) et du NH carbamate en position β sont relativement élevés (Figure 109).

Entrée	NH	δ (ppm)
1	NH-Val	7,67
2	NH-γ	7,29
3	NH-Leu	6,43
4	NH-β	5,8
5	NH-Ala	4,84



228

Figure 109 : Déplacements chimiques des NH (à gauche) du tétrapeptide 228 (à droite)

- l'écart diastéréotopique de 0,3 ppm de la fonction méthylène de l'acide β,γ-diaminé indique une flexibilité réduite du squelette peptidique.

Le dosage DMSO-d_6 montre que les déplacements chimiques des NH-Val (Δδ = 0 ppm), NH-γ (Δδ = 0,14 ppm) et NH-β (Δδ = 0,14 ppm) sont très peu affectés par l'ajout de DMSO, tandis que les NH-Leu (Δδ = 0,75 ppm) et NH-Ala (Δδ = 1,43 ppm) se déplacent fortement vers les champs forts (Figure 110). Nous pouvons considérer que 3 liaisons hydrogènes sont très probablement présentes dans la structure du tétrapeptide **228**.

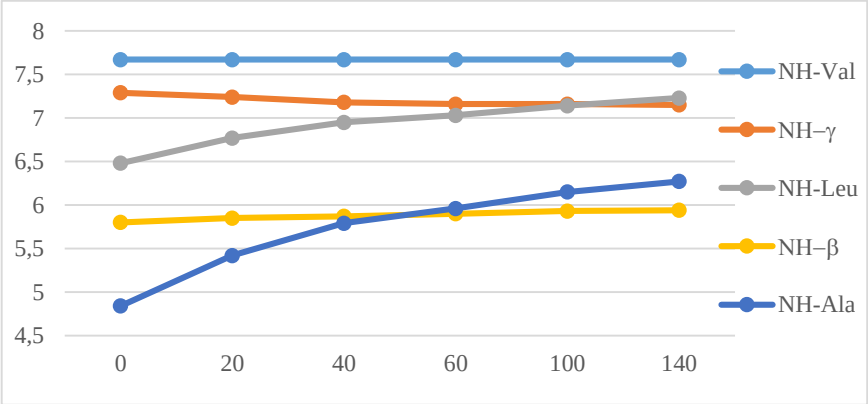


Figure 110 : Différence de déplacements chimiques après l'ajout progressif de DMSO-d_6

Le tétrapeptide cristallise dans le chloroforme sous forme d'aiguilles très fines, mais, la taille des cristaux n'est pas suffisamment grande pour faire de la diffraction des rayons X.

L'expérience NOESY 2D, à température ambiante et à une concentration de 5 mM en peptide **228**, a été effectuée afin d'établir sa structure secondaire en solution. 4 corrélations NOEs à longue distance ont pu être identifiées entre le *t*Bu du groupement Boc et le NH-γ, le NH-β et le NH-Leu (intensité faible) et entre le NH-Val et le H_α du résidu de la leucine (intensité forte). Les tâches observées mettent en évidence la stabilisation de la structure par des liaisons hydrogènes (Figure 111).

Comme dans le cas du tripeptide **227**, les contraintes NOEs ont été extraites ainsi que les constantes de couplage et utilisées dans les calculs de structure à l'aide du programme Amber.

Le recuit simulé sous contraintes RMN a donné 200 structures de plus basse énergie. La superposition parfaite des 10 structures de plus basse énergie indique la grande stabilité de la structure secondaire. Sur la Figure 111 nous pouvons voir que cette structure est stabilisée par deux liaisons hydrogènes à 10 et à 13 atomes formées entre les NHs de l'acide β,γ-diaminé et le CO du Boc. Cette liaison H à trois centres est un analogue de celle trouvée dans les oligourées, présentées dans le chapitre précédent. Il faut ajouter que la formation de ce cycle à 13 atomes n'a pas été possible dans le cas du tripeptide à cause de la chaîne peptidique plus courte. Cette observation montre que l'établissement d'une boucle C_{13}, présente dans l'hélice α, est favorisé par rapport au cycle C_7.

D'autre part, le NH-Val se situe entre les deux carbonyles : CO_{Leu} et CO_{Ala}, en créant une boucle à 9 atomes (comme dans le tripeptide **221** avec la configuration *trans*) et une boucle à 12 atomes (comme dans le tripeptide **227**). Il fait donc également une liaison H à trois centres.

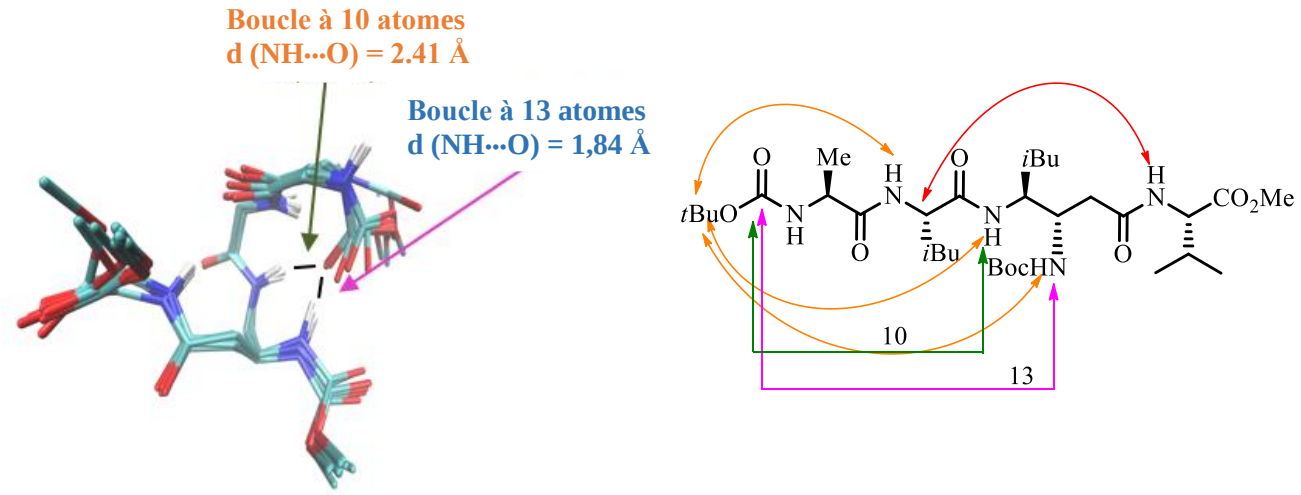


Figure 111 : Dix structures de plus basse énergie du tétrapeptide 228 issues du recuit simulé (à gauche) et représentation des tâches NOE observées (flèches arrondies) avec les liaisons hydrogènes (flèches carrées) (à droite)

La stabilité de la structure obtenue a été testée en effectuant la dynamique moléculaire sur 50 ns à 300 K dans le chloroforme. A la fin de la dynamique, la plupart des liaisons H sont toujours présentes,

ce qui est significatif d'une forte stabilité de la structure secondaire (Figure 112). Il faut remarquer que le NH-Val a formé une liaison hydrogène avec le CO-Leu, plutôt qu'avec le CO-Ala (seule liaison qui disparait). Nous pensons que la création d'une boucle à 12 atomes est probablement due à une plus grande stabilité par rapport à la boucle à 9 atomes.

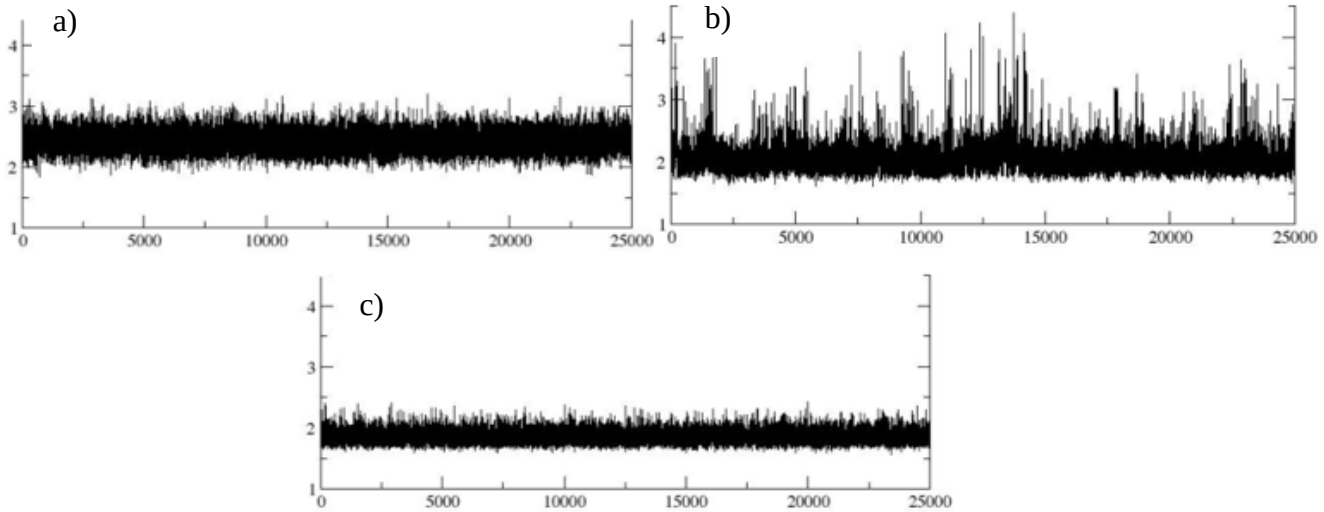


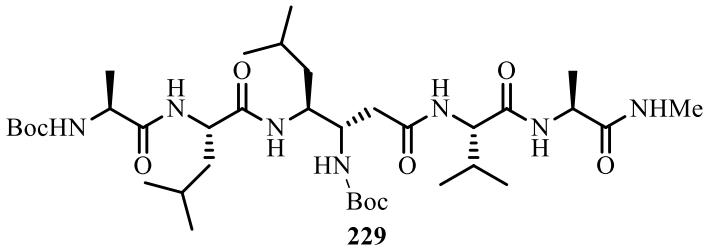
Figure 112 : Trajectoires des liaisons hydrogènes à 13 (a), à 10 (b) et à 12 (c) atomes

En conclusion, le tétrapeptide **228** se structure en solution dans le chloroforme (c = 10 mM) en formant trois liaisons hydrogènes entre les résidus i et i+2. Les deux NHs de l'acide β,γ-diaminé créent une liaison H à trois centres avec le carbonyle du groupement Boc. Il faut souligner le fait que le NH-β participe encore une fois à la stabilisation de la structure secondaire en formant une boucle C_{13} présente dans les hélices α des peptides naturels.

Après avoir étudié le tétrapeptide **228** nous nous sommes intéressés aux études structurales du pentapeptide **229** allongé par le côté C_{ter}.

2.5 Pentapeptide Boc-Ala-Leu-β,γ-Leu-Val-Ala-NHMe 229

Le spectre du pentapeptide **229** (Figure 113) dans le $CDCl_3$ (≈5 mM) présente plusieurs signes de structuration. Parmi les signes mentionnés dans les études précédentes (écart diastéréotopique du groupement méthylènes, déplacement chimiques des NH etc.), nous pouvons voir aussi l'éclatement important de déplacements chimiques dans la zone aliphatique ce qui signifie la présence d'une structure secondaire fixe.



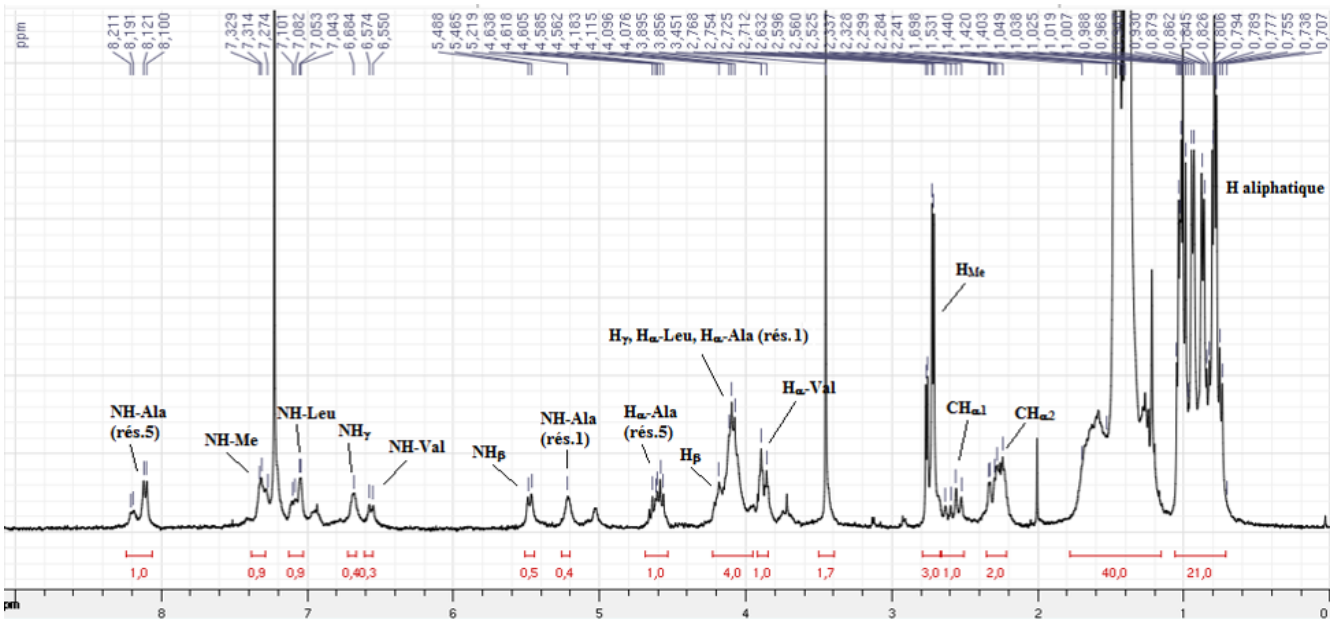


Figure 113 : Spectre du pentapeptide 229 dans le $CDCl_3$

Comme nous pouvons voir sur le spectre (Figure 113), le pentapeptide **229** n'adopte pas une seule conformation stable, mais deux conformations sont présentes avec un rapport de 7/3.

La petite quantité du produit n'a pas permis d'enregistrer un spectre NOESY de qualité suffisante pour effectuer des études structurales. Nous avons été obligés de re-synthétiser le pentapeptide **229** afin de déterminer ses conformations en solution. Mais, en suivant le même mode opératoire, le nouveau spectre proton du pentapeptide **229** présente plusieurs conformations et est difficile à analyser (Figure 114).

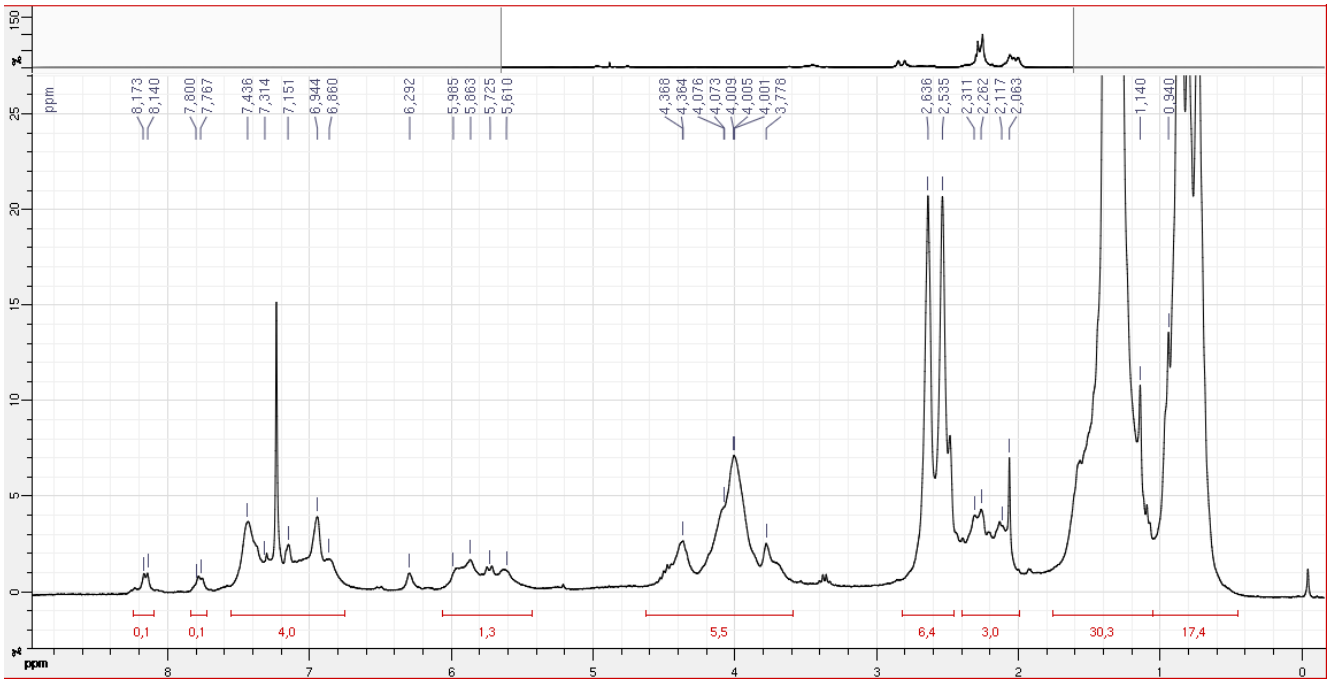


Figure 114 : Nouveau spectre proton du pentapeptide 229 dans le $CDCl_3$ (+20 µL du DMSO)

Le spectre du même composé **229** a été aussi enregistré à concentration très diluée (≈1 mM) pour éviter l'établissement de liaisons intermoléculaires, ce qui peut expliquer la présence de plusieurs conformations. Cependant, l'allure du spectre proton n'a pas changé ce qui indique l'absence des liaisons H intermoléculaires.

Ensuite, le spectre HRMS a été effectué afin de vérifier la présence éventuelle d'autres produits, mais seule pic du pentapeptide **229** a été observé. Actuellement, ce composé est en cours d'études structurales effectuées en collaboration avec le Dr. Emeric Miclet.

Ce comportement peut être expliqué par la présence de molécules (par exemple l'eau) qui sont capables de perturber les structures secondaires fragiles (thermodynamiquement peu stables) en faisant apparaitre évoquant plusieurs conformations stabilisées par des liaisons hydrogènes intermoléculaires.

Pour conclure, le pentapeptide **229** est capable de se structurer et il existe sous forme de deux conformations avec un rapport de 7/3. Cependant, les conformations adoptées sont fragiles et peuvent, probablement, être perturbées par de petites molécules (eau, méthanol). Parallèlement aux études RMN plus profondes de pentapeptide **229** nous avons modélisé l'heptapeptide **240** afin de déterminer sa capacité à adopter une structure secondaire.

2.6 Heptapeptide Boc-Val-Ala-Leu- β,γ-Leu-Val-Ala-Leu-OMe 240

L'heptapeptide **240** comportant l'acide β,γ-diaminé au milieu en position 4 a été synthétisé, cependant les analyses complètes et le recuit simulé sous contraintes RMN sont encore en cours. Néanmoins, nous avons lancé la dynamique moléculaire à partir d'une structure minimisée afin de voir

s'il est capable d'adopter une structure secondaire dans le solvant chloroforme sans aucune contrainte. La dynamique moléculaire, comme dans les cas précédents, a durée 50 ns à 300 K.

A la fin de la dynamique, nous avons été très étonnés d'avoir obtenu le peptide **240** en forme d'hélice-(*P*) bien définie avec la même polarité que les hélices α (Figure 115). De plus, cette hélice est stabilisée par les mêmes liaisons hydrogènes que celles observées dans la structure du tétrapeptide **228** : cycle à 12 (entre NH_{Val}^{5} et CO_{Ala}^{2}), cycle à 10 (entre NH-γ et CO_{Val}^{1}) (dans le cas du tétrapeptide, c'était le carbonyle du résidu Boc) et cycle à 13 (entre NH-β et CO_{Val}^{1}), ce qui montre la stabilité du motif structural obtenu dans le tétrapeptide.

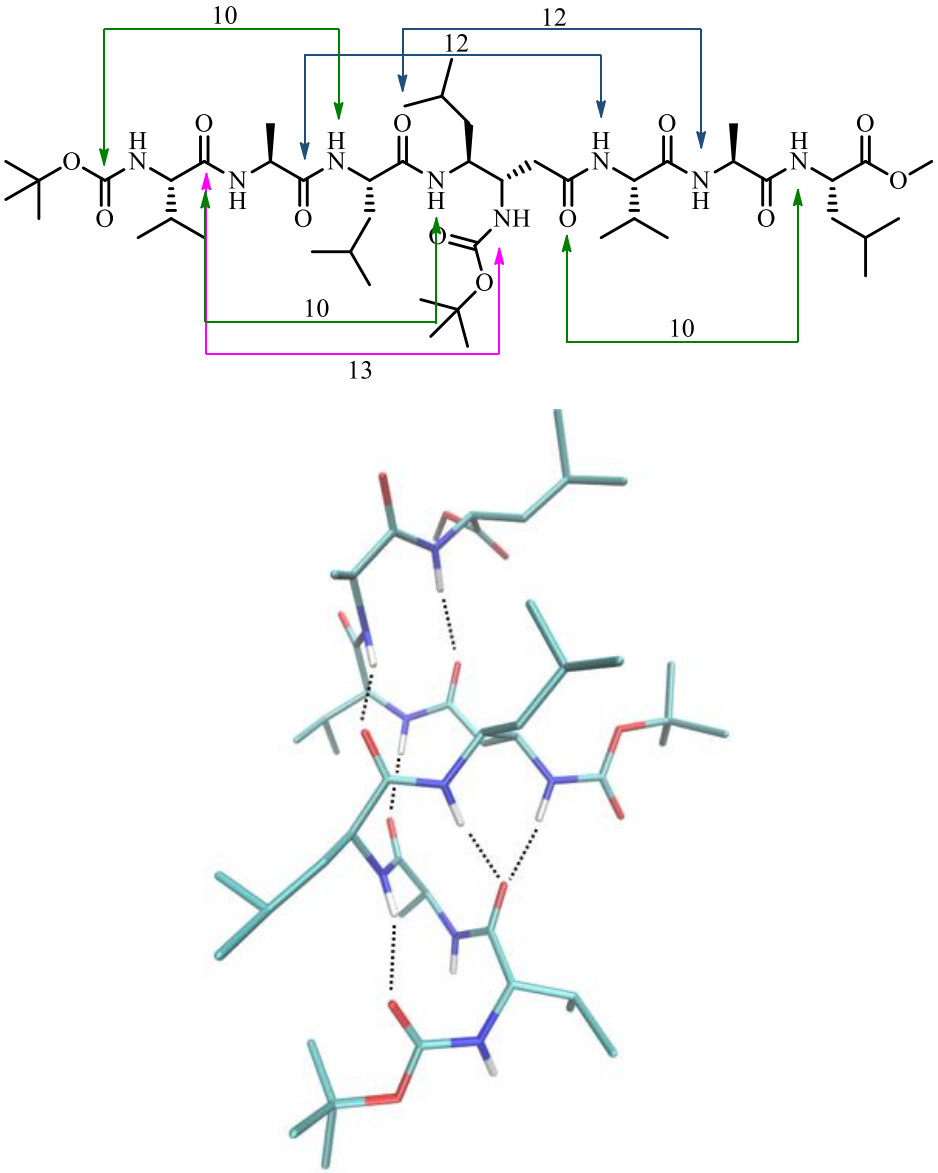


Figure 115 : Structure de l'heptapeptide 240 en forme d'hélice issue de la dynamique moléculaire

Ainsi, l'hélice de l'heptapeptide est stabilisée par de nouvelles liaisons H (Figure 115), créées par les acides aminés ajoutés : cycle à 10 (entre NH_{Leu}^{3} et CO_{Boc}), cycle à 12 (entre NH_{Ala}^{6} et CO_{Leu}^{3}) et cycle à 10 (entre NH_{Leu}^{7} et $CO_{acide\ \beta,\gamma\text{-diaminé}}^{2}$). Il faut remarquer que les liaisons hydrogènes à trois atomes, établies par l'acide β,γ-diaminé, sont toujours présentes dans la structure de l'heptapeptide **240**.

Plusieurs tentatives de cristallisation n'ont pas donné de monocristal de qualité suffisante pour effectuer la diffraction des rayons X, seules de fines aiguilles blanches d'heptapeptide **240** ont été obtenues.

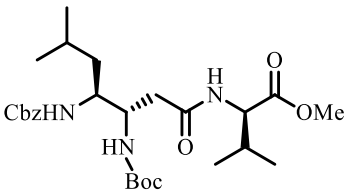
En conclusion, la dynamique moléculaire a montré que l'heptapeptide **240** est capable d'adopter une structure secondaire stable en forme d'hélice-(*P*). Elle est stabilisée par plusieurs liaisons hydrogènes à 10 et à 12 atomes, ainsi que par une liaison H à 13 atomes, présente dans l'hélice α. Il ne faut pas oublier que l'acide β,γ-diaminé joue un rôle clé dans la stabilisation de la structure d'hélice en formant des liaisons hydrogènes à trois centres.

2.7 Dipeptide Cbz-β,γ-Leu-Val-OMe 230

Après avoir étudié la structuration dans les peptides courts comportant un acide β,γ-diaminé, nous avons décidé d'explorer l'influence des acides aminés de configuration D. Pour effectuer cette étude, les analogues des peptides, présentés dans le paragraphe précédent, ont été synthétisés et analysés par RMN.

Nous avons d'abord commencé par l'analogue le plus simple, le dipeptide **230** comportant un acide β,γ-diaminé avec l'ester méthylique de la D-valine (Figure 116). Le spectre RMN de ce dipeptide dans le chloroforme, comme dans le cas du dipeptide **226** (avec l'acide α-aminé L), ne présente aucun signe de structuration par liaisons hydrogènes intramoléculaires. Ainsi, plusieurs jeux de signaux sont présents dans le spectre dans le chloroforme (≈10 mM) tandis que la RMN dans le méthanol-*d4* conduit à une seule conformation où les NHs s'échangent assez rapidement avec le deutérium. Après avoir analysé les déplacements chimiques (Figurre 116) des NHs, nous pouvons conclure que le dipeptide **230** n'adopte pas de structure secondaire définie, mais, probablement, comme son analogue, il existe sous forme de pseudo feuillet β stabilisé par des liaisons H intermoléculaires.

Entrée	NH	δ (ppm)
1	NH-Val	6,8
2	NH-γ	5,7
3	NH-β	6,2



230

Figure 116 : Déplacements chimiques des NH (à gauche) du dipeptide 230 (à droite)

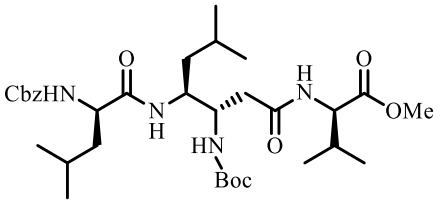
Le monocristal du dipeptide **230** n'a pas été obtenu pour confirmer notre hypothèse.

2.8 Tripeptide Cbz-D-Leu-β,γ-Leu-D-Val-OMe 231

Ensuite, nous avons étudié le tripeptide **231.** Pour mémoire, son analogue, le tripeptide **227**, adopte une structure stable avec deux liaisons hydrogènes C_7 et C_{12}. Après avoir analysé le spectre proton dans le chloroforme, à une concentration faible (c = 10 mM) pour éviter la formation de liaisons hydrogènes intermoléculaires, nous pouvons constater l'absence de structure secondaire stabilisée par des liaisons H intramoléculaires :

- les déplacements chimiques des protons amides et carbamates sont dans la zone des champs faibles, comme des NH non liés (Figure 117).

Entrée	NH	δ (ppm)
1	NH-Val	6,89
2	NH-γ	6,56
3	NH-β	5,34
4	NH-Leu	5,48



231

Figure 117 : Déplacements chimiques des NH (à gauche) du tripeptide 231 (à droite)

- les protons α des acides naturels et β,γ de l'acide diaminé ne sont pas éclatés.

- il n'y a pas d'écart diastéréotopique des protons de la fonction méthylène de l'acide β,γ-diaminé, ce qui indique une flexibilité importante du squelette peptidique.

- les valeurs des constantes de couplage correspondent aux valeurs moyennes issues de la rotation autour de la chaîne carbonée ($^3J_{HN\text{-}HC}$ est autour de 7 Hz).

Toutes ces observations indiquent clairement que le tripeptide **231** en solution n'adopte aucune structure secondaire. Néanmoins, nous avons effectué une étude RMN à basse température pour réduire la flexibilité de la chaîne et voir s'il est capable de se structurer. La superposition de 9 spectres allant de 230 K jusqu'à 300 K est présenté sur la Figure 118. Nous voyons que le tripeptide **231** existe probablement sous forme structurée à basse température car les NH amides (NH-γ = 8,82 ppm et NH-Val = 8,23 ppm) et le NH carbamate (NH-β = 6,87 ppm) sont déplacés vers les champs forts. D'autre part, les constantes de couplages des H α, β et γ sont bien distinguées et les protons sont plus ou moins éclatés.

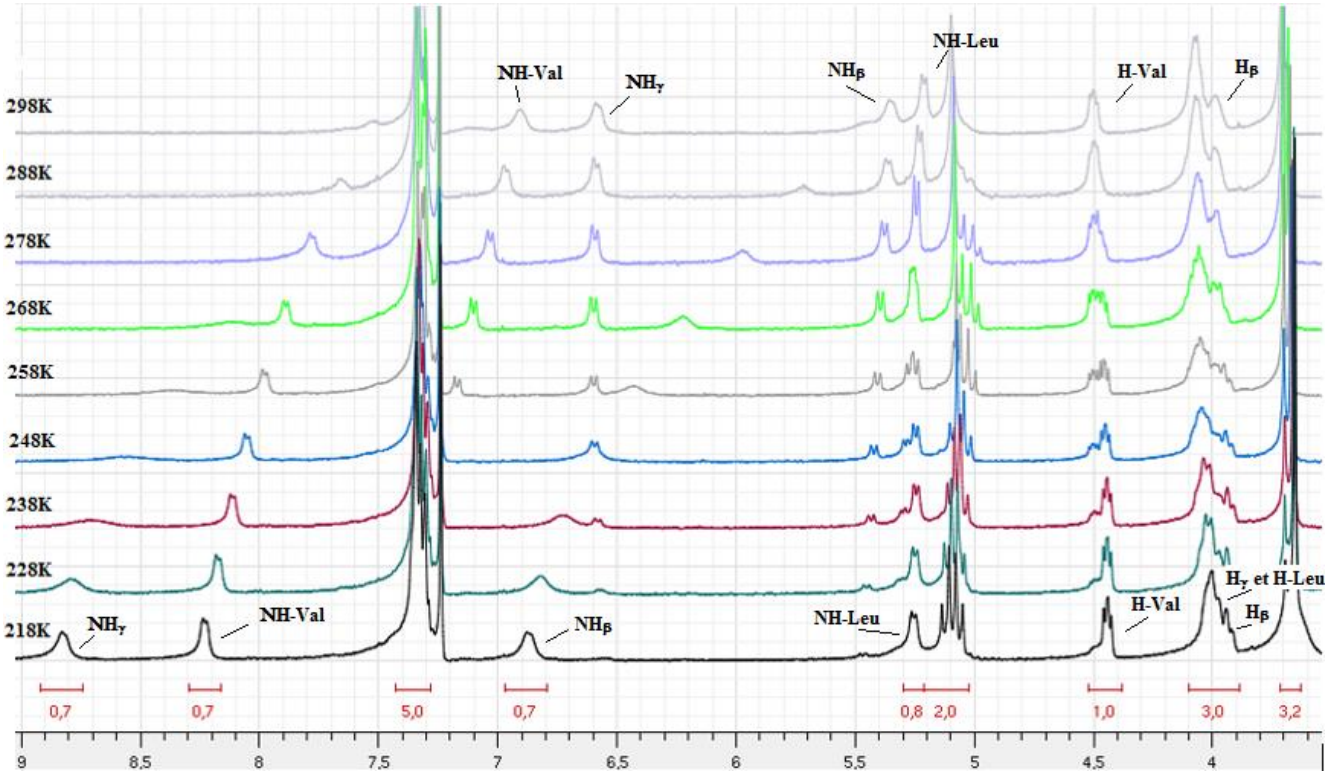


Figure 118 : Superposition des spectres du tripeptide 231 à des températures croissantes (de 218K (bas) à 298K (haut))

En chauffant, nous voyons l'apparition d'une autre conformation non stabilisée. Vers 268K les deux structures se trouvent en équilibre et vers 298K nous retrouvons majoritairement une structure sans liaison hydrogène. Cette expérience montre que le tripeptide **231** ne peut exister sous forme structurée qu'à basse température. A température ambiante, l'énergie potentielle de la molécule et la flexibilité de la chaîne augmentent, ce qui perturbe la structure secondaire et conduit à une conformation non stabilisée.

Pour trouver la structure secondaire du tripeptide, adoptée à basse température, nous avons effectué une analyse NOESY à 248K suivie par modélisation moléculaire. Cependant, les résultats obtenus après la modélisation n'ont pas été cohérents avec ceux de la RMN. Les études structurales du tripeptide **231** ont été temporairement abandonnées. Néanmoins, nous avons décidé d'allonger la chaîne peptidique du côté N_{ter}, pour obtenir le tétrapeptide **232**, en espérant stabiliser la structure secondaire.

2.9 Tétrapeptide Boc-D-Ala-D-Leu-β,γ-Leu-D-Val-OMe 232

Le tétrapeptide **232** est un analogue du tétrapeptide **228**, qui adopte une structure secondaire bien définie, stabilisée par trois liaisons hydrogènes. Le spectre proton du tétramère, comme dans le cas du trimère **231**, ne montre aucun signe caractéristique de structuration d'oligomère.

Pour vérifier notre hypothèse, nous avons effectué un dosage par le DMSO-d_6 d'une solution dans le $CDCl_3$ à une concentration de 10 mM afin de défavoriser les liaisons H intermoléculaires (Figure 119).

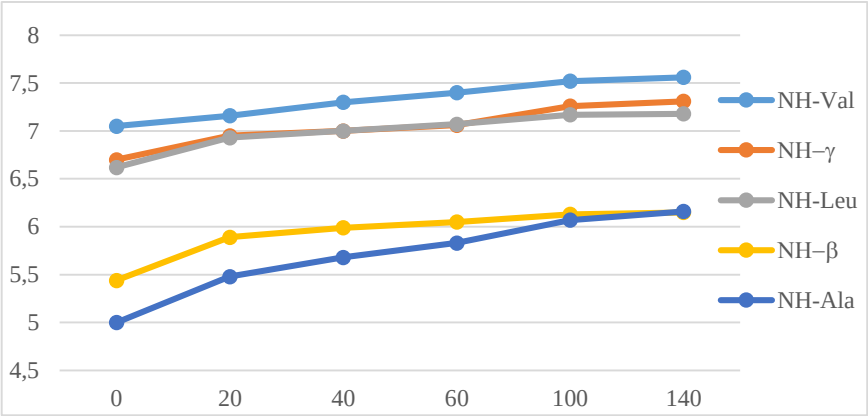
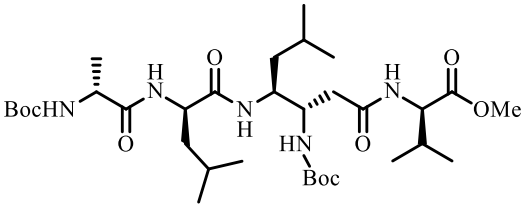


Figure 119 : Différence de déplacements chimiques après ajout progressif de DMSO-d_6

Entrée	NH	δ (ppm)	Δδ (ppm)
1	NH-Val	7,06	0,54
2	NH-γ	6,70	0,75
3	NH-Leu	6,63	0,50
4	NH-β	5,42	0,69
5	NH-Ala	5,00	1,15

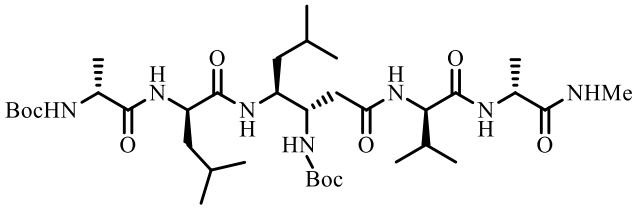


232

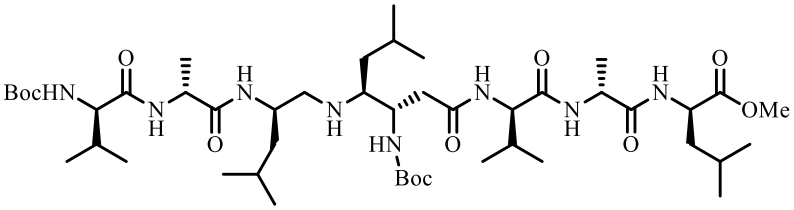
Figure 120 : Déplacements chimiques des NH avant l'ajout de DMSO-d_6 (δ (ppm)) et différence de déplacements chimiques des NH entre la valeur initiale et après l'ajout de DMSO-d_6 (Δδ (ppm))

Après avoir analysé les spectres, nous pouvons constater qu'aucun NH n'est engagé dans l'établissement de liaison hydrogène intramoléculaire. Les déplacements chimiques des NH sont tous plutôt vers les champs faibles (Figure 120), ce qui est caractéristique des NH non liés. De plus, les déplacements chimiques de tous les protons sont sensibles à l'ajout de DMSO-d_6 et bougent fortement vers les champs forts.

Comme nous avons pu le voir, l'allongement de la chaîne peptidique du trimère **231** n'a pas favorisé la structuration dans la solution. Contrairement à son analogue avec des acides α, le tétrapeptide **232** n'est pas capable d'adopter une conformation bien définie. Néanmoins, les pentapeptide **233** et heptapetide **241** (Figure 121) ont été synthétisés et des analyses structurales sont en cours pour explorer leur capacité à adopter une structure secondaire.



233



241

Figure 121 : Structure du pentapeptide 233 et de l'heptapeptide 241 comportant des acides α-aminés D

Partie V : Vers la synthèse d'un analogue de la gramicidine S

1. Introduction

La gramicidine S (Figure 122) est un cyclodécapeptide qui possède de très fortes propriétés antibiotiques. Il a été isolé en 1942 d'une bactérie *Aneurinibacillus migulanus* (anciennement *Bacillus brevis*).

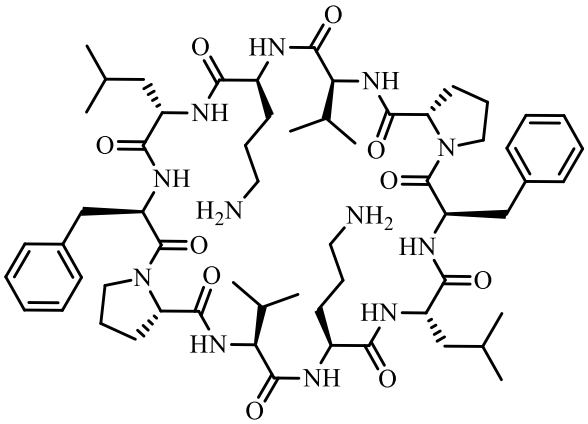


Figure 122 : Structure de Gramicidine S

La gramicidine S est constituée de deux brins pentapeptides connectés entre eux pour former un cycle de symétrie C2. Ce cyclodécapeptide comporte des acides aminés hydrophobes (L-leucine et L-valine) et un acide aminé hydrophile (L-ornithine). Les acides D-phénylalanine et L-proline forment un coude β de type II' stabilisé par 4 liaisons hydrogènes créées par deux feuillets β parallèles (Val-Orn-Leu) (Figure 123). Les chaînes latérales hydrophobes et hydrophiles sont positionnées sur des côtés opposés, ce qui crée une molécule amphiphile[153].

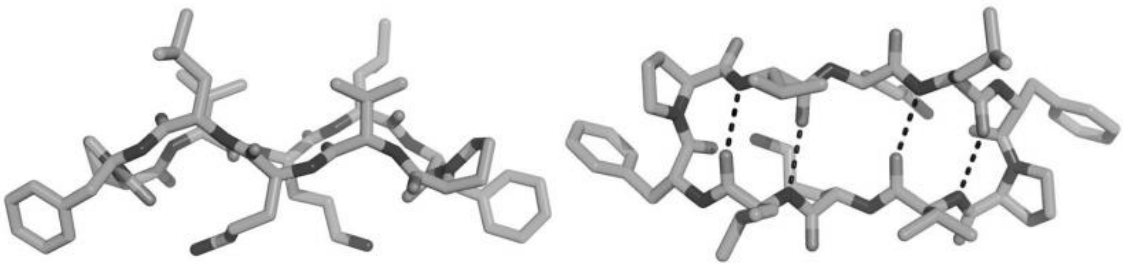


Figure 123 : Structure RX de la Gramicidine S

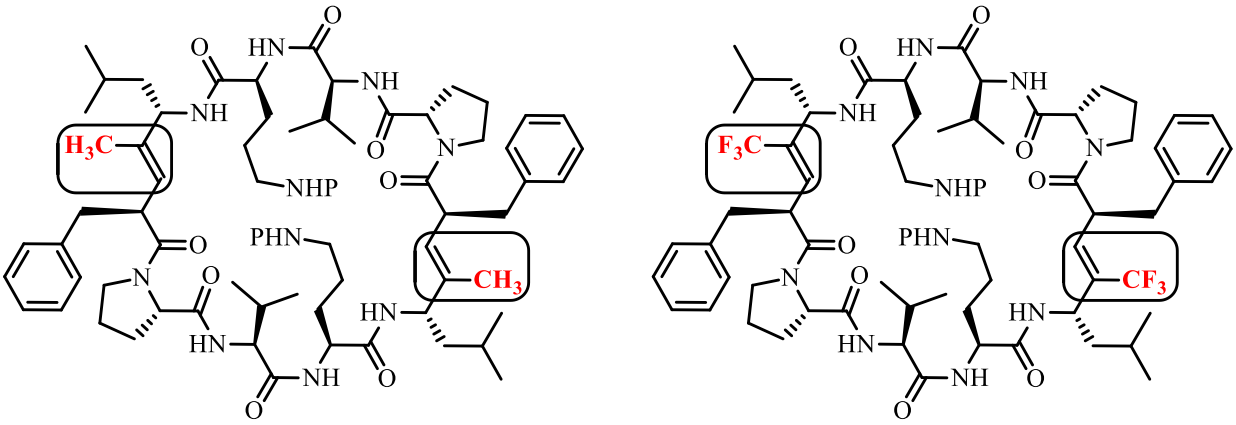
[153] Hodgkin, D. C.; Oughton, B. M., *Biochem. J.* **1954**, *65*, 752.

La gramicidine S est très efficace contre une grande variété des bactéries gram-positives, gram-négatives et contre certains champignons[154,155]. Cependant, son application dans le domaine clinique est très restreinte (généralement utilisée dans le traitement des infections topiques[156]) à cause d'une forte toxicité contre les érythrocytes (hémolyse). Cet inconvénient a suscité la recherche de nouveaux analogues de la gramicidine S possédant la même ou une meilleure activité antibactérienne sans avoir la toxicité hémolytique.

2. Rappels bibliographiques sur les analogues synthétiques de la gramicidine S

En 2005, l'équipe de Wipf[157] a publié des travaux sur les analogues **244** et **245** de la gramacidine contenant un isostère dipeptidique (*E*)-alcène trisubstitué (TEADI 'trisubstituted (*E*)-alkene dipeptide isoster'). Des études précédentes sur les TEADI avaient montré la capacité de ces composés à adopter un coude β dans des séquences acycliques.

L'idée était de mimer le coude β en remplaçant la D-phénylalanine et la L-leucine par un motif rigide de TEADI possédant un groupement méthyle ou un groupement trifluorométhyle (Figure 124).



244 : P = H
244p : P = Cbz

245 : P = H
245p : P = Cbz

Figure 124 : Structure d'analogues de la gramicidine S

Les analyses conformationnelles en solution (RMN dans le DMSO et CD dans l'éthanol) des analogues protégés **244p** et **245p** ont montré que le peptide trifluorométhylé était un meilleur mime de la structure secondaire de la gramicidine grâce à des interactions électrostatiques ressemblant à celles du

[154] Gause, G. F.; Brazhnikova, M. G. *Nature*, **1944**, *154*, 703.
[155] Kondejewski, L. H.; Farmer, S. W; Wishart, D. S.; Hancock, R. E. W; Hodges, R. S., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1996**, *47*, 460.
[156] Wadsten, C. J.; Bertilsson, C. A.; Sieradzki, H.; Edstrom, S., *Arch. Oto-Rhino-Laryngol.* **1985**, *242*, 135.
[157] Xiao, J.; Weisblum, B.; Wipf, P. *J. Am. Chem. Soc*, **2005**, *127*, 5742.

groupement carbonyle. La structure RX confirme un repliement en feuillet β antiparallèle, cependant la surface de la double liaison tourne de 70° par rapport au coude β de l'amide d'analogue. Ce comportement peut être probablement expliqué par l'effet stérique du groupement trifluorométhylé. Le reste de la chaîne et les liaisons hydrogènes sont très peu perturbés. L'activité antibactérienne des analogues étudiés contre *Bacillus subtilis* reste équivalente à celle de gramicidine S naturelle (5-15 μg/mL).

Un an après, en 2006[158], la même équipe a présenté l'étude sur un analogue de la gramicidine S dans lequel le coude β formé par la D-phénylalanine et la L-proline est remplacé par le motif TEADI (Figure 125).

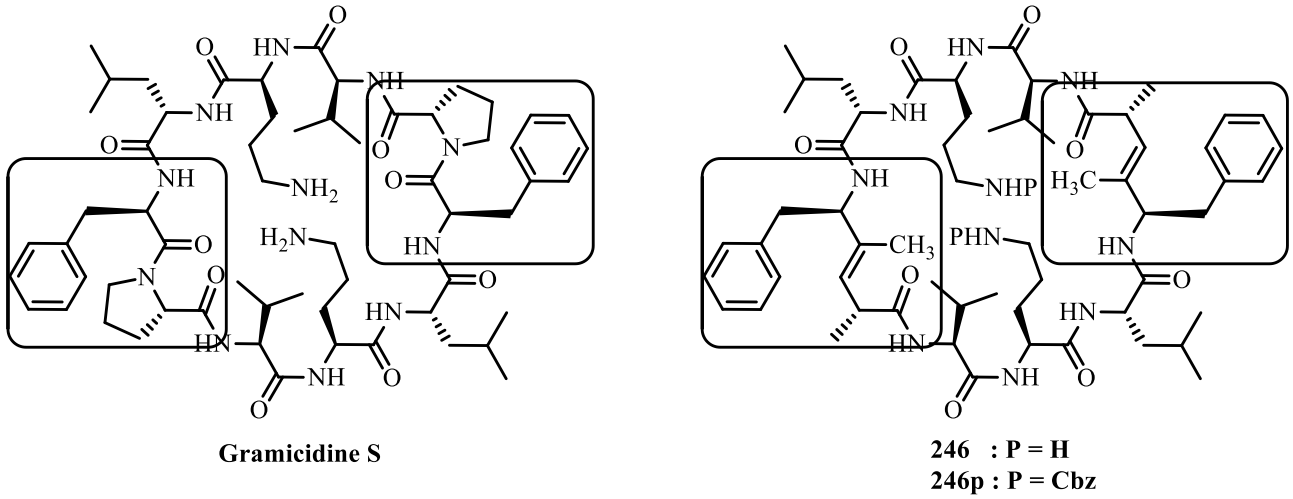


Figure 125 : Structure d'analogue 246 de la gramicidine S

Les analyses RMN de l'analogue protégé **246p** dans le DMSO-d_6 ainsi que le dichroïsme circulaire dans l'éthanol ont confirmé la présence d'une structure secondaire identique à celle de la gramicidine naturelle. Les tests préliminaires d'activité antibactérienne contre *Bacillus subtilis* d'analogue **246** montrent presque la même activité que la gramicidine S, respectivement ≈20 μg/mL et ≈15 μg/mL.

En 2011, l'équipe d'Overhand[159] a effectué des études sur des analogues de gramicidine S dans lesquels l'un des motifs dipeptidique D-phénylalanine et L-proline responsable du coude β est remplacé par un dérivé aminé cyclique de sucre. Au cours de cette étude, une série d'analogues comportant un cycle à 4, 5 et 6 atomes a été synthétisée afin d'évaluer l'effet de la taille du cycle (Figure 126). Des

[158] Xiao, J.; Weisblum, B.; Wipf, P. *Org. Lett.*, **2006**, *21*, 4731.
[159] Knijnenburg, A. D.; Tuin, A. W.; Spalburg, E.; Neeling, A. J.; Mars-Groenendijk, R. H.; Noort, D.; Otero, J.M.; Llamas-Saiz, A. L.; Raaij, M. J.; Marel, G. A.; Overkleeft, H. S.; Overhand, M. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 3995.

études précédentes avaient montré que la présence d'un groupement hydrophobe sur l'hydroxyle augmente significativement la capacité de pénétration des membranes cellulaires[160].

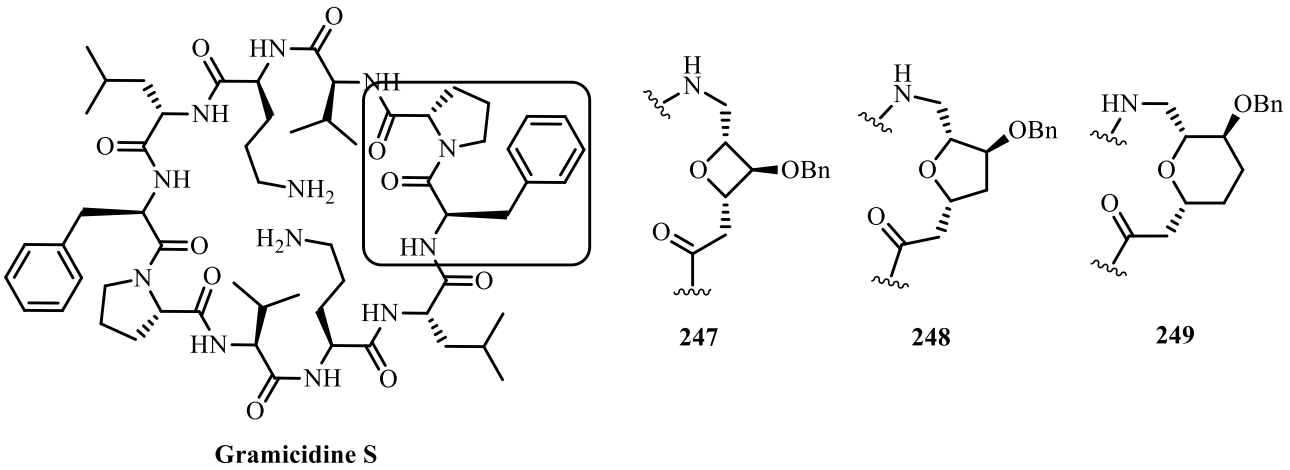


Figure 126 : Structure d'analogues de la gramicidine S

Des études de RMN, de dichroïsme circulaire, de modélisation moléculaire et de diffraction des rayons X ont mis en évidence la présence d'une structure secondaire en forme de 'hairpin' dans tous les cas. Cependant, la rigidité du cycle de la gramicidine S est plus importante que celle des analogues **247**, **248** et **249** (Figure 127).

[160] Grotenberg, A. E.; Buizert, A. E. M.; Llamas-Saiz, A. L.; Spalburg, E.; van Hooft, P. A. V.; de Neeling, A. J.; Noort, D.; Raaij, M. J.; Marel, G. A.; Overkleeft, H. S.; Overhand, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 7559.

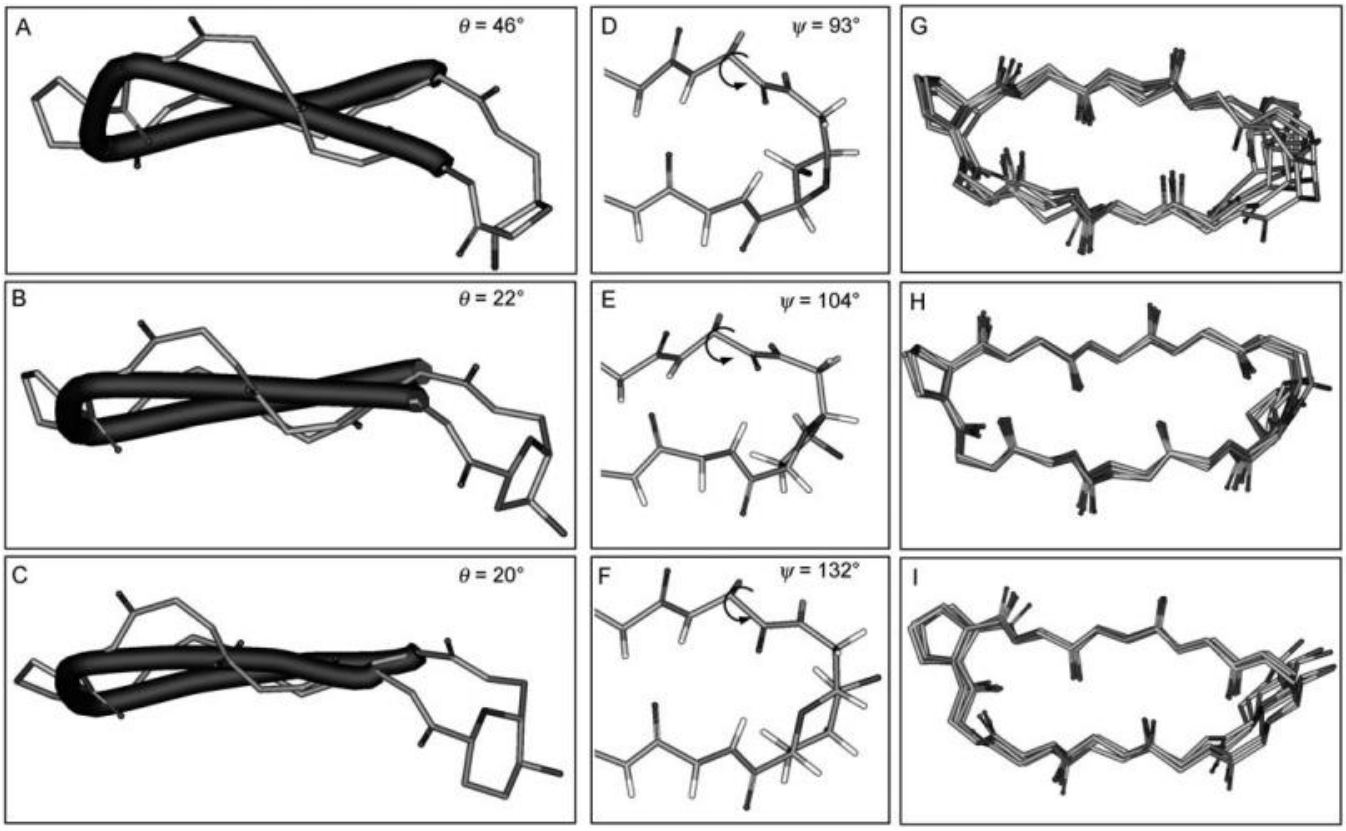


Figure 127 : Structure de plus basse énergie (vue de côté) de 247 (A), 248 (B) et 249 (C) ; structure de plus basse énergie (vue de haut) de 247 (D), 248 (E) et 249 (F) ; superposition de 10 structures de plus basse énergie de 247 (G), 248 (H) et 249 (I)

La superposition de la structure de plus basse énergie de **249** avec la structure RX de la gramicidine S montre que le cycle pyranoide peut être considéré comme le meilleur mime de la séquence D-Phe-L-Pro (Figure 128).

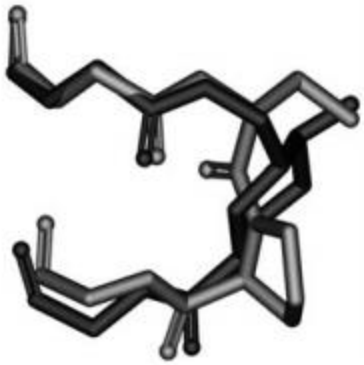


Figure 128 : Superposition de cycle pyranoide avec la séquence D-Phe-L-Pro de la gramicidine S

L'activité antimicrobienne de l'analogue **249** est équivalente à celle de la gramicidine S et est supérieure à celles de **247** et **248**. De plus l'activité hémolytique est 15 fois moins forte que dans le cas

de gramicidine S. Actuellement, les auteurs effectuent des tests biologiques plus poussés avec le composé **226** et essayent de comprendre la relation entre la structure et les activités biologiques du peptide **249**.

L'équipe de Maillard, en 2013[161], a publié son étude sur l'analogue de la gramicidine S comportant le motif ATC (acide 4-amino(méthyl)-1,3-thiazole-5-carboxylique) **250** (Figure 129).

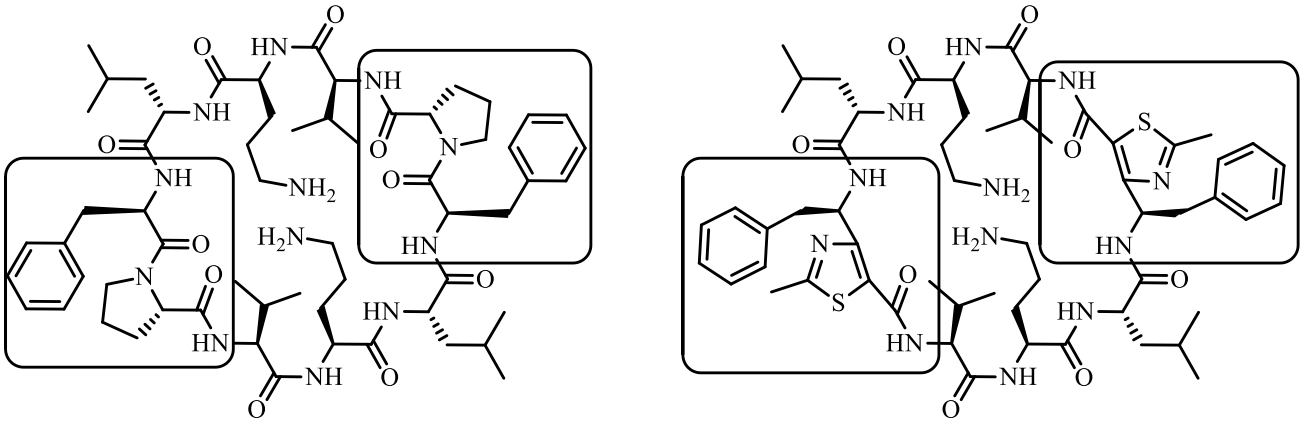


Figure 129 : Structure d'analogue 250 de la gramicidine S

Il a été trouvé que le motif ATC introduit un coude stabilisé par une liaison à 9 atomes. Ce motif a été utilisé dans la structure d'analogue de la gramicidine S **250** afin de mimer le coude β.

Les analyses RMN couplées à la modélisation moléculaire sous contraintes ont donné une structure secondaire en forme de feuillet β stabilisé avec 4 liaisons hydrogènes comme dans le cas de la gramicidine S (Figure 130).

[161] Legrand, B.; Mathieu, L.; Lebrun, A.; Andriamanarivo, S.; Lisowski, S.; Masurier, N.; Zirah, S.; Kang, Y. K.; Martinez, J.; Maillard, L. T. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 6713.

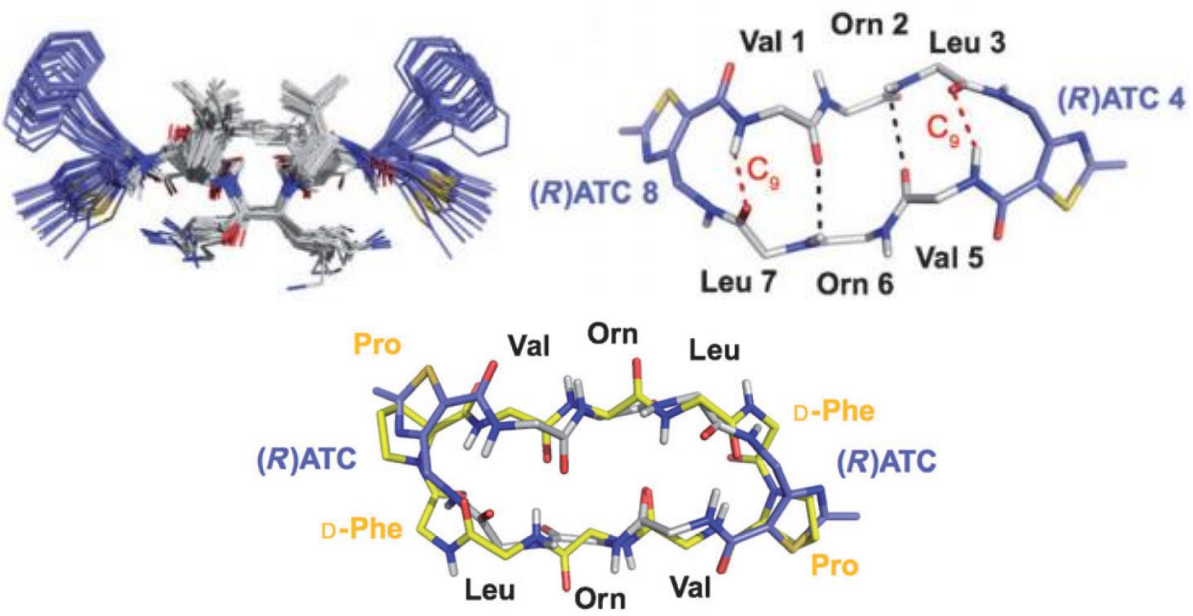


Figure 130 : Superposition des 10 structures de plus basse énergie (à gauche, en haut), représentation de la structure secondaire stabilisée par 4 liaisons hydrogènes (à droite, en haut) et superposition de la chaîne carbonée de la gramicidine S (jaune) et l'analogue 250 (bleu et blanc) (au centre, en bas)

Les tests biologiques du composé **250** ont montré une activité antibactérienne un peu plus faible que la gramicidine S, mais l'activité hémolytique est plus que 5 fois moins forte.

Il existe également d'autres façons de modifier les propriétés physiques et biologiques de cette molécule comme jouer avec les chaines latérales en introduisant des substituants différents (hydrophile (ornithine supplémentaire) ou hydrophobe (adamantyle[162] ou aromatique cyclique[163])).

3. Synthèse d'un analogue de la gramicidine S

Dans notre laboratoire, nous nous sommes intéressés à la synthèse d'analogue de la gramicidine S comportant le motif acide β,γ-diaminé issu de la D-phénylalanine à la place du dipeptide D-Phe-L-Pro. Nous avons voulu étudier l'influence de notre acide aminé ainsi que la diminution de la taille du cycle du peptide sur la structure et les activités biologiques de cet analogue de la gramicidine S **251** (Figure 131). Comme nous pouvons le voir, ce changement diminue la taille du cycle (2 atomes en moins), mais laisserait intouchés les groupements amides et carbonyles engagés dans la création des liaisons hydrogènes. De plus, l'introduction de deux groupements amines supplémentaires augmenterait

[162] Luo, J.; Otero, J., M.; Yu, C.-H.; Warmlander, S. K. T. S.; Graslund, A.; Overhand, M.; Abrahams, J. P. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 17338.
[163] Kapoerchan, V. V.; Knijnenburg, A. D.; Niamat, M.; Spalburg, S.; Neeling, A. J.; Nibbering, P. H.; Mars-Groenendijk, R. H.; Noort, D.; Otero, J. M.; Llamas-Saiz, A. L.; Raaij, M. J.; Marel, G. A.; Overkleeft, H. S.; Overhand, M. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 12174.

les propriétés hydrophiles de la molécule. Il serait également intéressant d'utiliser l'autre diastéréomère afin de voir l'orientation de l'amine libre en position β.

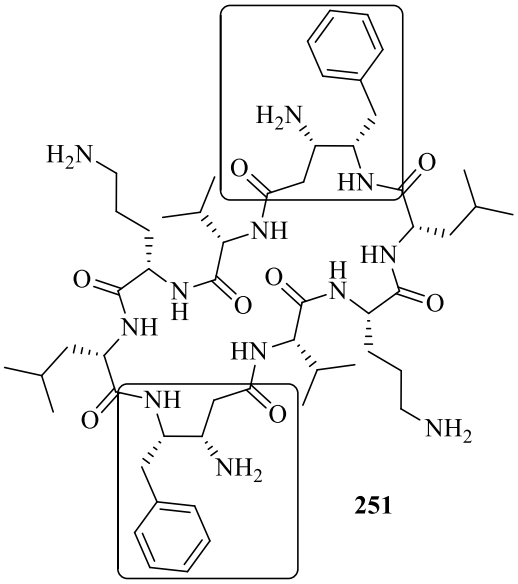


Figure 131 : Structure de l'analogue 251 comportant deux acides β,γ-diaminés issu de la D-phénylalanine

L'acide β,γ-diaminé **255** issu de la D-phénylalanine a été synthétisé en utilisant la même stratégie de synthèse que pour l'acide β,γ-diaminé issu de la L-leucine **107c** ou de la L-phénylalanine **107d** (Schéma 48). La fonction acide de la D-phénylalanine protégée par un groupement Cbz a été transformée d'abord en fonction amide, puis en nitrile avec l'anhydride trifluoroacétique dans le tetrahydrofurane en présence de triéthylamine pour donner le composé **253** avec un rendement de 69% en deux étapes.

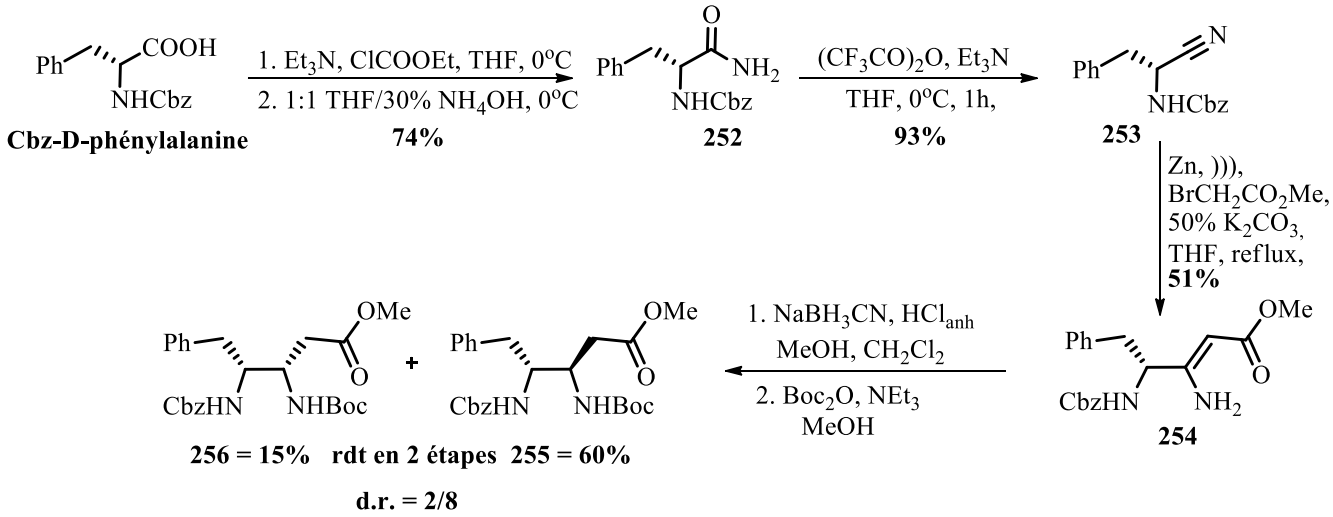


Schéma 48 : Synthèse des acides β,γ-diaminés 232 et 233

Après avoir obtenu le nitrile monoprotégé **253** la réaction de Blaisee a été effectuée en utilisant la poudre de Zn avec le bromoacétate de méthyl. L'énamine, obtenue avec un rendement de 51%, a été réduite par $NaBH_3CN$ et protégée par un groupement Boc pour conduire aux deux diastéréomères **255** et **256** avec un rapport diastéréomèrique de 8/2.

Les deux acides β,γ-diaminés **255** et **256** ont été obtenus en 5 étapes avec des rendements respectivement de 21% et 5% (les rendements ne sont pas optimisés).

Ensuite, le diastéréomère majoritaire **255** a été saponifié par l'hydroxyde de sodium 4N pour donner l'acide **257** avec un rendement quantitatif. Le composé **257** a été directement engagé dans le couplage peptidique en solution avec le tripeptide **258** en présence d'HATU, EDCI et DIPEA dans le DMF (Schéma 49) pour conduire au tétrapeptide **259** avec un bon rendement de 74%.

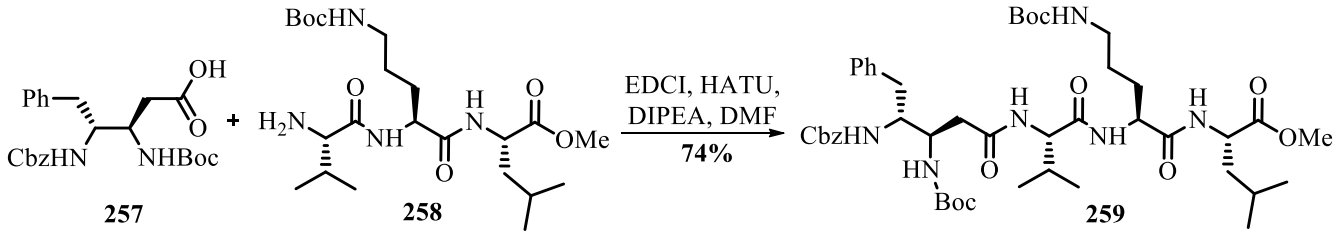


Schéma 49 : Synthèse de tétrapeptide 259

Le tétrapeptide **259** a été divisé en deux parties afin d'effectuer des réactions de déprotection de chaque côté pour obtenir les tétrapeptides **259a** et **259b**. Le composé **259a** a été obtenu après saponification avec de l'hydroxyde de sodium 4N dans le méthanol. D'autre part, la déprotection du tétrapeptide **259** avec du dihydrogène en présence du Pd/C dans le méthanol conduit au composé **259b**. Les deux peptides déprotégés ont été couplés avec HATU et DIPEA dans le DMF pour donner l'octapeptide **260** avec un bon rendement de 51%.

Ensuite, le composé **260** a été saponifié et puis le groupement Cbz a été enlevé (Schéma 50). L'octapeptide déprotégé a été cyclisé en présence de PyBOP et HOBt, DIPEA dans une solution de DMF pour conduire à l'octapeptide cyclique **261**.

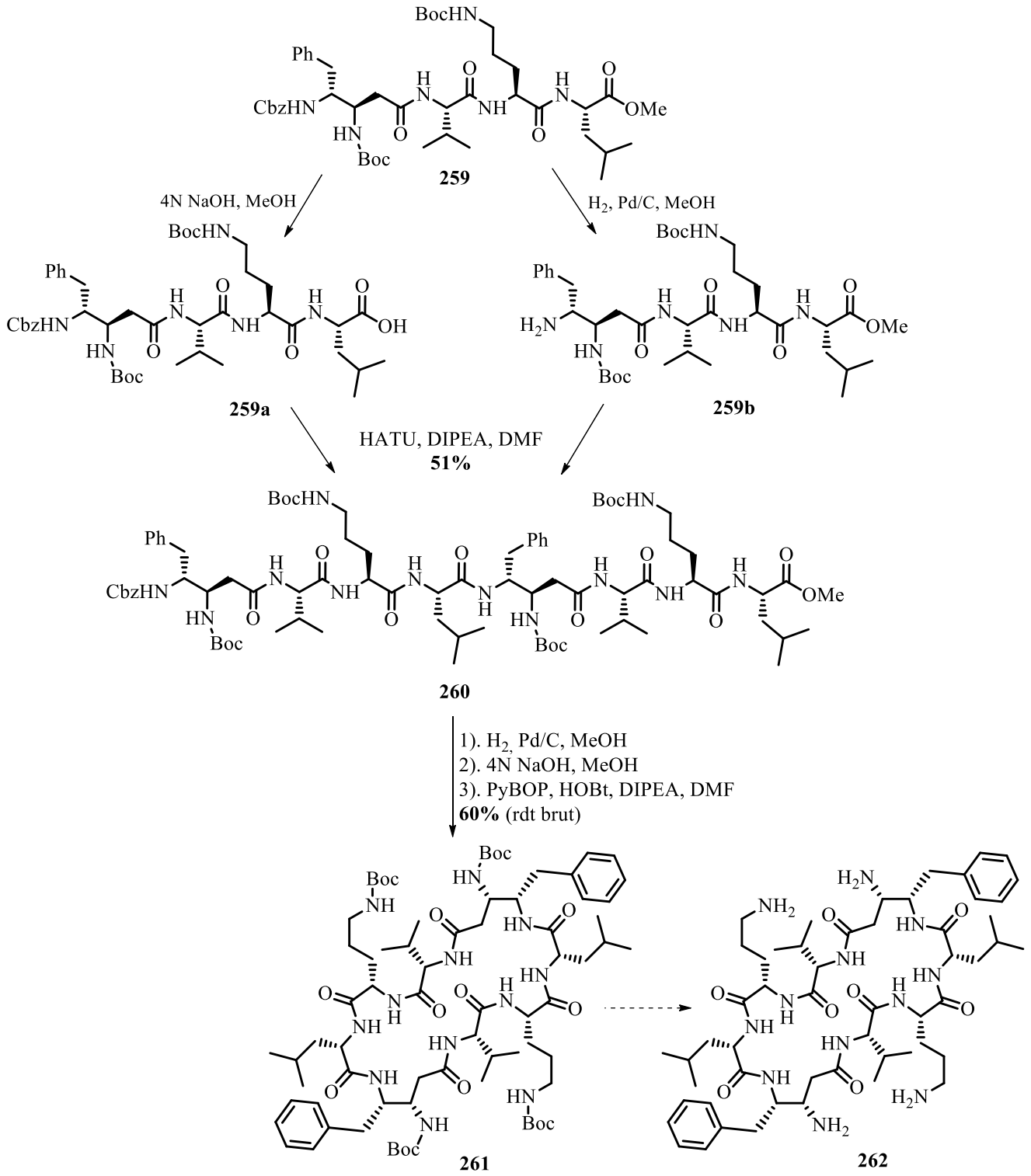


Schéma 50 : Synthèse vers l'analogue de la graicidine S 262

Actuellement, cet octapeptide est en cours de purification par HPLC en phase inverse. Après avoir obtenu le composé pur nous envisageons de finir la synthèse en déprotégeant complétement la protection Boc qui conduira à l'analogue de la gramicidine S **262**. Cet octapeptide sera testé afin d'évaluer son activité biologique, notamment l'activité antimicrobienne et hémolytique. De plus, nous

envisageons d'étudier l'influence du motif β,γ-diaminé sur la structure secondaire de la gramicidine S naturelle.

Conclusion générale et perspectives

L'objectif de cette thèse a d'abord été d'élargir la gamme des acides β,γ-diaminés notamment issus de la L-leucine et de la L-phénylalanine possédant la configuration *trans*. Puis, nous avons voulu utiliser les acides β,γ-diaminés obtenus dans l'élaboration des nouveaux peptides hybrides α/γ et, finalement, effectuer les études structurales des oligomères synthétisés afin de déterminer l'impact de la configuration des acides β,γ-diaminés dans la structure secondaire de ces peptides hybrides.

Tout d'abord, nous avons essayé d'appliquer la stratégie de synthèse déjà développée dans notre laboratoire pour synthétiser les acides β,γ-diaminés issus de la leucine et de la phénylalanine. Cependant, à cause des faibles rendements ou de la non reproductibilité de certaines étapes de la synthèse initiale, les produits finaux n'ont pas été obtenus. La stratégie a donc été modifiée en effectuant la réaction de Blaise sur le nitrile monoprotégé afin d'obtenir l'énamine sous forme ouverte (Schéma 51).

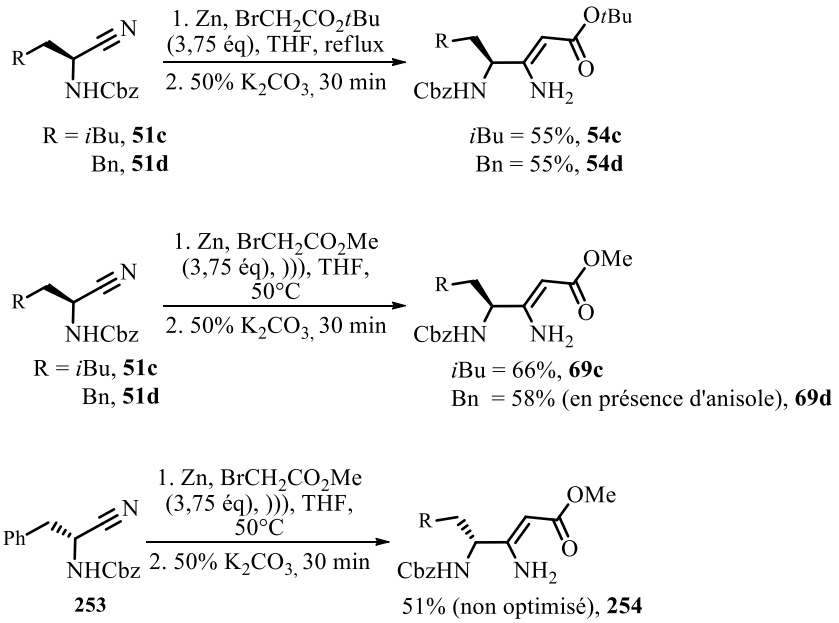


Schéma 51 : Réaction de Blaise avec le bromoacétate de tert-butyle (en haut) et bromoacétate de méthyle (en bas)

Des meilleurs rendements de 66% dans le cas de la série leucine et 58% et 51% dans le cas de la série respectivement L- et D-phénylalanine ont pu être obtenus pour la réaction de Blaise avec le bromoacétate de méthyle dans un bain à ultrasons. Il faut remarquer que la présence d'additifs possédant une paire d'électrons libres (anisole) ralentit la vitesse de la réaction mais conduit à des bruts réactionnels beaucoup plus propres avec un meilleur rendement en énamine.

La réduction par $NaBH_3CN$ conduit à un mélange des deux diastéréomères séparables par chromatographie sur gel de silice. Cette étape permet d'obtenir le diastéréomère '*trans*' désiré en majorité, ce qui n'était pas le cas dans l'ancienne stratégie (Schéma 52). La déprotection de l'ester *t*Bu suivie par la protection par Boc donne l'acide β,γ-diaminé avec deux amines protégées orthogonalement.

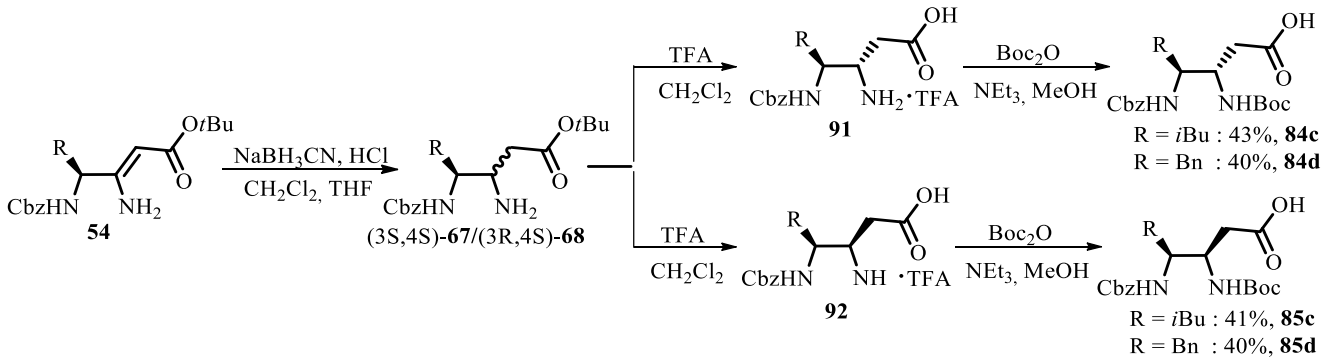


Schéma 52 : Voie de synthèse à partir de l'énamine 54 issue de la réaction de Blaise avec le bromoacétate de *tert*-butyle

Nous avons d'abord élaboré une stratégie de synthèse présentée sur le Schéma 53. Cependant, la séparation des diastéréomères après l'étape de réduction a posé quelques problèmes. Nous avons donc décidé de continuer la synthèse avec le dérivé de l'ester méthylique, ce qui a permis de séparer facilement les produits à la dernière étape (Schéma 53).

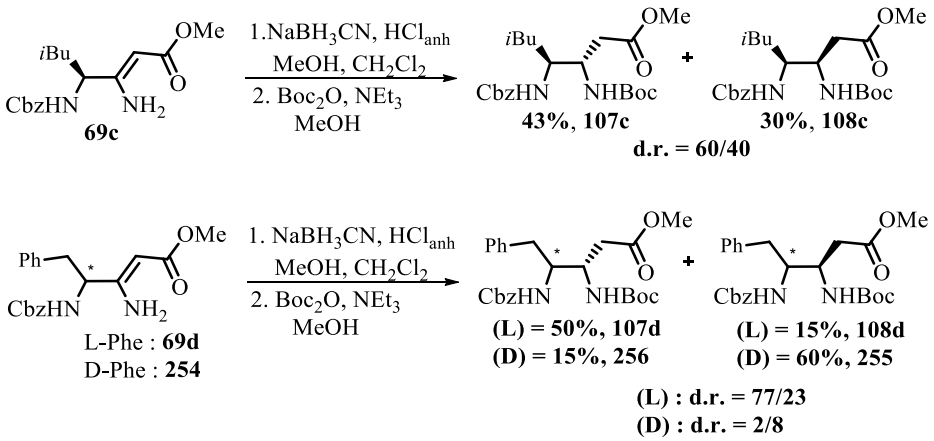


Schéma 53 : Réduction de l'énamine issue de la L-leucine et de la L-phénylalanine

Nous avons réussi à synthétiser les produits désirés en 6 étapes (en 5 étapes dans le cas de D-phénylalanine car nous avons commencé à partir d'acide aminé déjà protégé) au lieu de 11 et avec un bon rendement global de 48% en série leucine et respectivement 38% et 26% en série L- et D-phénylalanine. Toutes les réactions sont reproductibles, faciles à mettre en place et donnent de très bons

rendements. La nouvelle stratégie de synthèse nous permet d'obtenir la (3S,4S)-déoxyaminostatine orthogonalement protégée.

Ensuite, la déoxyaminostatine protégée a été utilisée dans la synthèse en solution de nouveaux peptides hybrides α/γ comportant des acides α-aminés L ou D (Figure 132):

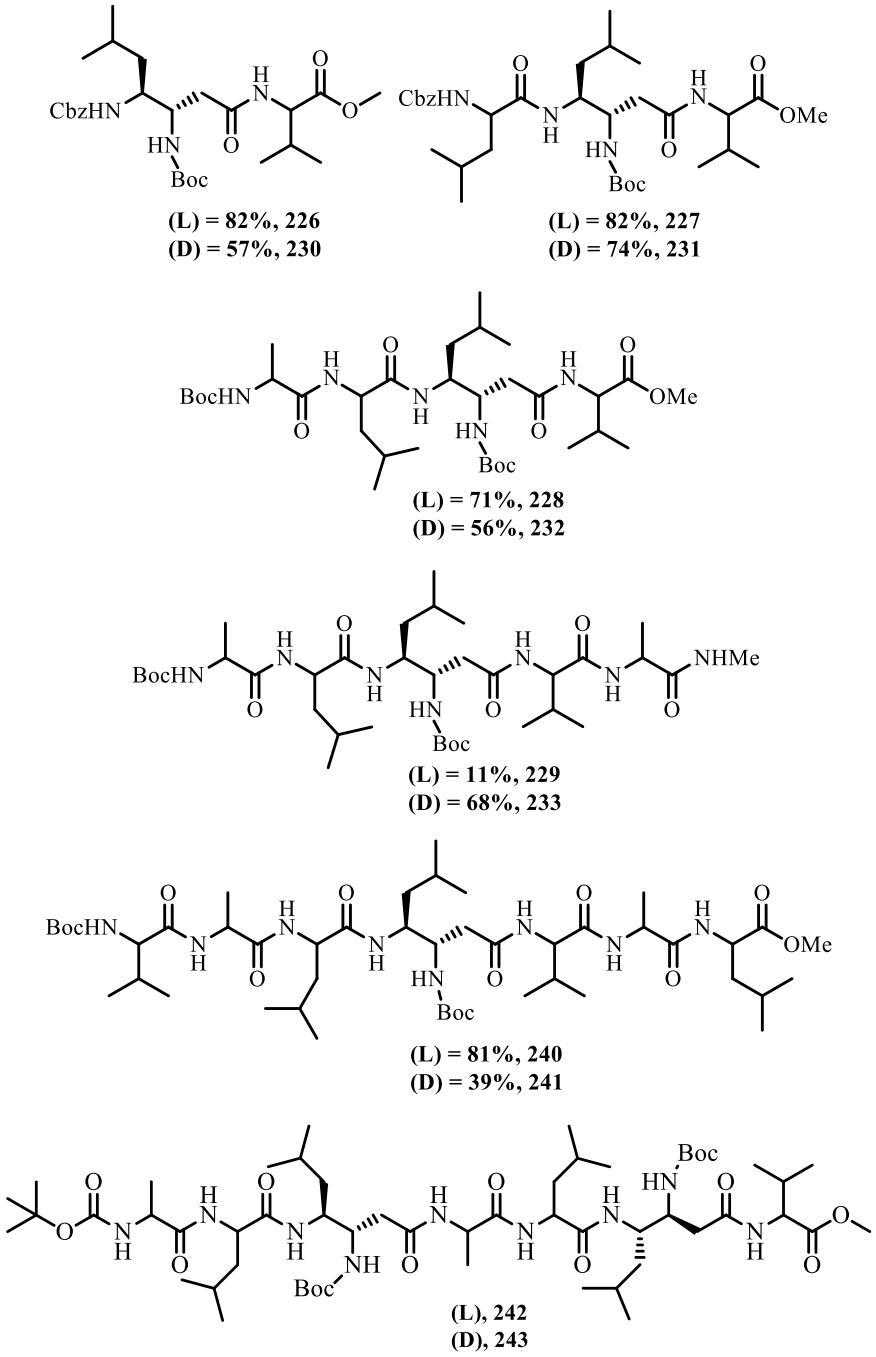


Figure 132 : Peptides synthétisés au cours de la thèse

Tous les peptides synthétisés sont bien solubles dans les solvants organiques polaires (CH_2Cl_2, $CHCl_3$, AcOEt et MeOH) et non solubles dans les solvants organiques apolaires (cyclohexane, toluène,

pentane), l'éther et l'eau. Nous avons rencontré un problème de purification des heptapeptides **242 (L)** et **243 (D)** comportant deux acides β,γ-diaminés. Ils sont en cours de purification par HPLC phase inverse.

Par la suite, nous avons effectué les études structurales des di-, tri- et tétrapeptides. La diffraction des rayons X a montré que le dipeptide **226** existe sous forme d'empilement et adopte une structuration sous forme de feuillet β stabilisé par des liaisons hydrogènes intermoléculaires (Figure 133).

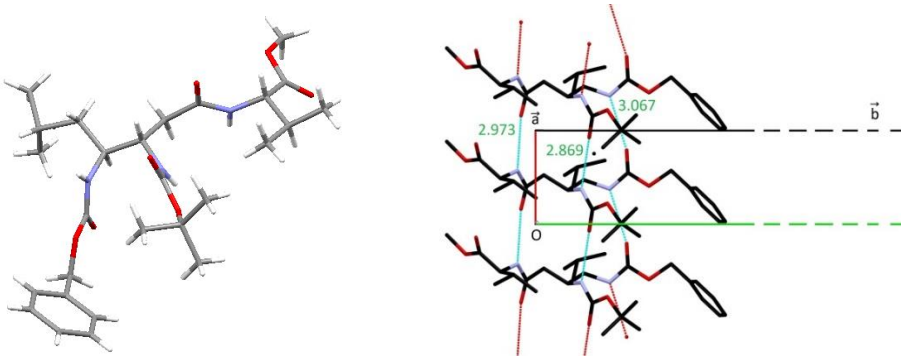


Figure 133 : Structure RX du dipeptide 226 et empilement de plusieurs dipeptides dans une maille de monocristal

Grâce aux analyses RMN couplées à la modélisation moléculaire sous contraintes nous avons pu mettre en évidence le repliement particulier du tripeptide **227** stabilisé par des liaisons hydrogènes formant des boucles à 7 et à 12 atomes (Figure 134).

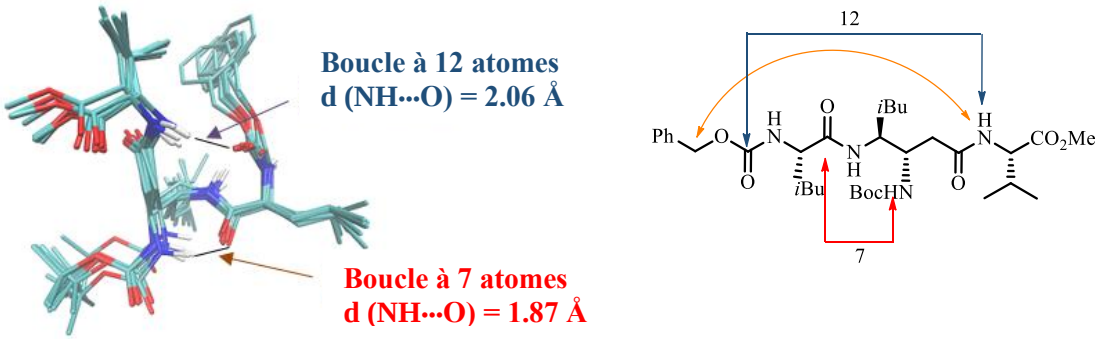


Figure 134 : Dix structures de plus basse énergie du tripeptide 227 issues du recuit simulé et représentation des tâches NOE observées (flèches arrondies) avec les liaisons hydrogènes (flèches carrées)

Ensuite, des analyses RMN poussées ont été réalisées pour étudier la structuration du tétrapeptide **228**. Il adopte un repliement stable et bien défini, stabilisé par des liaisons hydrogènes formant des

boucles à 12, 13 et 10 atomes (Figure 135). Il faut remarquer que les deux NH de l'acide β,γ-diaminé participent à la formation de liaisons H en formant une liaison hydrogène à trois centres. Ceci est un analogue de la liaison à trois centres observée dans le cas d'oligourées.

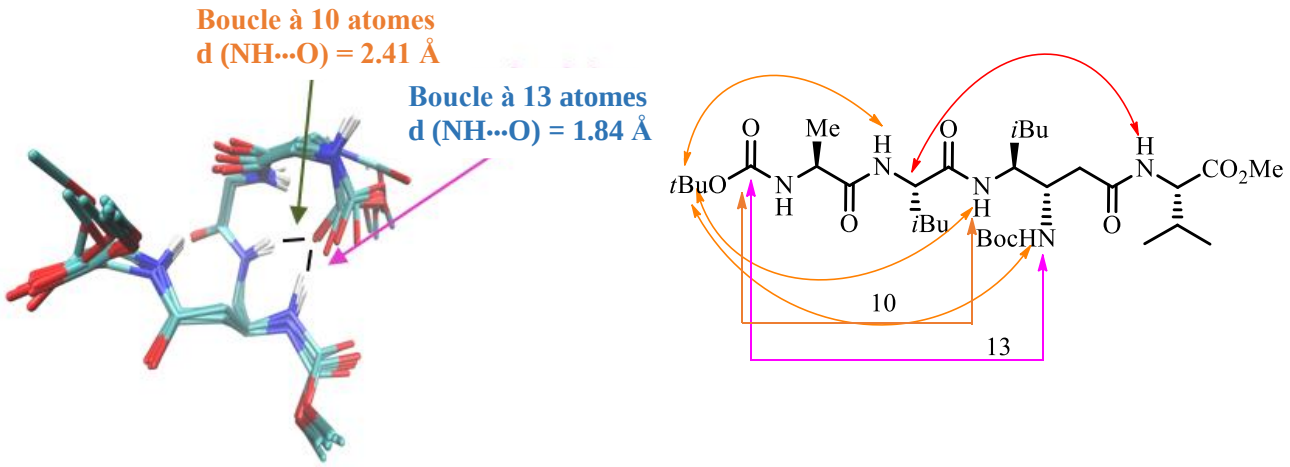


Figure 135 : Dix structures de plus basse énergie du tétrapeptide 228 issues du recuit simulé (à gauche) et représentation des tâches NOE observées (flèches arrondies) avec les liaisons hydrogènes (flèches carrées) (à droite)

La dynamique moléculaire de l'heptapeptide **240** a montré qu'en allongeant la chaine carbonée, nous favorisons la formation d'une hélice-(*P*) stabilisée par des liaisons H déjà observées dans la structure du tétrapeptide **228** (12,10 et 13) et aussi par des liaisons hydrogènes intramoléculaires supplémentaires à 10 et à 12 atomes (Figure 136). Il faut souligner que les liaisons hydrogènes à trois atomes, établies par l'acide β,γ-diaminé, sont toujours présentes dans la structure de l'heptapeptide **240**.

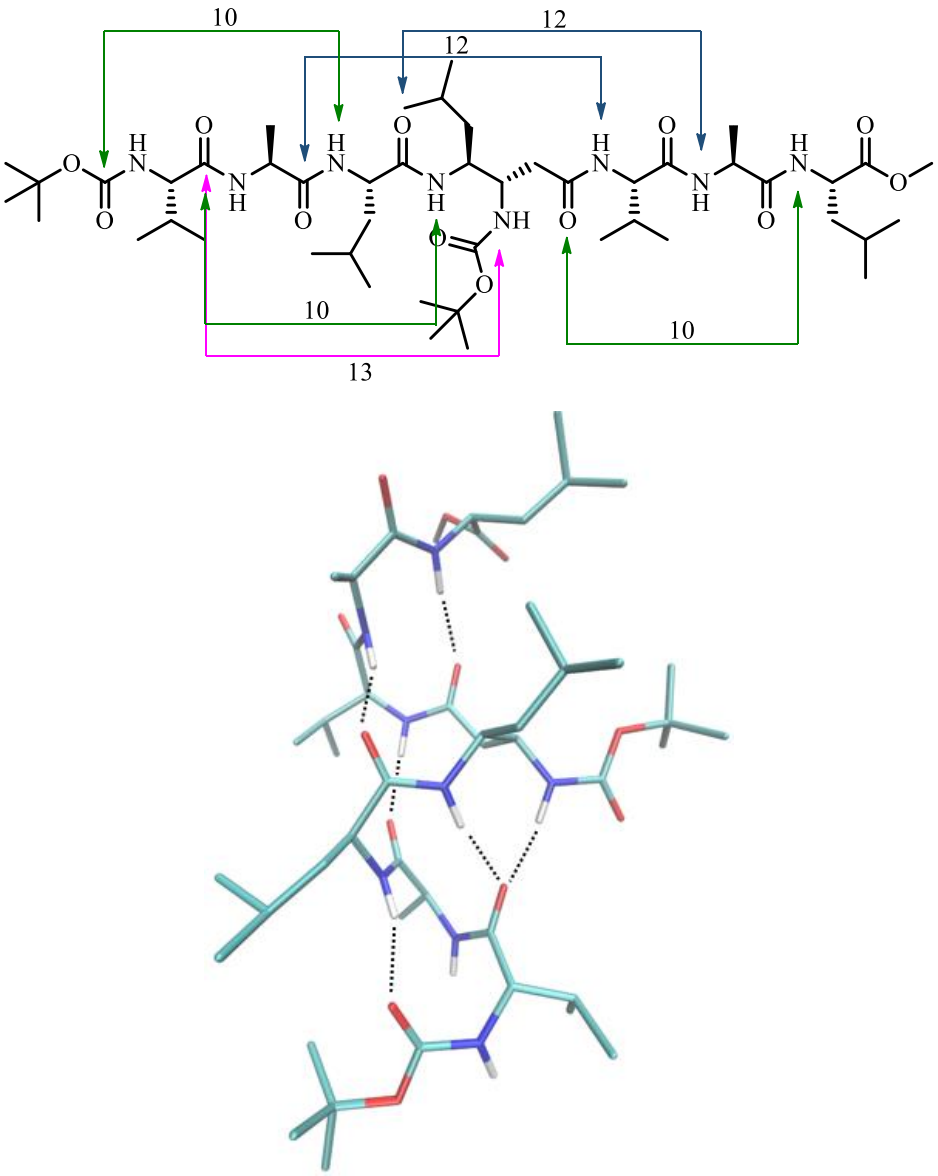


Figure 136 : Structure de l'heptapeptide 240 en forme d'hélice issue de la dynamique moléculaire

Après avoir étudié les peptides contenant les acides α-aminés L, nous avons effectué les études structurales de leurs analogues en configuration D. Malgré les résultats encourageants obtenus dans la série précédente, le tripeptide **231** et le tétrapeptide **232** ne semblent pas adopter de structure secondaire stable bien définie. Les analyses RMN à basse température ont montré que le tripeptide **231** existe sous forme repliée, cependant, en chauffant la structure n'est pas stable et elle se casse.

Les travaux effectués et présentés dans ce travail montrent l'intérêt pratique des acides β,γ-diaminés en synthèse organique et notamment dans la création des nouveaux peptides non-naturels capables d'adopter une structure secondaire stable.

La nouvelle voie de synthèse élaborée dans notre laboratoire est rapide et facile à mettre en route, et a montré son efficacité dans la synthèse en série leucine et en série phénylalanine. Il est envisagé de

l'appliquer à d'autres acides aminés comportant des chaînes latérales fonctionnalisées. Cette voie permet d'obtenir deux diastéréomères, mais dans les perspectives nous envisageons effectuer une réduction diastéréoséléctive. De plus, il serait intéressant de tester de nouvelles conditions de la réaction de Blaise afin d'améliorer le rendement et d'introduire différents substituants en position α.

Comme nous l'avons montré, les peptides en série L comportant un acide β,γ-diaminé issu de la L-leucine possèdent une forte capacité à adopter une structure secondaire. Cependant, les analogues constitués d'acides α-aminés de configuration D n'adoptent aucune conformation définie. En perspective, nous effectuerons les études structurales des penta- et heptapeptides correspondants afin de définir l'influence de l'allongement sur la structuration. De plus, il serait également intéressant de synthétiser et d'étudier les homooligomères comportant seulement les acides β,γ-diaminés ou les peptides α/γ alternés avec des acides α-aminés.

De plus, nous avons utilisé l'acide β,γ-diaminé **255** issu de la D-phénylalanine dans la synthèse d'un analogue de la gramicidine S dans lequel les D-Phe-D-Pro ont été remplacés par le motif acide β,γ-diaminé issu de la D-phénylalanine. L'octapeptide protégé **261** a été synthétisé en solution en 9 étapes avec un rendement de 5% (non optimisé). Actuellement l'octapeptide **261** est en cours de purification par HPLC phase inverse. Après avoir obtenu le produit pur, nous allons effectuer la déprotection des groupements Boc par l'acide trifluoroacétique afin d'obtenir l'analogue de la gramicidine S **262**.

Enfin, en perspective nous souhaiterons d'effectuer les tests biologiques des peptides synthétisés pour évaluer leur capacité à inhiber des interactions protéine-protéine ou comme CPPs. L'octapeptide **262** sera testé afin d'évaluer son activité biologique, notamment l'activité antibiotique et hémolytique.

Partie expérimentale

General Information

Unless otherwise stated, all reactions were carried out under air atmosphere. Tetrahydrofuran was distilled under argon over sodium-benzophenone. Dichloromethane was distilled under argon over CaH_2. Unless otherwise noted, all reagent-grade chemicals and other solvents were obtained from commercial suppliers and were used as received.

Reactions were monitored with analytical thin-layer chromatography (TLC) on silica gel 60 F_{254} plates and visualized under UV (254 nm) and/or by solution of phosphomolybdic acid in EtOH or $KMnO_4$ solution followed by heating.

Flash chromatography were performed on silica gel (Chromagel Si60ACC [70-200 μm]) as stationary phase.

^{1}H NMR spectra were recorded on Bruker AC_{250} (250 MHz), Bruker DRX_{300} (300 MHz), Bruker AM_{360} (360 MHz), Bruker AM_{360} (400 MHz) instruments; chemical shifts (δ) are given in parts per million with respect to the residual protonated solvent (δ = 7.26 ppm for $CDCl_3$, 2.50 ppm for DMSO-*d*$_6$, 3.31 ppm for CD_3OD, 2.05 for Acetone-*d*$_6$ and 5.32 for CD_2Cl_2), which served as an internal standard. ^{13}C NMR spectra were recorded on Bruker AC_{250} (62.9 MHz), DRX_{300} (75.5 MHz) and AM_{360} (90.5 MHz) instruments; chemical shifts are expressed with respect to the deuterated solvent (δ = 77.16 ppm for $CDCl_3$, 39.52 ppm for DMSO-*d*$_6$, 49.00 ppm for CD_3OD, 29.84 for Acetone-*d*$_6$ and 53.84 for CD_2Cl_2). Coupling constant(s) in hertz (Hz) were measured from one-dimensional spectra and multiplicities were abbreviated as following: br (broad), s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), m (multiplet).

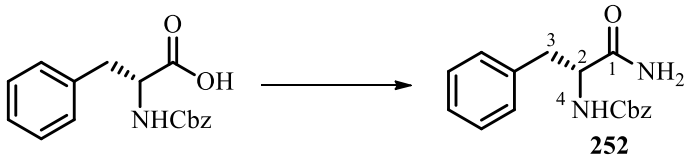
Infrared spectra were recorded as thin films on Sodium chloride plates. High resolution mass spectra (HRMS) were recorded using Electrospray Ionization (ESI) method with a Bruker Daltonics MicrOTOF-Q instrument.

Specific rotation $[\alpha]_D$ was recorded on Perkin-Elmer 241 with a sodium D line.

Synthesis of β/γ-diaminoacid:

Amide formation

(R)-benzyl (1-amino-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)carbamate 252



Mr = 298.13 g/mol

$C_{17}H_{18}N_2O_3$

The Cbz-protected D-phenylalanine (1.25 g; 4.2 mmol) was dissolved in tetrahydrofuran (12.4 mL). Triethylamine (0.6 mL; 4.6 mmol) was added at 0°C under argon atmosphere. The resulting mixture was stirred for 15 minutes at 0°C. Then the ethyl chloroformate (0.4 mL; 4.6 mmol) was added and the solution was stirred for 30 minutes at 0°C. The reaction was treated with 1:1 tetrahydrofuran/30% ammoniac aqueous solution (5.0 mL) and was stirred for 30 minutes at 0°C. Water was added to the mixture and mixture was extracted with dichloromethane. The organic layer was dried with anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was washed with diethyl ether to give a white solid in 74% yield (950 mg).

RMN H^1 250 MHz MeOD δ (ppm) : 2.85 (dd, *J* = 13.7 Hz, 9.6 Hz ; H_3 ; 1H) ; 3.14 (dd, *J* = 13.7 Hz, 5.3 Hz ; H_3 ; 1H) ; 4.38 (dd, *J* = 9.6 Hz, 5.3 Hz ; H_2 ; 1H) ; 4.96 (d, *J* = 12.5 Hz ; H_{Cbz} ; 1H) ; 5.04 (d, *J* = 12.5 Hz ; H_{Cbz} ; 1H) ; 7.17-7.34 (m ; H_{ar} ; 10H)

RMN C^{13} 90 MHz MeOD δ (ppm) : 39.4 (C_3) ; 57.7 (C_2) ; 67.7 (C_{Cbz}) ; 127.8 (C_{Ar}) ; 128.8 (C_{Ar}) ; 129.1 (C_{Ar}) ; 129.6 (C_{Ar}) ; 129.6 (C_{Ar}) ; 130.5 (C_{Ar}) ; 138.3 ($C_{q\ Ar}$) ; 138.7 ($C_{q\ Ar}$) ; 158.3 ($C_{CO\ Cbz}$) ; 176.9 (C_1)

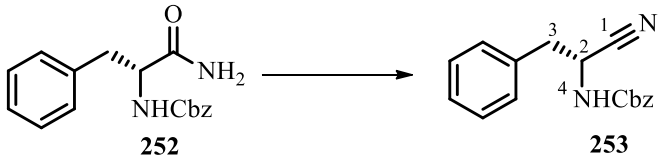
HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 299.1396 found $M+H^+$ = 299.1386 $M+Na^+$ = 321.1197

IR ν (cm^{-1}): 3418, 3318, 3273, 3199, 3032, 2966, 2926, 1692, 1650, 1534.

$[\alpha]_D^{27}$ = -4.2 (c = 0.5, MeOH)

Nitrile formation

(R)-benzyl (1-amino-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)carbamate 253



Mr = 280.12 g/mol

$C_{17}H_{16}N_2O_2$

To the solution of **252** (0.95 g; 3.2 mmol) and Et_3N (0.32 mL) in tetrahydrofuran (15.8 mL) the trifluoroacetic anhydride (0.87 mL) was added at 0°C under argon atmosphere. The resulting mixture was stirred for 1 hour at 0°C, then the solvent was evaporated and the residue was dissolved in dichloromethane. The solution was washed with 6N HCl, saturated $NaHCO_3$ aqueous solution and saturated sodium chloride aqueous solution. The organic layer was dried with anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give a white solid in 93% yield (832 mg).

RMN H^1 360 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 2.95 (dd, *J* = 13.9 Hz, 7.0 Hz ; H_3 ; 1H) ; 3.02 (dd, *J* = 13.9 Hz, 6.0 Hz ; H_3 ; 1H) ; 4.75-4.83 (m ; H_2 ; 1H) ; 4.97- 4.99 (m ; H_4 ; 1H) ; 5.02 (s ; H_{Cbz} ; 2H) ; 7.15-7.32 (m ; H_{ar} ; 10H)

RMN C^{13} 90 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 39.2 (C_3) ; 44.0 (C_2) ; 67.9 (C_{Cbz}) ; 118.2 (C_1) ; 128.2 (C_{Ar}) ; 128.5 (C_{Ar}) ; 128.7 (C_{Ar}) ; 128.8 (C_{Ar}) ; 129.3 (C_{Ar}) ; 129.7 (C_{Ar}) ; 133.8 (C_q Ar) ; 135.7 ($C_{q\ Ar}$) ; 155.1 ($C_{CO\ Cbz}$)

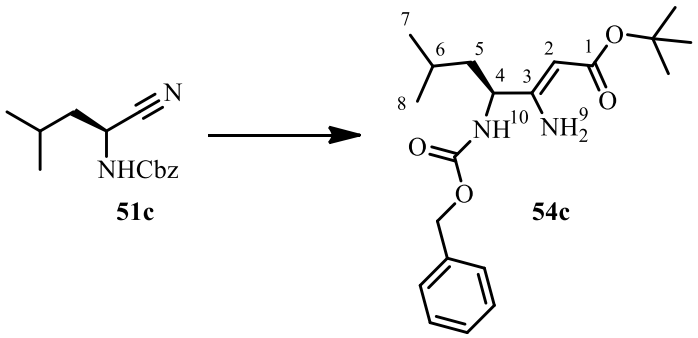
HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 281.1285 found $M+H^+$ = 281.1288 $M+Na^+$ = 303.1101

IR ν (cm^{-1}): 3324, 3034, 2244, 1721, 1659, 1534.

$[\alpha]_D^{28}$ = 52.4 (c = 0.5, MeOH)

Blaise reaction

(S,Z)-benzyl (5-amino-2,9,9-trimethyl-7-methylenedec-5-en-4-yl)carbamate 54c



Mr = 362.44 g/mol

$C_{20}H_{30}N_2O_4$

A suspension of zinc powder (160 mg; 2.5 mmol) in distilled tetrahydrofuran (0.4 mL) is heated to reflux under argon atmosphere. Several drops of tert-butyl bromoacetate and 1,2-dibromoethane were added to the solution to activate the reaction. The addition of the solution of aminonitrile **51c** (100 mg; 0.36 mmol) in distilled tetrahydrofyran (1 mL) was followed by dropwise addition of tert-butyl bromoacetate (0.2 mL; 1.3 mmol) in distilled tetrahydrofuran (0.4 mL). The resulting mixture was refluxed for 1 hour then cooled to the room temperature. The solution was treated with 50% potassium carbonate aqueous solution (10mL) and stirred for 30 min at room temperature. Then the reaction mixture was filtered on celite and extracted with diethyl ether. The organic layer was dried with anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography with heptane/ethyl acetate (8/2) to give a slightly yellow product **54c** in 55% yield (81 mg).

RMN H^1 250 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 0.91 (d, *J*=6.6 Hz ; H_7 and H_8 ; 6H) ; 1.45 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 1.43-1.49 (m ; H_5 ; 2H) ; 1.52-1.65 (m ; H_6 ; 1H) ; 4.01-4.10 (m ; H_4 ; 1H) ; 4.51 (s ; H_2 ; 1H) ; 4.82 (d, *J*=7.1 Hz ; H_{10} ; 1H) ; 5.08 (s ; H_{Cbz} ; 2H) ; 5.91-6.68 (sl ; H_9 ; 2H) ; 7.30-7.35 (m ; H_{ar} ; 5H)

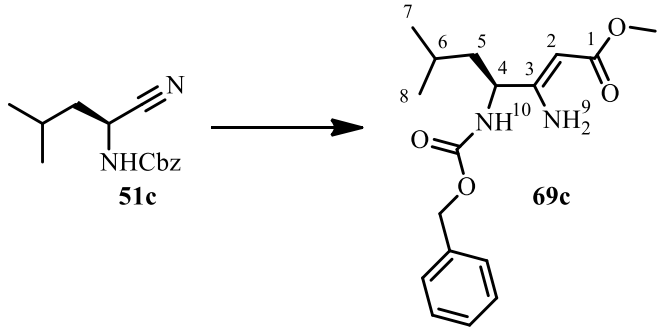
RMN C^{13} 63 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 21.9 (C_7 or C_8) ; 23.1 (C_7 or C_8) ; 24.9 (C_6) ; 28.7 (C_{tBu}) ; 43.0 (C_5) ; 53.7 (C_4) ; 67.3 (C_{Cbz}) ; 78.6 ($C_{q\ tBu}$) ; 84.0 (C_2) ; 128.1 (C_{Ar}) ; 128.2 (C_{Ar}) ; 128.6 (C_{Ar}) ; 136.3 ($C_{q\ Ar}$) ; 156.3 (C_3) ; 162.9 (CO_{Cbz}) ; 170.3 (C_1)

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 363.2284 found $M+H^+$ = 363.2278

IR ν (cm^{-1}): 3351, 3177, 2960, 1720, 1700, 1548

$[\alpha]_D^{20}$ = -16.1 (c=0.09, MeOH)

(S,Z)-methyl 3-amino-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-6-methylhept-2-enoate 69c



Mr = 320.17 g/mol

$C_{17}H_{24}N_2O_4$

A suspension of zinc powder (950 mg; 14.5 mmol) with aminonitrile **51c** (500 mg; 2.0 mmol) in distilled tetrahydrofuran (6.0 mL) under argon atmosphere was placed in ultrasonic bath at 50ºC. The methyl bromoacetate (0.7 mL; 7.5 mmol) in distilled tetrahydrofuran (1.25 mL) was added dropwise to the sonificated solution. The resulting mixture was sonificated for 1 hour at 50 ºC then cooled to room temperature. The solution was treated with 50% potassium carbonate aqueous solution (10mL) and stirred for 30 min at room temperature. Then the reaction mixture was filtered on celit and extracted with a diethyl ether. The organic layer was dried with anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography with cyclohexane/ethyl acetate (7/3) to give a slightly yellow product **69c** in 66% yield (430 mg).

RMN H^1 250 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 0.82 (d, *J*=6.6 Hz ; H_7 or H_8 ; 6H) ; 1.38-1.46 (m ; H_5 ; 2H) ; 1.50-1.65 (m, *J* = 6.6 Hz ; H_6 ; 1H) ; 3.54 (s ; Me ; 3H) ; 3.98-4.10 (m ; H_4 ; 1H) ; 4.56 (s ; H_2 ; 1H) ; 5.00 (s ; H_{Cbz} ; 2H) ; 5.33 (d, *J*=7.1 Hz ; H_{10} ; 1H) ; 5.83-6.86 (sl ; H_9 ; 2H) ; 7.19-7.28 (m ; H_{ar} ; 5H)

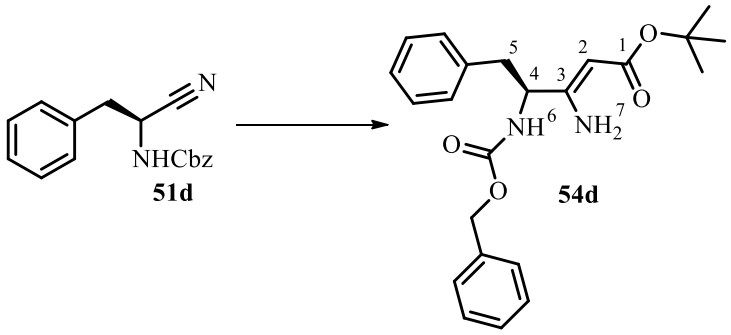
RMN C^{13} 63 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 21.9 (C_7 or C_8) ; 22.9 (C_7 or C_8) ; 24.9 (C_6) ; 43.0 (C_5) ; 50.4 (C_{Me}) ; 53.7 (C_4) ; 67.3 (C_{Cbz}) ; 81.6 (C_2) ;128.3 (C_{Ar}) ; 128.4 (C_{Ar}) ; 128.7 (C_{Ar}) ; 136.2 ($C_{q\ Ar}$) ; 156.3 (C_3) ; 164.1 (CO_{Cbz}) ; 170.8 (C_1)

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 321.1814 found $M+H^+$ = 321.1806 $M+Na^+$ = 343.1635

IR ν (cm^{-1}): 3455, 3335, 2956, 1706, 1653, 1625, 1566.

$[\alpha]_D^{20}$ = -162.1 (c = 0.1, MeOH)

(S,Z)-benzyl (5-amino-2,9,9-trimethyl-7-methylenedec-5-en-4-yl)carbamate 54d



Mr = 396.20 g/mol

$C_{23}H_{28}N_2O_4$

A suspension of zinc powder (160 mg; 2.5 mmol) in distilled tetrahydrofuran (1.4 mL) was heated to reflux under argon atmosphere. Several drops of tert-butyl bromoacetate and 1,2-dibromoethane were added to the solution to activate the reaction. The addition of the solution of aminonitrile **51d** (100 mg; 0.36 mmol) in distilled tetrahydrofuran (0.27 mL) was followed by dropwise addition of tert-butyl bromoacetate (0.26 mL; 1.3 mmol) in distilled tetrahydrofuran (0.28 mL). The resulting mixture was refluxed for 1 hour than cooled to the room temperature. The solution was treated with 50% potassium carbonate aqueous solution (6 mL) and stirred for 30 min at room temperature. Than reaction mixture was filtered on celite and extracted with diethyl ether. The organic layer was dried with anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography with heptane/ethyl acetate (8/2) to give a slightly yellow product **54d** in 50% yield (65 mg).

RMN H^1 300 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 1.46 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 2.88-2.94 (m ; H_5 ; 1H) ; 3.07 (dd, *J*=14.1 Hz, 5.5 Hz ; H_5 ; 1H) ; 4.22-4.31 (m ; H_4 ; 1H) ; 4.60 (s ; H_2 ; 1H) ; 4.8 (sl ; H_6 ; 1H) ; 5.02 (s ; H_{Cbz} ; 2H) ; 5.9-6.9 (sl ; H_7 ; 2H) ; 7.3-7.4 (m ; H_{ar} ; 5H)

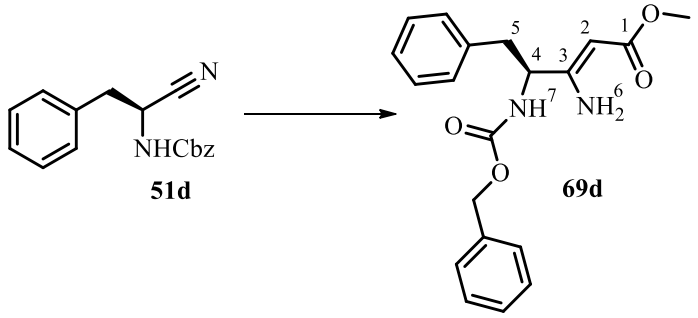
RMN C^{13} 63 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 28.5 (C_{tBu}) ; 44.0 (C_5) ; 56.3 (C_4) ; 66.9 (C_{Cbz}) ; 78.4 ($C_{q\ tBu}$) ; 84.0 (C_2) ; 127.7 (C_{Ar}) ; 128.3 (C_{Ar}) ; 128.4 (C_{Ar}) ; 128.7 (C_{Ar}) ; 128.9 (C_{Ar}) ; 129.3 (C_{Ar}) ; 136.0 ($C_{q\ Ar}$) ; 136.7 ($C_{q\ Ar}$) ; 156.0 (C_3) ; 162.0 (CO_{Cbz}) ; 170.1 (C_1)

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 397.2127 found $M+H^+$ = 397.2104 $M+Na^+$ = 419.1917

IR ν (cm^{-1}): 3465, 3335, 3259, 3063, 2971, 1700, 1653, 1625, 1536.

$[\alpha]_D^{20}$ = -10.8 (c = 0.5, MeOH)

(S,Z)-methyl 3-amino-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-phenylpent-2-enoate 69d



Mr = 354.16 g/mol

$C_{20}H_{22}N_2O_4$

A suspension of zinc powder (163 mg; 2.5 mmol) with aminonitrile **51d** (100 mg; 0.4 mmol) and anisol (39 mg; 0.4 mmol) in distilled tetrahydrofuran (1.7 mL) under argon atmosphere was placed in ultrasonic bath at 50°C. The methyl bromoacetate (0.157 mL; 1.3 mmol) in distilled tetrahydrofuran (0.3 mL) was added dropwise to the sonificated solution. The resulting mixture was sonificated for 1 hour at 50 °C then cooled to the room temperature. The solution was treated with 50% potassium carbonate aqueous solution (6 mL) and stirred for 30 min at room temperature. Then the reaction mixture was filtered on celite and extracted with diethyl ether. The organic layer was dried with anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography with cyclohexane/ethyl acetate (7/3) to give the slightly yellow product **69d** in 55% yield (69 mg).

RMN H^1 360 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 2.83 (dd, *J* = 13.9 Hz, 7.9 Hz ; H_5 ; 1H) ; 2.93 (dd, *J* = 13.9 Hz, 5.5 Hz ; H_5 ; 1H) ; 3.54 (s ; H_{Me} ; 3H) ; 4.22-4.31 (m ; H_4 ; 1H) ; 4.57 (s ; H_2 ; 1H) ; 4.93 (s ; H_{Cbz} ; 2H) ; 5.14-5.26 (sl ; H_7 ; 1H) ; 6.09-6.78 (sl ; H_6 ; 2H) ; 7.04-7.27 (m ; H_{Ar} ; 10H)

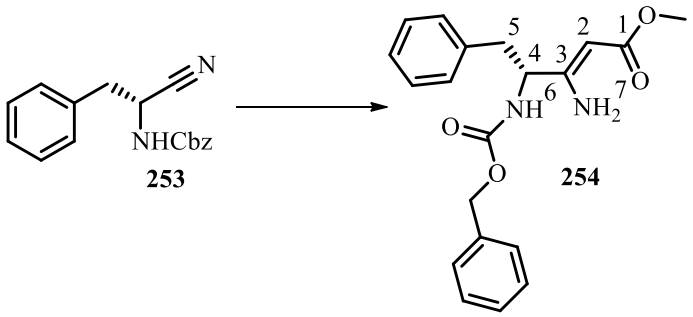
RMN C^{13} 75 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 43.0 (C_5) ; 50.5 (C_{Me}) ; 56.4 (C_4) ; 67.3 (C_{Cbz}) ; 82.1 (C_2) ; 127.3 (C_{Ar}) ; 128.2 (C_{Ar}) ; 128.4 (C_{Ar}) ; 128.7 (C_{Ar}) ; 128.9 (C_{Ar}) ; 129.2 (C_{Ar}) ; 136.1 ($C_{q\ Ar}$) ; 136.4 ($C_{q\ Ar}$) ; 156.1 (C_3) ; 163.1 (CO_{Cbz}) ; 170.8 (C_1)

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 355.1658 found $M+H^+$ = 355.1644 $M+Na^+$ = 377.1460

IR ν (cm^{-1}): 3428, 3366, 3220, 3028, 2941, 1721, 1668, 1612, 1580, 1530.

$[\alpha]_D^{27}$ = -24.8 (c = 0.5, MeOH)

(R,Z)-tert-butyl 3-amino-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-phenylpent-2-enoate 254



Mr = 354.16 g/mol

$C_{23}H_{28}N_2O_4$

A suspension of zinc powder (654 mg; 10.0 mmol) with aminonitrile **253** (400 mg; 1.4 mmol) in distilled tetrahydrofuran (6.8 mL) under argon atmosphere was placed in ultrasonic bath at 50ºC. The methyl bromoacetate (0.63 mL; 5.4 mmol) in distilled tetrahydrofuran (1.2 mL) was added dropwise to the sonificated solution. The resulting mixture was sonificated for 1 hour at 50ºC then cooled to the room temperature. The solution was treated with 50% potassium carbonate aqueous solution (10mL) and stirred for 30 min at room temperature. Then the reaction mixture was filtered on celite and extracted with diethyl ether. The organic layer was dried with anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography with cyclohexane/ethyl acetate (7/3) to give the slightly yellow solid **254** in 51% yield (256 mg). Conversion rate is 81%.

RMN H^1 300 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 2.75 (dd, *J* = 13.8 Hz, 8.8 Hz ; H_5 ; 1H) ; 2.86 (dd, *J* = 13.8 Hz, 4.7 Hz ; H_5 ; 1H) ; 3.48 (s ; H_{Me} ; 3H) ; 4.19- 4.33 (m ; H_4 ; 1H) ; 4.57 (s ; H_2 ; 1H) ; 4.85 (s ; H_{Cbz} ; 2H) ; 5.69 (d, *J* = 6.4 Hz ; H_6 ; 1H) ; 5.94-6.72 (sl ; H_7 ; 2H) ; 6.99-7.18 (m ; H_{ar} ; 10H)

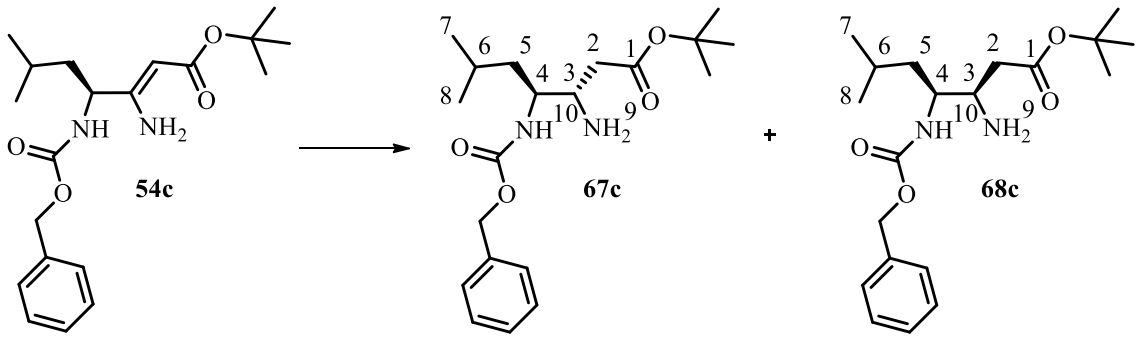
RMN C^{13} 75 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 40.0 (C_5) ; 50.3 (C_{Me}) ; 56.3 (C_4) ; 67.0 (C_{Cbz}) ; 81.7 (C_2) ; 126.9 (C_{Ar}) ; 127.9 (C_{Ar}) ; 128.1 (C_{Ar}) ; 128.5 (C_{Ar}) ; 128.6 (C_{Ar}) ; 129.0 (C_{Ar}) ; 136.0 ($C_{q\ Ar}$) ; 136.5 ($C_{q\ Ar}$) ; 156.1 (C_3) ; 163.2 (CO_{Cbz}) ; 170.7 (C_1)

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 355.1658 found $M+H^+$ = 355.1638 $M+Na^+$ = 377.1458

IR ν (cm^{-1}): 3428, 3367, 3221, 3027, 2941, 1721, 1667, 1622, 1580, 1530.

Reduction by sodium cyanoborohydride

(3S,4S)-tert-butyl 3-amino-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-6-methylheptanoate 67c and (3R,4S)-tert-butyl 3-amino-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-6-methylheptanoate 68c



Mr = 364.48 g/mol

$C_{20}H_{32}N_2O_4$

Preparation of anhydrous 2N hydrochloric acid:

Acetyl chloride (0.3 mL; 4.7 mmol) was added slowly to methanol (2 mL) under argon atmosphere at 0°C. Anhydrous 2N hydrochloric acid was directly added to a reaction mixture.

Reduction:

To a solution of enaminoester **54c** (1.6 g; 4.4 mmol) in a mixture of anhydrous dichloromethane (60 mL) and anhydrous methanol (20 mL) was added an anhydrous 2N hydrochloric acid (15 mL) under argon atmosphere at -78°C. The sodium cyanoborohydride was solubilized in anhydrous methanol (10 mL) and added to a solution of enaminoester **54c**. The resulting mixture was stirred for 30 minutes at -78°C, then 2 h at room temperature. The resulting mixture was quenched with a 2N sodium hydroxide aqueous solution to basic pH and a saturated solution of sodium chloride was added to solution. The organic layer was extracted by dichloromethane, dried with anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography with cyclohexane/ethyl acetate (3/7) to give the slightly yellow separated solid products **67c** and **68c** in 37% (595 mg) and 22% (354 mg) yields respectively.

(3S,4S)-tert-butyl 3-amino-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-6-methylheptanoate 67c :

RMN H^1 360 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 0.84 (d, *J*=6.1 Hz ; H_7 or H_8 ; 3H) ; 0.86 (d, *J*=6.1 Hz ; H_7 or H_8 ; 3H) ; 1.10-1.18 (m ; H_5 ; 2H) ; 1.38 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 1.47-1.59 (m ; H_6 ; 1H) ; 2.17 (dd, *J*=16.0, 9.6 Hz ; H_2 ; 1H) ; 2.37 (dd, *J*=16.0, 3.5 Hz ; H_2 ; 1H) ; 3.11-3.16 (m ; H_3 ; 1H) ; 3.54-3.61 (m ; H_4 ; 1H) ; 5.0 (s ; H_{Cbz} ; 2H) ; 5.7 (d, *J* = 9.7 Hz ; H_{10} ; 1H) ; 7.21-7.25 (m ; H_{ar} ; 5H)

RMN C^{13} 90 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 21.9 (C_7 or C_8) ; 23.1 (C_7 or C_8) ; 24.6 (C_6) ; 27.9 (C_{tBu}) ; 40.4 (C_5) ; 41.7 (C_2) ; 51.0 (C_3) ; 52.8 (C_4) ; 66.2 (C_{Cbz}) ; 80.4 ($C_{q\ tBu}$) ; 127.7 (C_{Ar}) ; 128.2 (C_{Ar}) ; 128.0 (C_{Ar}) ; 136.6 ($C_{q\ Ar}$) ; 156.4 (CO_{Cbz}) ; 171.6 (C_1)

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 365.2440 found $M+H^+$ = 365.2435

IR (cm^{-1}): 3352, 3199, 2960, 2869, 1723, 1705, 1551.

$[\alpha]_D^{20}$ = -15.9 (c = 0.5, MeOH)

(3R,4S)-tert-butyl 3-amino-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-6-methylheptanoate 68c :

RMN H^1 360 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 0.82 (d, *J*=6.6 Hz ; H_7 and H_8 ; 6H) ; 1.10-1.19 (m ; H_5 ; 2H) ; 1.36 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 1.49-1.57 (m ; H_6 ; 1H) ; 2.10 (dd, *J*=15.8, 9.7 Hz ; H_2 ; 1H) ; 2.36 (dd, *J* = 15.8, 3.6 Hz ; H_2 ; 1H) ; 3.04-3.17 (m ; H_3 ; 1H) ; 3.55-3.65 (m ; H_4 ; 1H) ; 4.99 (s ; H_{Cbz} ; 2H) ; 5.29 (d, *J* = 9.8 Hz ; H_{10} ; 1H) ; 7.28-7.32 (m ; H_{ar} ; 5H)

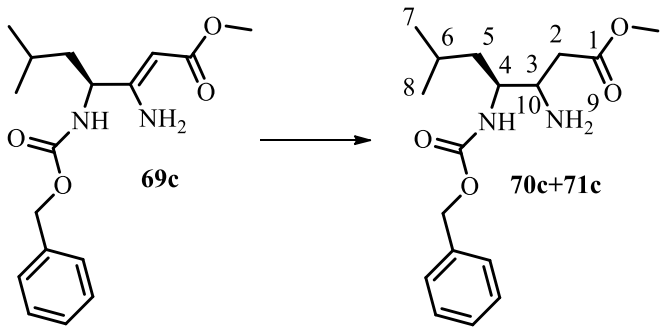
RMN C^{13} 63 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 21.6 (C_7 or C_8) ; 23.8 (C_7 or C_8) ; 24.7 (C_6) ; 28.1 (C_{tBu}) ; 39.3 (C_5) ; 40.5 (C_2) ; 52.5 (C_3) ; 53.5 (C_4) ; 66.5 (C_{Cbz}) ; 80.8 ($C_{q\ tBu}$) ; 128.0 (C_{Ar}) ; 128.2 (C_{Ar}) ; 128.5 (C_{Ar}) ; 136.7 ($C_{q\ Cbz}$) ; 156.5 (CO_{Cbz}) ; 171.5 (C_1)

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 365.2440 found $M+H^+$ = 365.2437

IR (cm^{-1}): 3325, 2955, 2869, 1713, 1700, 1529.

$[\alpha]_D^{20}$ = -12.9 (c = 0.25, MeOH)

(4S)-tert-butyl 3-amino-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-6-methylheptanoate (70c and 71c)



Mr = 322.19 g/mol

$C_{17}H_{26}N_2O_4$

To a solution of enaminoester **69c** (242 mg; 0.76 mmol) in a mixture of anhydrous dichloromethane (10 mL) and anhydrous methanol (1.5 mL) was added an anhydrous 2N hydrochloric acid (2.5 mL) solution under argon atmosphere at -78°C. The sodium cyanoborohydride (237 mg; 3.8 mmol) was solubilized in anhydrous methanol (1 mL) and added to a solution of enaminoester **69c**. The

resulting mixture was stirred for 30 minutes at -78°C, then 2 h at room temperature. The resulting mixture was quenched with a 2N sodium hydroxide aqueous solution to basic pH and a saturated solution of sodium chloride was added to solution. The organic layer was extracted by dichloromethane, dried with anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography with ethyl acetate 100% to give a slightly yellow mixture of two diastereomeres **70c** et **71c** in 77% (186 mg) yield.

RMN H^1 250 MHz MeOD δ (ppm) : 0.89-0.96 (m ; H_7 and H_8 ; 6H) ; 1.26-1.49 (m ; H_5 ; 2H) ; 1.60-1.74 (m ; H_6 ; 1H) ; 2.29 (dd, *J*=16.1, 8.8 Hz ; H_2 ; 1H) ; 2.52 (dd, *J* = 16.1, 4.9 Hz ; H_2 ; 1H) ; 3.10-3.20 (m ; H_3 ; 1H) ; 3.66 (s ; H_{Me} ; 3H) ; 3.69-3.77 (m ; H_4 ; 1H) ; 5.08 (s ; H_{Cbz} ; 2H) ; 5.29 (d, *J* = 9.8 Hz ; H_{10} ; 1H) ; 7.29-7.37 (m ; H_{Ar} ; 5H)

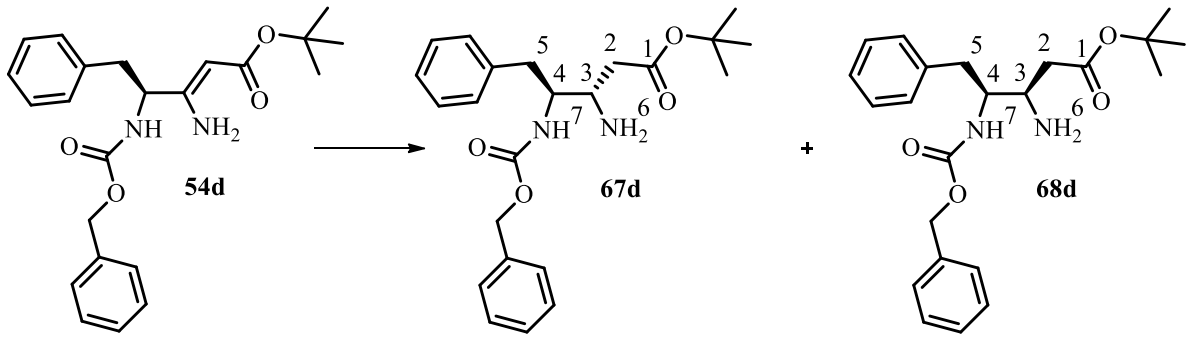
RMN C^{13} 90 MHz MeOD δ (ppm):

D1: 22.3 (C_7 or C_8) ; 23.9 (C_7 or C_8) ; 26.2 (C_6) ; 39.6 (C_5) ; 41.6 (C_2) ; 52.3 (C_{Me}) ; 53.0 (C_3) ; 54.1 (C_4) ; 67.6 (C_{Cbz}) ; 128.8 (C_{Ar}) ; 129.1 (C_{Ar}) ; 129.6 (C_{Ar}) ; 138.5 ($C_{q\ Ar}$) ; 158.9 (CO_{Cbz}) ; 174.3 (C_1)

D2: 22.0 (C_7 or C_8) ; 24.2 (C_7 or C_8) ; 26.2 (C_6) ; 38.8 (C_5) ; 40.8 (C_2) ; 52.3 (C_{Me}) ; 54.3 (C_3) ; 55.1 (C_4) ; 67.6 (C_{Cbz}) ; 128.8 (C_{Ar}) ; 129.1 (C_{Ar}) ; 129.6 (C_{Ar}) ; 138.5 ($C_{q\ Ar}$) ; 158.9 (CO_{Cbz}) ; 174.4 (C_1)

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 323.1971 found $M+H^+$ = 323.1968 $M+Na^+$ = 345.1774

(3S,4S)-tert-butyl 3-amino-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-phenylpentanoate 65d and (3R,4S)-tert-butyl 3-amino-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-phenylpentanoate 64d



Mr = 398.22 g/mol

$C_{23}H_{30}N_2O_4$

To a solution of enaminoester **54d** (2.9 g; 7 mmol) in a mixture of anhydrous dichloromethane (90 mL) and anhydrous methanol (34 mL) was added an anhydrous 2N hydrochloric acid (26 mL) under argon atmosphere at -78°C. The sodium cyanoborohydride was solubilized in anhydrous methanol (10 mL) and added to a solution of enaminoester **54d**. The resulting mixture was stirred for 30 minutes at -

78°C, than 2 h at room temperature. The resulting mixture was quenched with 2N sodium hydroxide to basic pH and a sodium chloride was added to solution. The organic layer was extracted by dichloromethane, dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography with cyclohexane/ethyl acetate (3/7) to give the slightly yellow separated solid products **67d** and **68d** in 26% (791 mg) and 11% (310 mg) yields respectively.

(3S,4S)-tert-butyl 3-amino-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-phenylpentanoate 67d :

RMN H^1 250 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 1.34 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 2.21 (dd, *J* = 16.3 Hz, 9.4 Hz ; H_2 ; 1H) ; 2.29 (dd, *J* = 16.3 Hz, 3.5 Hz ; H_2 ; 1H) ; 2.69 (dd, *J* = 13.4 Hz, 7.9 Hz ; H_5 ; 1H) ; 2.75 (dd, *J* = 13.4 Hz, 7.0 Hz ; H_5 ; 1H) ; 3.08-3.18 (m ; H_3 ; 1H) ; 3.77 (q ; *J* = 7.6 Hz ; H_4 ; 1H) ; 4.93 (d, *J* = 12.5 Hz ; H_{Cbz} ; 1H) ; 5.00 (d, *J* = 12.5 Hz ; H_{Cbz} ; 1H) ; 5.36 (d, *J* = 9.4 Hz ; H_7 ; 1H) ; 7.11-7.26 (m ; H_{Ar} ; 10H)

RMN C^{13} 63 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 28,2 (C_{tBu}) ; 39,0 (C_2) ; 41,0 (C_5) ; 49,0 (C_3) ; 56,2 (C_4) ; 66,6 (C_{Cbz}) ; 80,9 ($C_{q\ tBu}$) ; 126,6 (C_{Ar}) ; 127.9 (C_{Ar}) ; 128.0 (C_{Ar}) ; 128.5 (C_{Ar}) ; 128.6 (C_{Ar}) ; 129.2 (C_{Ar}) ; 136,7 ($C_{q\ Ar}$) ; 137,9 ($C_{q\ Ar}$) ; 156,4 (CO_{Cbz}) ; 171,7 (C_1)

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 399.2284 found $M+H^+$ = 399.2269 $M+Na^+$ = 421.2087

IR (cm^{-1}): 3326, 2928, 1723, 1700, 1541.

$[\alpha]_D^{20}$ = -7.1 (c = 0.25, MeOH)

(3R,4S)-tert-butyl 3-amino-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-phenylpentanoate 68d :

RMN H^1 250 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 1.36 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 2.24 (dd, *J* = 15.9 Hz, 9.5 Hz ; H_2 ; 1H) ; 2.45 (dd, *J* = 15.8 Hz, 3.2 Hz ; H_2 ; 1H) ; 2.64 (dd, *J* = 13.7 Hz, 9.2 Hz ; H_5 ; 1H) ; 2.82 (dd, *J* = 13.7 Hz, 4.1 Hz ; H_5 ; 1H) ; 3.15-3.28 (m ; H_3 ; 1H) ; 3.79-3.91 (m ; H_4 ; 1H) ; 4.85 (d, *J* = 12.5 Hz ; H_{Cbz} ; 1H) ; 4.94 (d, *J* = 12.5 Hz ; H_{Cbz} ; H) ; 5.25 (d, *J* = 8.6 Hz ; H_7 ; 1H) ; 6.98-7.28 (m ; H_{Ar} ; 10H)

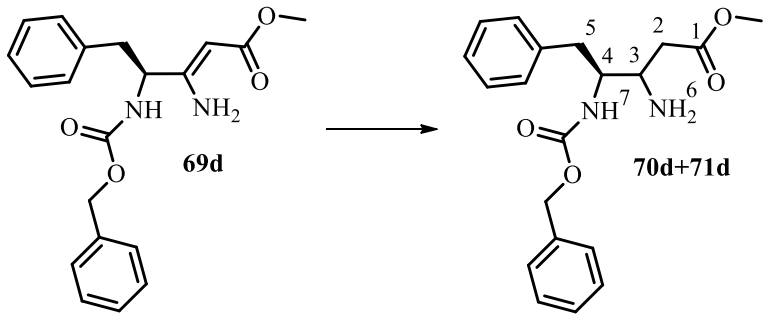
RMN C^{13} 63 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 28.2 (C_{tBu}) ; 36.7 (C_2) ; 41.0 (C_5) ; 51.7 (C_3) ; 56.7 (C_4) ; 66.6 (C_{Cbz}) ; 81.1 ($C_{q\ tBu}$) ; 126.6 (C_{Ar}) ; 127.9 (C_{Ar}) ; 128.1 (C_{Ar}) ; 128.6 (C_{Ar}) ; 128.6 (C_{Ar}) ; 129.3 (C_{Ar}) ; 136.7 ($C_{q\ Ar}$) ; 137.9 ($C_{q\ Ar}$) ; 156.2 (CO_{Cbz}) ; 171.6 (C_1)

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 399.2284 found $M+H^+$ = 399.2264 $M+Na^+$ = 421.2081

IR (cm^{-1}): 3327, 2928, 1723, 1702, 1541.

$[\alpha]_D^{27}$ = -72.1 (c = 0.1, MeOH)

(3S,4S)-methyl 3-amino-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-phenylpentanoate 70d and (3R,4S)-methyl 3-amino-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-phenylpentanoate 71d

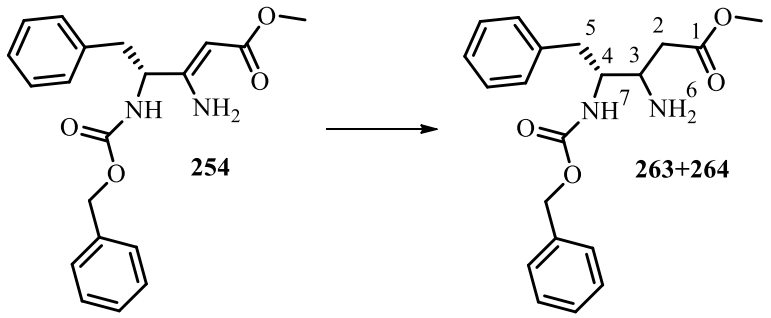


Mr = 356.17 g/mol

$C_{20}H_{24}N_2O_4$

To a solution of enaminoester **69d** (0.1 g; 0.28 mmol) in a mixture of anhydrous dichloromethane (3.0 mL) and anhydrous methanol (1.0 mL) was added an anhydrous 2N hydrochloric acid (0.9 mL) under argon atmosphere at -78°C. The sodium cyanoborohydride was solubilized in anhydrous methanol (0.5 mL) and added to a solution of enaminoester **69d**. The resulting mixture was stirred for 30 minutes at -78°C, than 2 h at room temperature. The resulting mixture was quenched with 2N sodium hydroxide to basic pH and a sodium chloride saline solution was added to a solution. The organic layer was extracted by dichloromethane, dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The mixture was used in the next step without any purification.

(3S,4R)-methyl 3-amino-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-phenylpentanoate 255 and (3R,4R)-methyl 3-amino-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-phenylpentanoate 256



Mr = 356.17 g/mol

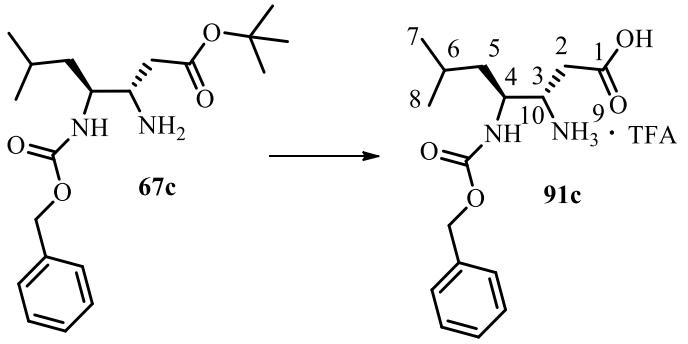
$C_{20}H_{24}N_2O_4$

To a solution of enaminoester **254** (0.249 g; 0.7 mmol) in a mixture of anhydrous dichloromethane (7.6 mL) and anhydrous methanol (3.8 mL) was added an anhydrous 2N hydrochloric acid (1.3 mL) under argon atmosphere at -78ºC. The sodium cyanoborohydride was solubilized in anhydrous methanol (1.0 mL) and added to a solution of enaminoester **254**. The resulting mixture was stirred for 30 minutes at -78ºC, than 2 h at room temperature. The resulting mixture was quenched with 2N sodium hydroxide to basic pH and a sodium chloride saline solution was added to a solution. The organic layer was extracted by dichloromethane, dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The mixture was used in the next step without any purification.

Deprotection of tert-butyl group

General procedure: aminoester (0.1 mmol) was dissolved in dichloromethane (0.25 mL) and a trifluoroacetic acid (1 mmol) was added slowly at 0ºC. The resulting mixture was stirred for 3 h at room temperature, then solvent was evaporated under reduced pressure.

(3S,4S)-3-amino-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-6-methylheptanoic acid compound with 2,2,2-trifluoroacetic acid (1:1) 91c

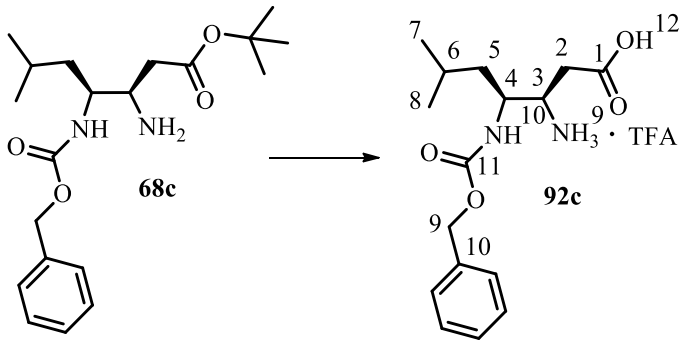


Mr = 422.40 g/mol

$C_{18}H_{25}F_3N_2O_6$

The product **91c** was used in the next step without any purification.

(3R,4S)-3-amino-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-6-methylheptanoic acid compound with 2,2,2-trifluoroacetic acid (1:1) 92c

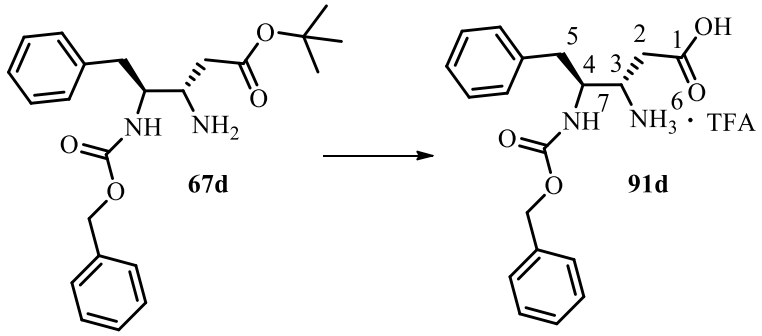


Mr = 422.40 g/mol

$C_{18}H_{25}F_3N_2O_6$

The product **92c** was used in the next step without any purification.

(3S,4S)-3-amino-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-6-methylheptanoic acid compound with 2,2,2-trifluoroacetic acid (1:1) 91d

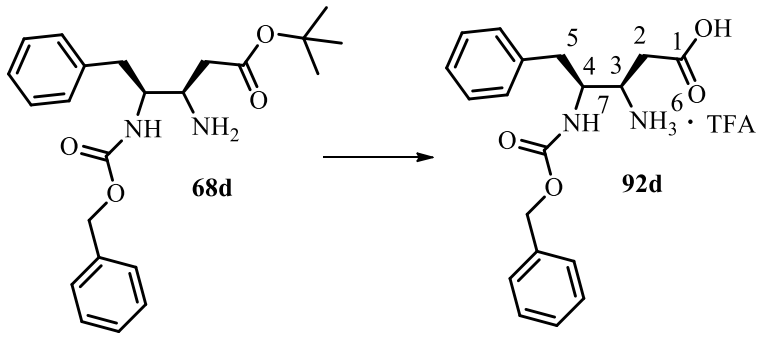


Mr = 512.21 g/mol

$C_{21}H_{31}F_3N_2O_6$

The product **91d** was used in next step without any purification.

(3R,4S)-3-amino-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-6-methylheptanoic acid compound with 2,2,2-trifluoroacetic acid (1:1) 92d



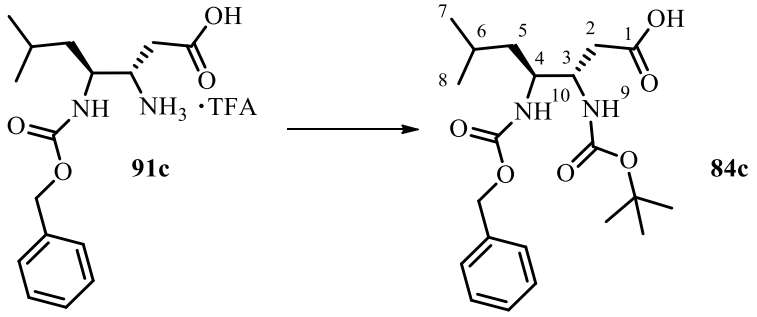
Mr = 512.21 g/mol

$C_{25}H_{31}F_3N_2O_6$

The product **92d** was used in next step without any purification.

Protection by tert-butoxycarbonyl

(3S,4S)-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-6-methylheptanoic acid 84c



Mr = 408.49 g/mol

$C_{21}H_{32}N_2O_6$

To a solution of **91c** (1.12 g; 3.6 mmol) in methanol (10 mL) was added triethylamine (0.76 mL) at room temperature under argon atmosphere. The solution was stirred for 15 min and Boc_2O (1.19 g; 5.4 mmol) in methanol (10 mL) was slowly added. The resulting mixture was stirred for 12 h at room temperature. Then the solvent was evaporated under reduced pressure, the crude product was dissolved in ethyl acetate (10 mL) and washed with 10% citric acid aqueous solution and sodium chloride saturated solution. The organic layer was dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography with cyclohexane/ethyl acetate (3/7) to give a white solid product in 83% yield (899 mg).

RMN H^1 360 MHz MeOD δ (ppm) : 0.89 (d, *J*=6.6 Hz ; H_7 or H_8 ; 3H) ; 0.92 (d, *J*=6.6 Hz ; H_7 or H_8 ; 3H) ; 1.29-1.36 (m ; H_5 ; 2H) ; 1.41 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 1.59-166 (m ; H_6 ; 1H) ; 2.37-2.43 (m ; H_2 ; 1H) ; 2.53 (dd, *J* = 15.9 Hz, 6.0 Hz ; H_2 ; 1H) ; 3.82-3.86 (m ; H_3 ; 1H) ; 3.98-4.04 (m ; H_4 ; 1H) ; 5.07 (s ; H_{Cbz} ; 2H) ; 7.23-7.37 (m ; H_{ar} ; 5H)

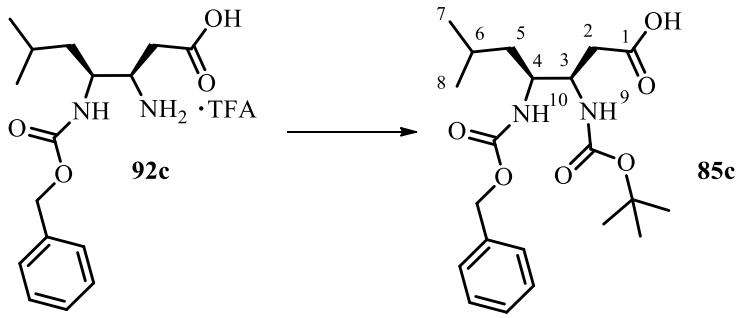
RMN C^{13} 63 MHz MeOD δ (ppm) : 22.5 (C_7 or C_8) ; 23.7 (C_7 or C_8) ; 26.0 (C_6) ; 28.9 (C_{tBu}) ; 38.2 (C_2) ; 42.4 (C_5) ; 52.6 (C_3) ; 53.5 (C_4) ; 67.6 (C_{Cbz}) ; 80.3 ($C_{q\ tBu}$) ; 128.8 (C_{Ar}) ; 129.0 (C_{Ar}) ; 129.5 (C_{Ar}) ; 138.4 ($C_{q\ Cbz}$) ; 158.0 (CO_{Boc}) ; 158.9 (CO_{Cbz}) ; 174.8 (C_1)

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 409.2339 found $M+H^+$ = 409.2316

IR (cm^{-1}): 3336, 2934, 1678, 1523.

$[\alpha]_D^{20}$ = -37.1 (c = 0.5, MeOH)

(3R,4S)-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-6-methylheptanoic acid 85c



Mr = 408.49 g/mol

$C_{21}H_{32}N_2O_6$

To a solution of **91c** (0.18 g; 0.6 mmol) in methanol (1.6 mL) was added triethylamine (0.12 mL) at room temperature under argon atmosphere. The solution was stirred for 15 min and Boc_2O (0.19 g; 0.9 mmol) in methanol (1.6 mL) was slowly added. The resulting mixture was stirred for 12 h at room temperature. Then the solvent was evaporated under reduced pressure, the crude product was dissolved in ethyl acetate (2 mL) and washed with 10% citric acid aqueous solution and sodium chloride saturated solution. The organic layer was dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography with cyclohexane/ethyl acetate (3/7) to give a white solid product in 72% yield (125 mg).

RMN H^1 360 MHz MeOD δ (ppm) : 0.88-0.93 (m ; H_7 and H_8 ; 6H) ; 1.29-1.37 (m ; H_5 ; 2H) ; 1.41 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 1.64 (m, *J*=6.6 Hz ; H_6 ; 1H) ; 2.37 (dd, *J*=15.9 Hz, 6.9 Hz ; H_2 ; 1H) ; 2.52 (dd, *J* = 15.9 Hz, 4.2 Hz ; H_2 ; 1H) ; 3.82-3.94 (m ; H_3 ; 1H) ; 3.99-4.06 (m ; H_4 ; 1H) ; 5.07 (s ; H_{Cbz} ; 2H) ; 7.28-7.36 (m ; H_{ar} ; 5H)

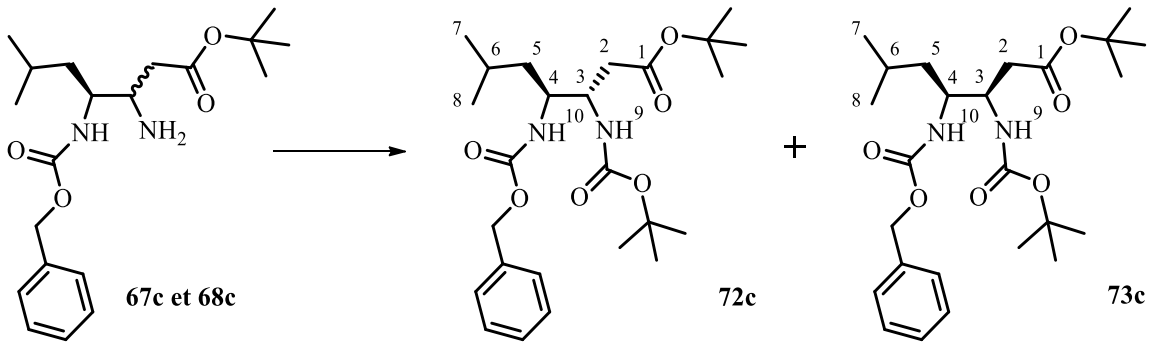
RMN C^{13} 90 MHz MeOD δ (ppm) : 22.5 (C_7 or C_8) ; 23.7 (C_7 or C_8) ; 26.0 (C_6) ; 28.9 (C_{tBu}) ; 38.3 (C_2) ; 42.5 (C_5) ; 52.6 (C_3) ; 53.7 (C_4) ; 67.6 (C_{Cbz}) ; 80.3 ($C_{q\ tBu}$) ; 128.8 (C_{Ar}) ; 129.1 (C_{Ar}) ; 129.5 (C_{Ar}) ; 138.5 ($C_{q\ Ar}$) ; 158.0 (CO_{Boc}) ; 159.0 (CO_{Cbz}) ; 174.9 (C_1)

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 409.2339 found $M+H^+$ = 409.2313

IR (cm^{-1}): 3351, 2958, 1675, 1531.

$[\alpha]_D^{27}$ = -7.5 (c = 0.1, MeOH)

(3S,4S)-tert-butyl 4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-6-methylheptanoate 72c and (3R,4S)-tert-butyl 4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-6-methylheptanoate 73c



Mr = 464.29 g/mol

$C_{25}H_{40}N_2O_6$

To a mixture of **67c** and **68c** (0.1 g; 0.3 mmol) in methanol (0.8 mL) was added triethylamine (0.06 mL) at room temperature under argon atmosphere. The solution was stirred for 15 min and Boc_2O (0.09 g; 0.4 mmol) in methanol (0.8 mL) was slowly added. The resulting mixture was stirred for 12 h at room temperature. Then the solvent was evaporated under reduced pressure, the crude product was dissolved in ethyl acetate (2 mL) and washed with a 10% citric acid aqueous solution and sodium chloride saturated solution. The organic layer was dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography with cyclohexane/ethyl acetate (9/1) to give two separate diastereomers **72c** and **73c** as oil and solid products in 59% (65 mg) and 41% (45 mg) yield respectively.

(3S,4S)-tert-butyl 4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-6-methylheptanoate 72c

RMN H^1 400 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 0.88 (d, *J*=6.5 Hz ; H_7 and H_8 ; 6H) ; 1.26-1.33 (m ; H_5 ; 2H) ; 1.36 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 1.42 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 1.60-1.68 (m ; H_6 ; 1H) ; 2.35 (dd, *J*=14.7 Hz, 7.7 Hz ; H_2 ; 1H) ; 2.49 (dd, *J*=14.7 Hz, 3.5 Hz ; H_2 ; 1H) ; 3.73-3.84 (m ; H_4 ; 1H) ; 3.84-3.99 (m ; H_3 ; 1H) ; 4.96 (d, *J*=9.4 Hz ; H_9 ; 1H) ; 5.02 (d, *J* = 12.0 Hz ; H_{Cbz} ; 1H) ; 5.07 (d, *J* = 12.0 Hz ; H_{Cbz} ; 1H) ; 5.08- 5.12 (m ; H_{10} ; 1H) ; 7.25-7.33 (m ; H_{Ar} ; 5H)

RMN C^{13} 100 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 22.1 (C_7) ; 23.5 (C_8) ; 24,9 (C_6) ; 28.2 (C_{tBu}) ; 28.5 (C_{tBu}) ; 39.1 (C_2) ; 42.3 (C_5) ; 51.9 (C_4) ; 53.1 (C_3) ; 66.9 (C_{Cbz}) ; 79.5 ($C_{q\ tBu}$) ; 81.3 ($C_{q\ tBu}$) ; 128.1 (C_{Ar}) ; 128.2 (C_{Ar}) ; 128.6 (C_{Ar}) ; 136.7 ($C_{q\ Ar}$) ; 156.1 (CO_{Boc}) ; 156.9 (CO_{Cbz}) ; 170.6 (C_1)

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 465.2965 found $M+H^+$ = 465.2941 and $M+Na^+$ = 487.2759

IR (cm^{-1}): 3367, 2977, 1654, 1643, 1519.

$[\alpha]_D^{28}$ = -50.9 (c = 0.65, MeOH)

(3R,4S)-tert-butyl 4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-6-methylheptanoate 73c

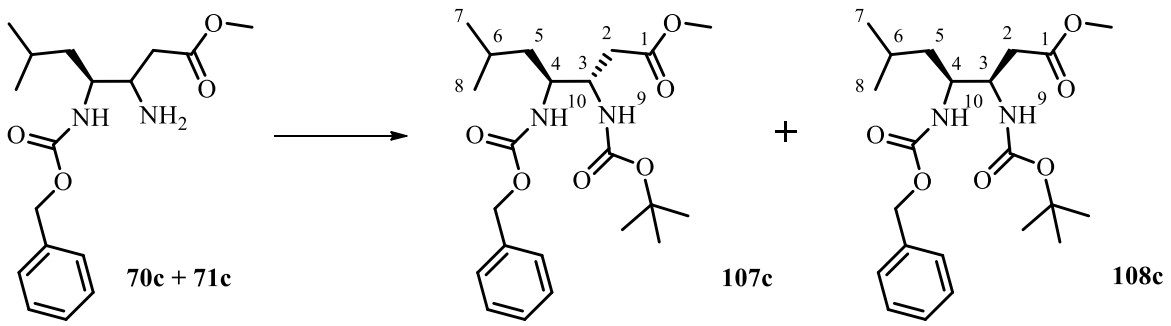
RMN H^1 250 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 0.81 (d, *J*=6.6 Hz ; H_7 and H_8 ; 6H) ; 1.20-1.26 (m ; H_5 ; 2H) ; 1.33 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 1.34 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 1.57 (m, *J*=6.6 Hz ; H_6 ; 1H) ; 2.28 (dd, *J*=15.0 Hz, 6,8 Hz ; H_2 ; 1H) ; 2.44 (dd, *J*=15.0 Hz, 4.7 Hz ; H_2 ; 1H) ; 3.75 (m, *J*=4.9 Hz ; H_4 ; 1H) ; 3.86 (m, *J*=6.9 Hz ; H_3 ; 1H) ; 4.99 (s ; H_{Cbz} ; 2H) ; 5.28 (d, *J*=10.0 Hz ; H_9 ; 1H) ; 5.33 (d, *J*=9.7 Hz ; H_{10} ; 1H) ; 7.21-7.26 (m ; H_{Ar} ; 5H)

RMN C^{13} 90 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 22.9 (C_7 or C_8) ; 23.8 (C_7 or C_8) ; 25,0 (C_6) ; 28.1 (C_{tBu}) ; 28.5 (C_{tBu}) ; 38.0 (C_2) ; 41,4 (C_5) ; 52,1 (C_4) ; 53.0 (C_3) ; 66.9 (C_{Cbz}) ; 79.5 ($C_{q\ tBu}$) ; 81.2 ($C_{q\ tBu}$) ; 128.1 (C_{Ar}) ; 128.1 (C_{Ar}) ; 128.6 (C_{Ar}) ; 136.6 ($C_{q\ Ar}$) ; 155.6 (CO_{Boc}) ; 156.6 (CO_{Cbz}) ; 171.1 (C_1)

HRMS (ESI+) : calculated $M+H^+$ = 465.2965 found $M+H^+$ = 465.2926 and $M+Na^+$ = 487.2731

IR (cm^{-1}): 3367, 2978, 1651, 1643, 1519.

(3S,4S)-methyl-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-6-methylheptanoate 107c and (3R,4S)-methyl-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-6-methylheptanoate 108c



Mr = 422.24 g/mol

$C_{22}H_{34}N_2O_6$

To a mixture of **70c + 71c** (0.156 g; 0.5 mmol) in methanol (2.0 mL) was added triethylamine (0.14 mL) at room temperature under argon atmosphere. The solution was stirred for 15 min and Boc_2O (0.12 g; 0.5 mmol) in methanol (0.7 mL) was slowly added. The resulting mixture was stirred for 12 h

at room temperature, then dissolved in dichloromethane and washed with a 10% citric acid aqueous solution. The organic layer was dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography with cyclohexane/ethyl acetate (8/2) to give two separate diastereomers **107c** and **108c** as oil and solid products in 43% (88 mg) and 30% (61 mg) yields respectively.

(3S,4S)-methyl-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-6-methylheptanoate 107c

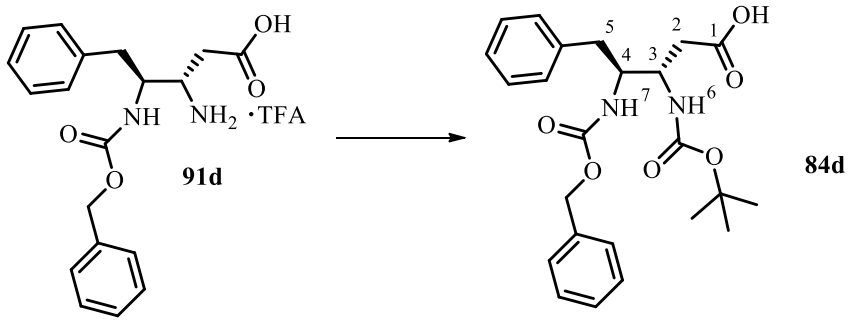
RMN H^1 360 MHz MeOD δ (ppm) : 0.89 (d, *J*=6.6 Hz ; H_7 or H_8 ; 3H) ; 0.89 (d, *J*=6.6 Hz ; H_7 or H_8 ; 3H) ; 1.26-1.33 (m ; H_5 ; 2H) ; 1.31-1.34 (m ; H_5 ; 2H) ; 1.43 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 1.64 (m, *J*=6.6 Hz ; H_6 ; 1H) ; 2.39 (dd, *J*=15.8 Hz, 7.8 Hz ; H_2 ; 1H) ; 2.53 (dd, *J*=15.8 Hz, 6.2 Hz ; H_2 ; 1H) ; 3.64 (s ; H_{Me} ; 3H) ; 3.84 (m ; H_4 ; 1H) ; 3.99-4.06 (m ; H_3 ; 1H) ; 5.07 (s ; H_{Cbz} ; 2H) ; 6.37 (d, *J*= 9.4 Hz ; H_9 ; 1H) ; 6.69 (d, *J*= 9.4 Hz ; H_{10} ; 1H) ; 7.29-7.39 (m ; H_{Ar} ; 5H)
RMN C^{13} 90 MHz MeOD δ (ppm) : 22.5 (C_7 or C_8) ; 23.7 (C_7 or C_8) ; 26,1 (C_6) ; 28.9 (C_{tBu}) ; 38.3 (C_2) ; 42.5 (C_5) ; 52.3 (C_{Me}) ; 52.7 (C_4) ; 53.5 (C_3) ; 66.7 (C_{Cbz}) ; 80.4 ($C_{q\ tBu}$) ; 128.9 (C_{Ar}) ; 129.1 (C_{Ar}) ; 129.6 (C_{Ar}) ; 138.5 ($C_{q\ Ar}$) ; 158.0 (CO_{Boc}) ; 159.0 (CO_{Cbz}) ; 173.5 (C_1)
HRMS (ESI+) : calculated $M+H^+$ = 423.2495 found $M+H^+$ = 423.2473 and $M+Na^+$ = 445.2331
IR (cm^{-1}): 3362, 2957, 1731, 1680, 1519.
$[\alpha]_D^{20}$ = -33.3 (c = 0.5, MeOH)

(3R,4S)-methyl-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-6-methylheptanoate 108c

RMN H^1 360 MHz MeOD δ (ppm) : 0.88 (d, *J* = 6.6 Hz ; H_7 or H_8 ; 3H) ; 0.91 (d, *J* = 6.6 Hz ; H_7 or H_8 ; 3H) ; 1.28-1.36 (m ; H_5 ; 2H) ; 1.43 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 1.58-1.63 (m ; H_6 ; 1H) ; 2.38 (dd, *J* = 15.1 Hz, 8.6 Hz ; H_2 ; 1H) ; 2.54 (dd, *J* = 15.1 Hz, 4.7 Hz ; H_2 ; 1H) ; 3.62 (s ; H_{Me} ; 3H) ; 3.86-3.74 (m ; H_4 ; 1H) ; 3.84-3.91 (m ; H_3 ; 1H) ; 5.07 (s ; H_{Cbz} ; 2H) ; 6.62 (d, *J* = 9.4 Hz ; H_9 ; 1H) ; 6.90 (d, *J* = 9.3 Hz ; H_{10} ; 1H) ; 7.27-7.38 (m ; H_{Ar} ; 5H)
RMN C^{13} 90 MHz MeOD δ (ppm) : 22.0 (C_7 or C_8) ; 24.2 (C_7 or C_8) ; 26,2 (C_6) ; 28.9 (C_{tBu}) ; 37.8 (C_2) ; 41.7 (C_5) ; 52.3 (C_{Me}) ; 53.6 (C_4) ; 54.1 (C_3) ; 67.6 (C_{Cbz}) ; 80.3 (C_{tBu}) ; 128.9 (C_{Ar}) ; 129.1 (C_{Ar}) ; 129.6 (C_{Ar}) ; 138.6 ($C_{q\ Ar}$) ; 157.9 (CO_{Boc}) ; 159.0 (CO_{Cbz}) ; 173.9 (C_1)
HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 423.2495 found $M+H^+$ = 423.2473 and $M+Na^+$ = 445.2331
IR (cm^{-1}): 3357, 2957, 1733, 1689, 1538.

$[\alpha]_D^{20}$ = -4.4 (c = 0.5, MeOH)

(3S,4S)-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-5-phenylpentanoic acid 84d



Mr = 442.21 g/mol

$C_{24}H_{30}N_2O_6$

To a solution of **91d** (1.12 g; 2.5 mmol) in methanol (6.8 mL) was added triethylamine (1.03 mL; 7.4 mmol) at room temperature under argon atmosphere. The solution was stirred for 15 min and Boc_2O (0.85 g; 3.7 mmol) in methanol (6.8 mL) was slowly added. The resulting mixture was stirred for 12 h at room temperature. Then solvent was evaporated under reduced pressure, the crude product was dissolved in dichloromethane (20 mL) and washed with a 10% citric acid aqueous solution and sodium chloride saturated solution. The organic layer was dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography with cyclohexane/ethyl acetate (3/7) to give a white solid product in 80% yield in two steps (867 mg).

RMN H^1 360 MHz MeOD δ (ppm) : 1.45 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 2.42 (dd, *J* = 15.4 Hz, 7.7 Hz ; H_2 ; 1H) ; 2.55 (dd ; *J* = 15.4 Hz, 5.8 Hz ; H_2 ; 1H) ; 2.66 (dd, *J* = 13.8 Hz, 10.3 Hz ; H_5 ; 1H) ; 2.89 (dd, *J* = 13.8 Hz, 5.3 Hz ; H_5 ; 1H) ; 3.97-4.04 (m ; H_4 ; 1H) ; 4.06-4.16 (m ; H_3 ; 1H) ; 4.91 (d, *J* = 12.9 Hz ; H_{Cbz} ; 1H) ; 4.98 (d, *J* = 12.9 Hz ; H_{Cbz} ; 1H) ; 6.46 (d, *J* = 8.9 Hz ; H_6 ; partially exchanged) ; 6.79 (d, *J* = 9.3 Hz ; H_7 ; partially exchanged) ; 7.12-7.30 (m ; H_{ar} ; 10H)

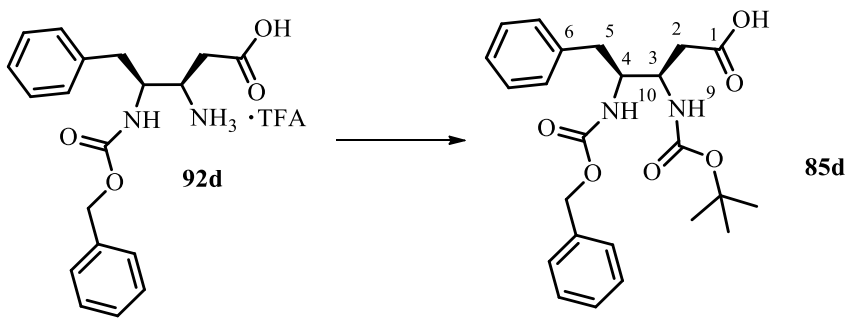
RMN C^{13} 100 MHz MeOD δ (ppm) : 28.9 (C_{tBu}) ; 38.4 (C_2) ; 39.6 (C_5) ; 52.4 (C_3) ; 57.3 (C_4) ; 67.4 (C_{Cbz}) ; 80.5 ($C_{q\ tBu}$) ; 127.5 (C_{Ar}) ; 128.6 (C_{Ar}) ; 128.9 (C_{Ar}) ; 129.5 (C_{Ar}) ; 129.6 (C_{Ar}) ; 130.5 (C_{Ar}) ; 138.5 ($C_{q\ Ar}$) ; 139.8 ($C_{q\ Ar}$) ; 158.1 (CO_{Boc}) ; 158.8 (CO_{Cbz}) ; 174.8 (C_1)

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 443.2182 found $M+H^+$ = 443.2177 $M+Na^+$ = 465.1980

IR (cm^{-1}): 3384, 3035, 2940, 1728, 1669, 1526.

$[\alpha]_D^{28}$ = -15.2 (c = 0.5, MeOH)

(3R,4S)-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-5-phenylpentanoic acid 85d



Mr = 442.21 g/mol

$C_{24}H_{30}N_2O_6$

To a solution of **92d** (0.15 g; 0.3 mmol) in methanol (0.9 mL) was added triethylamine (0.07 mL; 0.5 mmol) at room temperature under argon atmosphere. The solution was stirred for 15 min and Boc_2O (0.11 g; 0.5 mmol) in methanol (0.9 mL) was slowly added. The resulting mixture was stirred for 12 h at room temperature. Then solvent was evaporated under reduced pressure, the crude product was dissolved in dichloromethane (10 mL) and washed with 10% citric acid aqueous solution and sodium chloride saturated solution. The organic layer was dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography with cyclohexane/ethyl acetate (3/7) to give a white solid product in 82% yield in two steps (119 mg).

RMN H^1 250 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 1.36 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 2.33 (dd, *J* = 16.6 Hz, 7.8 Hz ; H_2 ; 1H) ; 2.42 (dd ; *J* = 16.6 Hz, 3.6 Hz ; H_2 ; 1H) ; 2.73 (dd, *J* = 13.9 Hz, 8.2 Hz ; H_5 ; 1H) ; 2.88 (dd, *J* = 13.9 Hz, 4.3 Hz ; H_5 ; 1H) ; 3.78-3.95 (m ; H_3 and H_4 ; 2H) ; 4.91 (s ; H_{Cbz} ; 2H) ; 4.91-4.98 (m ; H_9 and H_{10} ; 2H) ; 7.09-7.23 (m ; H_{ar} ; 10H)

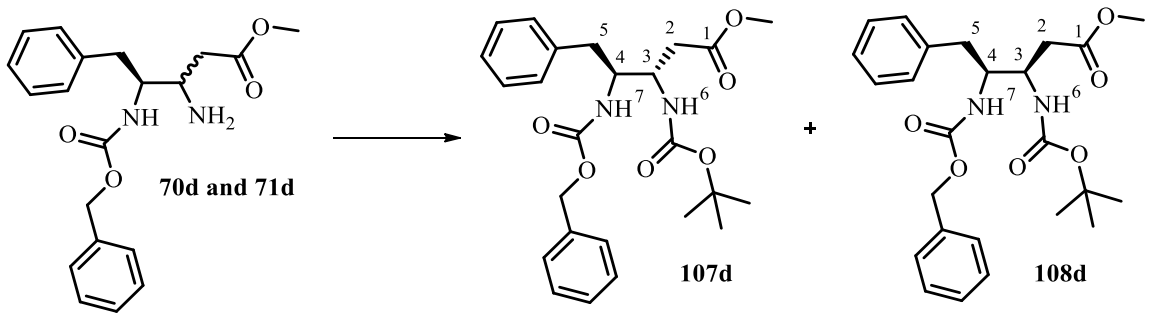
RMN C^{13} 100 MHz MeOD δ (ppm) : 28.9 (C_{tBu}) ; 37.6 (C_2) ; 38.6 (C_5) ; 53.2 (C_3) ; 57.6 (C_4) ; 67.3 (C_{Cbz}) ; 80.4 ($C_{q\ tBu}$) ; 127.4 (C_{Ar}) ; 128.5 (C_{Ar}) ; 128.9 (C_{Ar}) ; 129.4 (C_{Ar}) ; 129.5 (C_{Ar}) ; 130.5 (C_{Ar}) ; 138.6 ($C_{q\ Ar}$) ; 140.1 ($C_{q\ Ar}$) ; 158.0 (CO_{Boc}) ; 158.7 (CO_{Cbz}) ; 175.3 (C_1)

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 443.2182 found $M+H^+$ = 443.2163 $M+Na^+$ = 465.1981

IR (cm^{-1}): 3347, 2976, 1675, 1531.

$[\alpha]_D^{20}$ = -231.0 (c = 1, MeOH)

(3S,4S)-methyl 4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-5-phenylpentanoate 107d and (3R,4S)-methyl 4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-5-phenylpentanoate 108d



Mr = 456.23 g/mol

$C_{25}H_{32}N_2O_6$

To a mixture of **70d** and **71d** (0.095 g; 0.3 mmol) in methanol (1.0 mL) was added triethylamine (0.12 mL) at room temperature under argon atmosphere. The solution was stirred for 15 min and Boc_2O (0.092 g; 0.4 mmol) in methanol (0.5 mL) was slowly added. The resulting mixture was stirred for 12 h at room temperature. Then solvent was evaporated under reduced pressure, the crude product was dissolved in dichloromethane (10 mL) and washed with a 10% citric acid aqueous solution and sodium chloride saturated solution. The organic layer was dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified and the two diastereomers were separated by silica gel column chromatography with cyclohexane/ethyl acetate (7/3) to give **107d** as a colorless oil and **108d** as white solids in 60% (73 mg) and 15% (18 mg) yield respectively.

(3S,4S)-methyl-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-5-phenylpentanoate 107d

RMN H^1 360 MHz MeOD δ (ppm) : 1.45 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 2.37 (dd, *J* = 15.7 Hz, 8.3 Hz ; H_2 ; 1H) ; 2.56 (dd ; *J* = 15.7 Hz, 6.1 Hz ; H_2 ; 1H) ; 2.66 (dd, *J* = 13.8 Hz, 9.6 Hz ; H_5 ; 1H) ; 2.87 (dd, *J* = 13.8 Hz, 5.2 Hz ; H_5 ; 1H) ; 3.63 (s ; H_{Me} ; 3H) ; 3.98-4.05 (m ; H_4 ; 1H) ; 4.09-4.15 (m ; H_3 ; 1H) ; 4.93 (d, *J* = 12.2 Hz ; H_{Cbz} ; 1H) ; 4.99 (d, *J* = 12.2 Hz ; H_{Cbz} ; 1H) ; 7.16-7.31 (m ; H_{ar} ; 10H)

RMN C^{13} 90 MHz MeOD δ (ppm) : 28.9 (C_{tBu}) ; 38.5 (C_2) ; 39.6 (C_5) ; 52.2 (C_3) ; 52.3 (C_{Me}) ; 57.1 (C_4) ; 67.4 (C_{Cbz}) ; 80.5 ($C_{q\ tBu}$) ; 127.5 (C_{Ar}) ; 128.6 (C_{Ar}) ; 129.0 (C_{Ar}) ; 129.5 (C_{Ar}) ; 129.6 (C_{Ar}) ; 130.4 (C_{Ar}) ; 138.5 ($C_{q\ Ar}$) ; 139.7 ($C_{q\ Ar}$) ; 158.0 (CO_{Boc}) ; 158.8 (CO_{Cbz}) ; 173.4 (C_1)

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 457.2339 found $M+Na^+$ = 479.2144

IR (cm^{-1}): 3359, 3031, 2977, 1667, 1522.

$[\alpha]_D^{23}$ = +46.0 (c = 0.2, MeOH)

(3R,4S)-methyl 4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-5-phenylpentanoate 108d

RMN H^1 360 MHz MeOD+$CDCl_3$ δ (ppm) : 1.46 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 2.37 (dd, *J* = 15.5 Hz, 8.6 Hz ; H_2 ; 1H) ; 2.55 (dd, *J* = 15.5 Hz, 4.4 Hz ; H_2 ; 1H) ; 2.49-2.59 (m ; H_5 ; 1H) ; 2.99 (dd, *J* = 13.9 Hz, 3.3 Hz ; H_5 ; 1H) ; 3.60 (s ; H_{Me} ; 3H) ; 3.83-3.97 (m ; H_3 and H_4 ; 2H) ; 4.88 (d, *J* = 12.7 Hz ; H_{Cbz} ; 1H) ; 4.95 (d, *J* = 12.7 Hz ; H_{Cbz} ; 1H) ; 7.09-7.30 (m ; H_{ar} ; 10H)

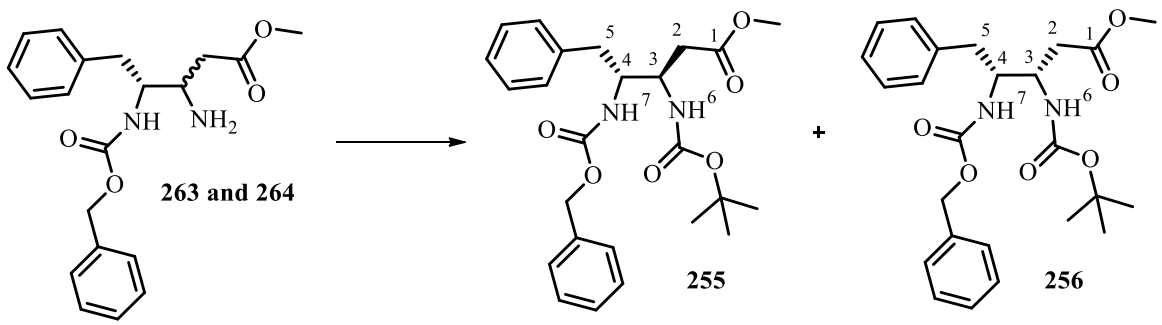
RMN C^{13} 90 MHz MeOD+$CDCl_3$ δ (ppm) : 28.7 (C_{tBu}) ; 37.3 (C_2) ; 38.3 (C_5) ; 52.1 (C_3) ; 52.2 (C_{Me}) ; 56.3 (C_4) ; 66.9 (C_{Cbz}) ; 80.3 ($C_{q\ tBu}$) ; 126.9 (C_{Ar}) ; 128.0 (C_{Ar}) ; 128.4 (C_{Ar}) ; 128.9 (C_{Ar}) ; 128.9 (C_{Ar}) ; 129.7 (C_{Ar}) ; 137.2 ($C_{q\ Ar}$) ; 138.5 ($C_{q\ Cbz}$) ; 158.8 (CO_{Boc}) ; 157.6 (CO_{Cbz}) ; 173.2 (C_1)

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 457.2339 found $M+Na^+$ = 479.2144

IR (cm^{-1}): 3353, 2978, 1682, 1667, 1529.

$[\alpha]_D^{24}$ = -15.9 (c = 0.1, MeOH)

(3R,4R)-methyl 4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-5-phenylpentanoate 255 and (3S,4R)-methyl 4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-5-phenylpentanoate 256



Mr = 456.23 g/mol

$C_{25}H_{32}N_2O_6$

To a mixture of **263** and **264** (0.22 g; 0.6 mmol) in methanol (2.4 mL) was added triethylamine (0.26 mL) at room temperature under argon atmosphere. The solution was stirred for 15 min and Boc_2O (0.213 g; 0.9 mmol) in methanol (1 mL) was slowly added. The resulting mixture was stirred for 12 h at

room temperature. Then solvent was evaporated under reduced pressure, the crude product was dissolved in ethyl acetate (10 mL) and washed with 10% citric acid aqueous solution and sodium chloride saline solution. The organic layer was dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified and the two diastereomers were separated by silica gel column chromatography with cyclohexane/ethyl acetate (7/3) to give **255** and **256** as a white solids in 73% (206 mg) and 27% (76 mg) yield respectively.

(3R,4R)-methyl-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-5-phenylpentanoate 255

RMN H^1 360 MHz MeOD δ (ppm) : 1.45 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 2.45 (dd, *J* = 15.7 Hz, 7.9 Hz ; H_2 ; 1H) ; 2.56 (dd ; *J* = 15.7 Hz, 6.0 Hz ; H_2 ; 1H) ; 2.67 (dd, *J* = 13.7 Hz, 9.9 Hz ; H_5 ; 1H) ; 2.87 (dd, *J* = 13.7 Hz, 5.3 Hz ; H_5 ; 1H) ; 3.61 (s ; H_{Me} ; 3H) ; 4.00-4.10 (m ; H_4 ; 1H) ; 4.11-4.20 (m ; H_3 ; 1H) ; 4.94 (s ; H_{Cbz} ; 1H) ; 4.96 (s ; H_{Cbz} ; 1H) ; 6.49 (d, *J* = 9.3 Hz ; H_7 ; partially exchanged) ; 6.81 (d, *J* = 9.3 Hz ; H_6 ; partially exchanged) ; 7.15-7.31 (m ; H_{ar} ; 10H)
RMN C^{13} 90 MHz MeOD δ (ppm) : 28.9 (C_{tBu}) ; 38.5 (C_2) ; 39.6 (C_5) ; 52.3 (C_3) ; 52.3 (C_{Me}) ; 57.2 (C_4) ; 67.4 (C_{Cbz}) ; 80.4 ($C_{q\ tBu}$) ; 127.5 (C_{Ar}) ; 128.6 (C_{Ar}) ; 128.6 (C_{Ar}) ; 129.4 (C_{Ar}) ; 129.5 (C_{Ar}) ; 130.4 (C_{Ar}) ; 138.4 ($C_{q\ Ar}$) ; 139.6 ($C_{q\ Ar}$) ; 157.9 (CO_{Boc}) ; 158.7 (CO_{Cbz}) ; 173.3 (C_1)
HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 457.2339 found $M+H^+$ = 457.2325 $M+Na^+$ = 479.2144
IR (cm^{-1}): 3373, 2976, 2940, 1732, 1693, 1685, 1529, 1512.
$[\alpha]_D^{23}$ = -46.0 (c = 0.2, MeOH)

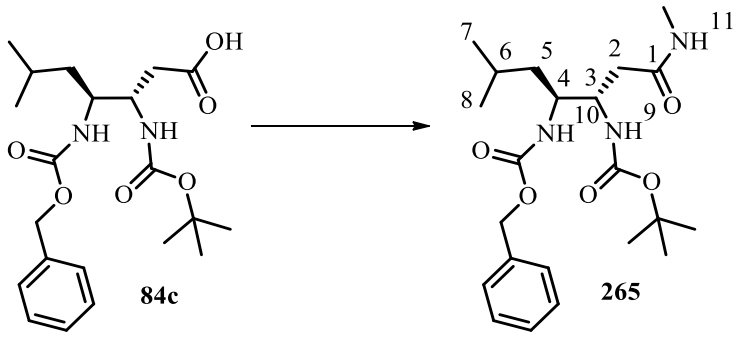
(3S,4R)-methyl 4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-5-phenylpentanoate 256

RMN H^1 360 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 1.36 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 2.45 (m ; H_2 and H_5 ; 3H) ; 2.92-3.01 (m ; H_5 ; 1H) ; 3.56 (s ; H_{Me} ; 3H) ; 3.94-4.05 (m ; H_3 and H_4 ; 2H) ; 4.98 (d, *J* = 12.5 Hz ; H_{Cbz} ; 1H) ; 5.05 (d, *J* = 12.5 Hz ; H_{Cbz} ; 1H) ; 5.15 (d, *J* = 7.7 Hz ; H_7 ; 1H) ; 5.43 (d, *J* = 7.9 Hz ; H_6 ; 1H) ; 7.05-7.23 (m ; H_{ar} ; 10H)
RMN C^{13} 90 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 28.5 (C_{tBu}) ; 38.5 (C_2) ; 38.1 (C_5) ; 51.5 (C_3) ; 52.0 (C_{Me}) ; 55.4 (C_4) ; 66.7 (C_{Cbz}) ; 79.9 ($C_{q\ tBu}$) ; 126.6 (C_{Ar}) ; 127.9 (C_{Ar}) ; 128.1 (C_{Ar}) ; 128.6 (C_{Ar}) ; 128.6 (C_{Ar}) ; 129.4 (C_{Ar}) ; 136.7 ($C_{q\ Ar}$) ; 137.7 ($C_{q\ Ar}$) ; 155.7 (CO_{Boc}) ; 156.4 (CO_{Cbz}) ; 172.5 (C_1)
HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 457.2339 found $M+H^+$ = 457.2325 $M+Na^+$ = 479.2144
IR (cm^{-1}): 3363, 3334, 2984, 2947, 1737, 1700, 1536, 1527.

$[\alpha]_D^{24}$ = 15.9 (c = 0.1, MeOH)

Methylamination

Benzyl tert-butyl ((3S,4S)-6-methyl-1-(methylamino)-1-oxoheptane-3,4-diyl)dicarbamate 265



Mr = 421.26 g/mol

$C_{22}H_{35}N_3O_5$

To a mixture of **84c** (0.25 g; 0.6 mmol) in tetrahydrofurane (2.0 mL) was added consecutively *N*-methylmorpholine *N*-oxide (0.07 mL) and isobutylchloroformate (80 mL) at -20 ºC under argon atmosphere. The mixture was stirred for 3 min, then an aqueous solution of methylamine (7 mL) was added. The resulting mixture was stirred for 1 hour at -20ºC, then treated with a sodium bicarbonate saturated aqueous solution (3 mL) and stirred for 30 min at room temperature. The desired product was extracted with a dichloromethane, dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography with cyclohexane/ethyl acetate (7/3) to give a white solid in 43% yield (111 mg).

RMN H^1 250 MHz MeOD δ (ppm) : 0.78 (d, *J*=6.8 Hz ; H_7 ; 3H) ; 0.81 (d, *J* = 6.8 Hz ; H_8 ; 3H) ; 1.17-1.26 (m ; H_5 ; 2H) ; 1.30 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 1.51-1.59 (m ; H_6 ; 1H) ; 2.16 (dd ; *J* = 14.4 Hz, 8.8 Hz ; H_2 ; 1H) ; 2.28 (dd, *J*=14.4 Hz, 5.6 Hz ; H_2 ; 1H) ; 2.58 (s ; H_{Me} ; 3H) ; 3.66-3.73 (m ; H_4 ; 1H) ; 3.89-3.93 (m ; H_3 ; 1H) ; 4.96 (s ; H_{Cbz} ; 2H) ; 7.19-7.27 (m ; H_{Ar} ; 5H)

RMN C^{13} 75 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 22.5 (C_7 or C_8) ; 23.7 (C_7 or C_8) ; 26.0 (C_6) ; 28.6 (C_{Me}) ; 28.9 (C_{tBu}) ; 40.4 (C_2) ; 42.5 (C_5) ; 53.2 (C_3) ; 53.8 (C_4) ; 67.6 (C_{Cbz}) ; 80.2 ($C_{q\ tBu}$) ; 128.8 (C_{Ar}) ; 129.0 (C_{Ar}) ; 129.5 (C_{Ar}) ; 138.4 ($C_{q\ Ar}$) ; 157.9 (CO_{Boc}) ; 158.9 (CO_{Cbz}) ; 173.8 (C_1)

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 422.2655 found $M+H^+$ = 422.2636 $M+Na^+$ = 444 .2478

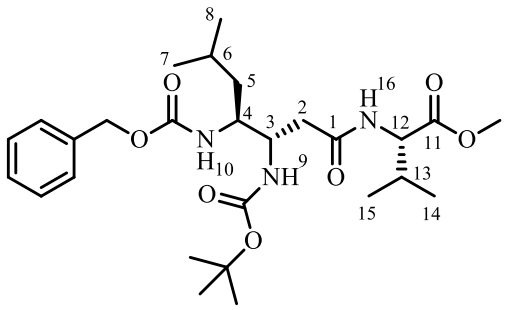
IR (cm^{-1}): 3316, 3309, 2960, 2927, 1727, 1693, 1642, 1528.

$[\alpha]_D^{24}$ = +115.4 (c = 0.1, MeOH)

Synthesis of peptides from β,γ-diaminoacid:

Synthesis of Boc-Ala-Leu-β,γ-Leu-Val-Ala-NHMe 229:

Peptide 226 **: Cbz-β,γ-Leu-L-Val-OMe**



Mr = 521.65 g/mol

$C_{27}H_{43}N_3O_7$

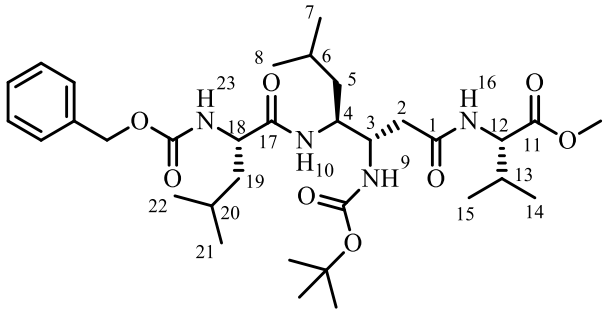
To the solution of hydroxybenzotriazole (26 mg; 0.19 mmol), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDCI) (37 mg; 0.19 mmol), L-valine methyl ester (25 mg; 0.19 mmol) and **84c** (65 mg; 0.16 mmol) in dimethylformamide (2.1 mL) was added *N*,*N*-Diisopropylethylamine (DIPEA) (42 μL; 0.24 mmol). The resulting mixture was stirred for 12 h at room temperature. The solution was diluted with ethyl acetate and treated with a 10% citric acid aqueous solution and washed with solutions of sodium bicarbonate and sodium chloride. The organic layer was dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography with cyclohexane/ethyl acetate (1/1) to give the white solid in 82 % yield (68 mg).

RMN H^1 300 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 0.74-0.87 (m ; H_7, H_8, H_{14} and H_{15} ; 12H) ; 1.20-1.25 (m ; H_5 ; 2H) ; 1.38 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 1.50-1.60 (m ; H_6 ; 1H) ; 2.14 (m, *J*=6.2 Hz ; H_{13} ; 1H) ; 2.30-2.49 (m ; H_2 ; 2H) ; 3.69 (s ; H_{Me} ; 3H) ; 3.76-3.92 (m ; H_3 and H_4 ; 2H) ; 4.48 (dd, *J*=8.7 Hz, 5.1 Hz ; H_{12} ; 1H) ; 5.08 (s ; H_{Cbz} ; 2H) ; 5.12 (sl ; H_9 ; 1H) ; 5.24 (d, *J*=7.3 Hz ; H_{10} ; 1H) ; 6.67 (d, *J*=6.5 Hz ; H_{16} ; 1H) ; 7.26-7.35 (m ; H_{Ar} ; 5H)

RMN C^{13} 75 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 18.0 (C_{14} or C_{15}) ; 19.2 (C_{14} or C_{15}) ; 22.2 (C_7 or C_8) ; 23.4 (C_7 or C_8) ; 25.0 (C_6) ; 28.5 (C_{tBu}) ; 31.1 (C_{13}) ; 37.6 (C_2) ; 42.0 (C_5) ; 52.3 (C_{Me}) ; 52.5 (C_3) ; 52.9 (C_4) ; 57.6 (C_{12}) ; 67.2 (C_{Cbz}) ; 79.8 ($C_{q\ tBu}$) ; 128.2 (C_{Ar}) ; 128.3 (C_{Ar}) ; 128.7 (C_{Ar}) ; 136.6 ($C_{q\ Ar}$) ; 156.2 (CO_{Boc}) ; 157.1 (CO_{Cbz}) ; 170.7 (C_1) ; 172.6 (C_{11})

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 522.3179 found $M+H^+$ = 522.3159 $M+Na^+$ = 544.2980

***Peptide 227* : Cbz-L-Leu-β,γ-Leu-L-Val-OMe**



Mr = 634.39 g/mol

$C_{33}H_{54}N_4O_8$

To the peptide **226** (42 mg; 0.08 mmol) in methanol (1.1 mL) 10% Pd/C (10 mg; 0.24 mmol) was added. The mixture was stirred for 30 min at room temperature under hydrogen atmosphere then filtered on celite and concentrated under reduced pressure.

To the resulting product (31 mg; 0.08 mmol), hydroxybenzotriazole (13 mg; 0.1 mmol), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDCI) (18 mg; 0.1 mmol), Cbz-L-Leu (21 mg; 0.08 mmol), *N*,*N*-Diisopropylethylamine (DIPEA) (18 μL; 0.1 mmol) and dimethylformamide (1.1 mL) were added. The mixture was stirred for 12 h at room temperature. The solution was diluted with ethyl acetate, treated with a 10% citric acid aqueous solution and washed with saturated solutions of sodium bicarbonate and sodium chloride. The organic layer was dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography with cyclohexane/ethyl acetate (1/1) to give the white solid in 82% yield (42 mg).

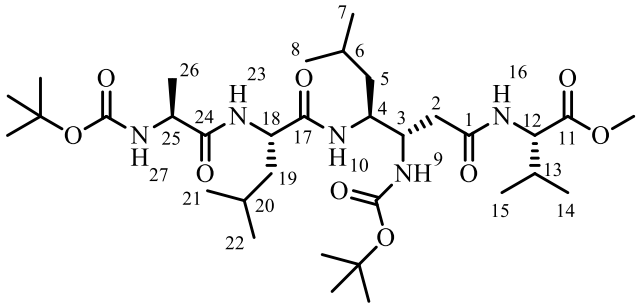
RMN H^1 300 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 0.82-0.87 (m ; H_{14} and H_{15} ; 6H) ; 0.89-0.96 (m ; H_7, H_8, H_{21} and H_{22} ; 12H) ; 1.18-1.32 (m ; H_6 and H_{20} ; 2H) ; 1.40 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 1.48-1.60 (m ; H_{19} ; 2H) ; 1.67 (m, *J*=6.8 Hz ; H_5 ; 2H) ; 2.04 (dd, *J*=12.9 Hz, 11.3 Hz ; H_2 ; 1H) ; 2.18 (m, *J*= 6.4 Hz ; H_{13} ; 1H) ; 2.46 (dd, *J*=12.9 Hz, 4.8 Hz ; H_2 ; 1H) ; 3.61 (sl ; H_4 ; 1H) ; 3.69 (s ; H_{Me} ; 3H) ; 3.95 (m, *J*=7.5 Hz ; H_{18} ; 1H) ; 4.17 (m, *J*= 5.0 Hz ; H_3 ; 1H) ; 4.68 (dd, *J*=8.3 Hz , 6.4 Hz ; H_{12} ; 1H) ; 5.06 (d, *J*=12.6 Hz ; H_{Cbz} ; 1H) ; 5.10 (d, *J*=12.6 Hz ; H_{Cbz} ; 1H) ; 5.21 (d, *J*=7.2 Hz ; H_{23} ; 1H) ; 6.46 (d, *J*=9.6 Hz ; H_9 ; 1H) ; 7.29 (m ; H_{Ar} ; 5H) ; 7.61 (sl ; H_{10} and H_{16} ; 2H)

RMN C^{13} 75 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 18.2 (C_{14} or C_{15}) ; 19.4 (C_{14} or C_{15}) ; 22.1 (C_{21} or C_{22}) ; 22.2 (C_{21} or C_{22}) ; 22.6 (C_7 and C_8) ; 24.9 (C_{20}) ; 25.2 (C_6) ; 28.7 (C_{tBu}) ; 30.0 (C_{13}) ; 38.1 (C_5) ; 39.8 (C_2) ; 40.1 (C_{19}) ; 51.1 (C_4) ; 52.2 (C_3) ; 52.5 (C_{Me}) ; 54.7 (C_{18}) ; 57.9 (C_{12}) ; 67.5 (C_{Cbz}) ; 79.0 ($C_{q\ tBu}$) ; 128.2 (C_{Ar})

; 128.3 (C_{Ar}) ; 128.7 (C_{Ar}) ; 136.3 ($C_{q\ Ar}$) ; 155.9 (CO_{Boc}) ; 157.0 (CO_{Cbz}) ; 171.8 (C_{17}) ; 174.1 (C_1) ; 175.2 (C_{11})

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 635.4020 found $M+H^+$ = 635.4012 $M+Na^+$ = 657.3824

***Peptide 228* : Boc-L-Ala-L-Leu-β,γ-Leu-L-Val-OMe**



Mr = 671.87 g/mol

$C_{33}H_{61}N_5O_9$

To the peptide **227** (40 mg; 0.06 mmol) in methanol (0.53 mL) 10% Pd/C (23 mg; 0.09 mmol) was added. The mixture was stirred for 30 min at room temperature under hydrogen atmosphere then filtered on celite and concentrated under reduced pressure.

To the resulting product (33 mg; 0.07 mmol) hydroxybenzotriazole (15 mg; 0.08 mmol), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDCI) (11 mg; 0.08 mmol), Boc-L-Ala (15 mg; 0.08 mmol), *N*,*N*-Diisopropylethylamine (DIPEA) (17 μL; 0.1 mmol) and dimethylformamide (0.9 mL) were added. The mixture was stirred for 12 h at room temperature. The solution was diluted with ethyl acetate, treated with a 10% citric acid aqueous solution and washed with saturated solutions of sodium bicarbonate and sodium chloride. The organic layer was dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography with pure ethyl acetate to give the white solid in 71% yield (30 mg).

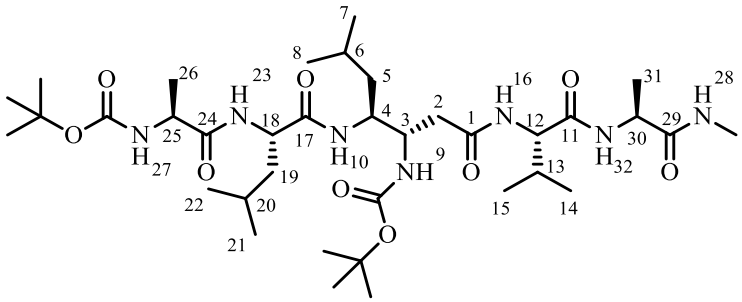
RMN H^1 300 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 0.83-0.94 (m ; H_7, H_8, H_{21} and H_{22} ; 12H) ; 0.88-0.95 (m ; H_{14} and H_{15} ; 6H) ; 1.33-1.36 (m ; H_{26} ; 3H) ; 1.37 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 1.44 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 1.46-1.55 (m ; H_5 and H_{19} ; 4H) ; 1.61-1.69 (m ; H_6 and H_{20} ; 2H) ; 2.10-2.18 (m ; H_{13} ; 1H) ; 2.24-2.36 (m ; H_2 ; 1H) ; 2.49 (dd, *J*=13.2 Hz, 6.4 Hz ; H_2 ; 1H) ; 3.68 (s ; H_{Me} ; 3H) ; 3.79 (sl ; H_{18} ; 1H) ; 4.12 (sl ; H_3 ; 1H) ; 4.13 (dd, *J*=12.6 Hz, 5.7 Hz ; H_{25} ; 1H) ; 4.18 (sl ; H_4 ; 1H) ; 4.45 (dd, *J*=8.4 Hz, 5.3 Hz ; H_{12} ; 1H) ; 5.01 (sl ; H_9 ; 1H) ; 5.77 (sl ; H_{27} ; 1H) ; 6.58 (d, *J*=5.6 Hz ; H_{10} ; 1H) ; 7.28 (sl ; H_{23} ; 1H) ; 7.73 (sl ; H_{16} ; 1H)

RMN C^{13} 75 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 17.6 (C_{26}) ; 18.2 (C_{14} or C_{15}) ; 19.4 (C_{14} or C_{15}) ; 22.0 (C_{21} or C_{22}) ; 22.1 (C_7 or C_8) ; 23.0 (C_{21} or C_{22}) ; 23.3 (C_7 or C_8) ; 25.1 (C_6) ; 25.2 (C_{20}) ; 28.5 (C_{tBu}) ; 28.7 (C_{tBu}) ;

30.5 (C_{13}) ; 40.0 (C_2) ; 40.6 (C_5 and C_{19}) ; 51.1 (C_{25}) ; 51.9 (C_{18}) ; 52.3 (C_{Me}) ; 53.6 (C_3 and C_4) ; 57.9 (C_{12}) ; 79.0 ($C_{q\ Boc}$) ; 81.3 ($C_{q\ Boc}$) ; 156.0 (CO_{Boc}) ; 156.3 (CO_{Boc}) ; 171.5 (C_{24}) ; 173.0 (C_{17}) ; 173.7 (C_1) ; 173.8 (C_{11})

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 672.4548 found $M+H^+$ = 672.4518

***Peptide 229* : Boc-L-Ala-L-Leu-β/γ-Leu-L-Val-L-Ala-NHMe**



Mr = 741.50 g/mol

$C_{36}H_{67}N_7O_9$

The peptide **228** (44 mg; 0.07 mmol) in methanol (0.65 mL) was saponified with 4N sodium hydroxide (72 µL; 0.65 mmol). The mixture was stirred for 3 hours at room temperature, acidified with 2N hydrochloric acid to pH = 1, then extracted with dichloromethane. The organic layer was dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure.

To the resulting product (30 mg; 0.046 mmol) hydroxybenzotriazole (6 mg; 0.046 mmol), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDCI) (9 mg; 0.046 mmol), H_2N-L-Ala-NHMe (6 mg; 0.055 mmol), *N*,*N*-Diisopropylethylamine (DIPEA) (12 µL; 0.068 mmol) and dimethylformamide (0,6 mL) were added. The mixture was stirred for 12 h at room temperature. The solution was diluted with ethyl acetate, treated with a 10% citric acid aqueous solution and washed with saturated solutions of sodium bicarbonate and sodium chloride. The organic layer was dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The product was precipitated in diethyl ether to give white solid in 43% yield (21 mg).

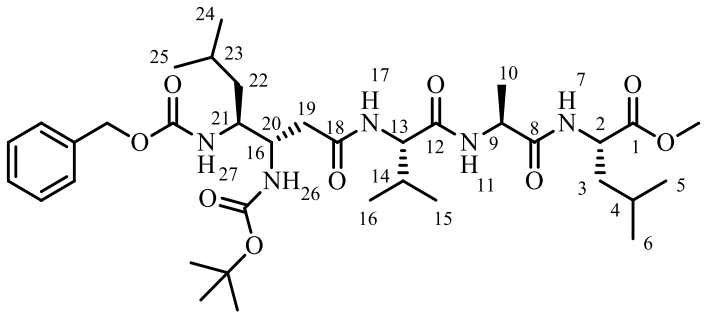
RMN H^1 360 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 0.76-0.83 (m ; H_7 and H_8 ; 6H) ; 0.88-0.97 (m ; H_{14} and H_{15} ; 6H) ; 0.99-1.07 (m ; H_{21} and H_{22} ; 6H) ; 1.35-1.43 (m ; H_{26} ; 3H) ; 1.38 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 1.42-1.50 (m ; H_{30} ; 3H) ; 1.46 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 1.46-1.55 (m ; H_5 and H_{19} ; 4H) ; 1.61-1.71 (m ; H_6 and H_{20} ; 2H) ; 2.21-2.29 (m ; H_{13} ; 1H) ; 2.29-2.37 (m ; H_2 ; 1H) ; 2.52-2.66 (m ; H_2 ; 1H) ; 2.73 (d, *J* = 4.6 Hz ; H_{Me} ; 3H) ; 3.87-3.94 (m ; H_{12} ; 1H) ; 4.00-4.16 (m ; H_4, H_{18} and H_{25} ; 3H) ; 4.14-4.24 (m ; H_3 ; 1H) ; 4.55-4.64 (m ; H_{30} ; 1H) ; 5.23 (sl ; H_{27} ; 1H) ; 5.49 (d, *J* = 9.3 Hz ; H_9 ; 1H) ; 6.57 (d, *J* = 9.6 Hz ; H_{16} ; 1H) ; 6.67-6.71 (sl ; H_{23} ; 1H) ; 7.11 (d, *J* = 9.6 Hz ; H_{10} ; 1H) ; 7.30-7.36 (sl ; H_{28} ; 1H) ; 8.12 (d, *J* = 7.7 Hz ; H_{32} ; 1H)

RMN C^{13} 90 MHz CD_3CN δ (ppm) : 18.3 (C_{31}) ; 18.8 (C_{26}) ; 19.6 (C_{14} or C_{15}) ; 19.6 (C_{14} or C_{15}) ; 21.6 (C_{21} or C_{22}) ; 22.3 (C_7 or C_8) ; 23.0 (C_{21} or C_{22}) ; 23.6 (C_7 or C_8) ; 25.5 (C_6) ; 25.6 (C_{20}) ; 28.6 (C_{Me}) ; 28.8 (C_{tBu}) ; 28.9 (C_{tBu}) ; 31.4 (C_{13}) ; 39.3 (C_2) ; 41.7 (C_5 and C_{19}) ; 50.6 (C_{30}) ; 51.5 (C_{25}) ; 52.5 (C_{18}); 54.0 (C_3 and C_4) ; 59.2 (C_{12}) ; 79.4 ($C_{q\ Boc}$) ; 79.5 ($C_{q\ Boc}$) ; 156.8 (CO_{Boc}) ; 156.8 (CO_{Boc}) ; 171.8 (C_{24}) ; 172.3 (C_{17}) ; 173.7 (C_1) ; 174.5 (C_{11}) ; 174.8 (C_{29})

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 742.5079 found $M+H^+$ = 742.5039 $M+Na^+$ = 764.4863

Synthesis of Boc-L-Val-L-Ala-L-Leu-β/γ-Leu-L-Val-L-Ala-L-Leu-OMe 240

***Peptide* 238: Cbz-β,γ-L-Val-L-Ala-L-Leu-OMe**



Mr = 705.43 g/mol

$C_{36}H_{59}N_5O_9$

To a solution of hydroxybenzotriazole (27 mg; 0.2 mmol), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDCI) (38 mg; 0.2 mmol), TFA.H_2N-L-Val-L-Ala-L-Leu-OMe (69 mg; 0.16 mmol) and **84c** (67 mg; 0.16 mmol) in dimethylformamide (2.2 mL) was added *N*,*N*-Diisopropylethylamine (DIPEA) (60 µL; 0.33 mmol). The resulting mixture was stirred for 12 h at room temperature. The solution was diluted with ethyl acetate treated with 10% citric acid aqueous solution and washed with saturated solutions of sodium bicarbonate and sodium chloride. The organic layer was dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography with cyclohexane/ethyl acetate (2/8) to give a white solid in 41% yield (20 mg).

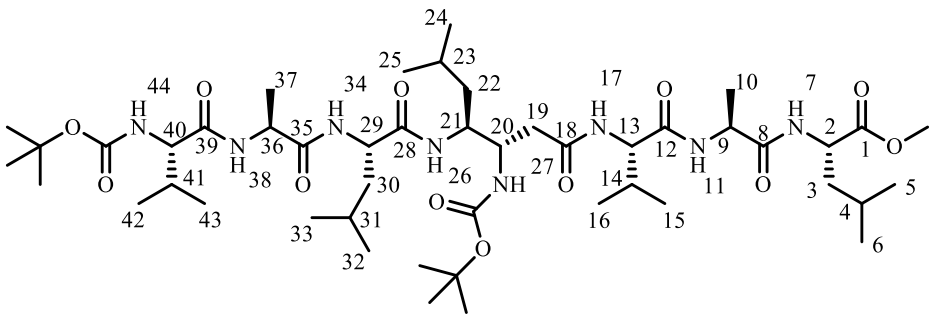
RMN H^1 360 MHz MeOD δ (ppm) : 0.82-0.93 (m ; H_5, H_6, H_{15}, H_{16}, H_{24} and H_{25} ; 18H) ; 1.24-1.31 (m ; H_{22} ; 2H) ; 1.30 (d, *J* = 7.2 Hz ; H_{10} ; 3H) ; 1.36 (s ; tBu ; 9H) ; 1.55-1.61 (m ; H_3 ; 2H) ; 1.61-1.64 (m ; H_4 ; 1H) ; 1.63-1.67 (m ; H_{23} ; 1H) ; 2.02-2.09 (m ; H_{14} ; 1H) ; 2.33 (dd, *J* = 14.1 Hz, 8.3 Hz ; H_{19} ; 1H) ; 2.43 (dd, *J* = 14.1 Hz, 6.0 Hz ; H_{19} ; 1H) ; 3.65 (s ; H_{Me} ; 3H) ; 3.73-3.78 (m ; H_{21} ; 1H) ; 3.94-4.03 (m ; H_{20} ; 1H) ; 4.14 (dd, *J* = 7.2 Hz, 6.4 Hz ; H_{13} ; 1H) ; 4.30-4.42 (m ; H_9 and H_2 ; 2H) ; 5.07 (d, *J* = 12.5

Hz ; H_{Cbz} ; 1H) ; 5.14 (d, *J* = 12.5 Hz ; H_{Cbz} ; 1H) ; 6.18 (d, *J* = 9.7 Hz ; H_{26} ; 1H) ; 6.69 (d, *J* = 9.4 Hz ; H_{27} ; 1H) ; 7.23-7.31 (m ; H_{Ar} ; 5H) ; 7.72 (d, *J* = 7.4 Hz ; H_{17} ; 1H) ; 8.10 (d, *J* = 7.7 Hz ; H_7 ; 1H) ; 8.17 (d, *J* = 6.8 Hz ; H_{11} ; 1H)

RMN C^{13} 100 MHz MeOD δ (ppm) : 17.8 (C_{10}) ; 18.6 (C_{15} or C_{16}) ; 29.9 (C_{15} or C_{16}) ; 22.2 (C_5 or C_6) ; 22.5 (C_5 or C_6) ; 23.4 (C_{24} or C_{25}) ; 23.8 (C_{24} or C_{25}) ; 26.0 (C_4) ; 26.1 (C_{23}) ; 28.9 (C_{tBu}) ; 32.0 (C_{14}) ; 40.2 (C_{19}) ; 41.6 (C_3) ; 42.4 (C_{22}) ; 50.4 (C_9) ; 52.5 (C_2) ; 52.8 (C_{Me}) ; 53.4 (C_{21}) ; 53.9 (C_{20}) ; 60.4 (C_{13}) ; 67.8 (C_{Cbz}) ; 80.3 ($C_{q\ tBu}$) ; 128.9 (C_{Ar}) ; 129.1 (C_{Ar}) ; 129.6 (C_{Ar}) ; 137.4 ($C_{q\ Ar}$) ; 138.5 ($C_{q\ Ar}$) ; 157.8 (CO_{Boc}) ; 159.1 (CO_{Cbz}) ; 173.4 (C_{18} and C_8) ; 174.6 (C_{12}) ; 175.1 (C_1)

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 706.4391 found $M+H^+$ = 706.4386 $M+Na^+$ = 728.4201

***Peptide 240* : Boc-L-Val-L-Ala-L-Leu-β/γ-Leu-L-Val-L-Ala-L-Leu-OMe**



Mr = 954.64 g/mol

$C_{47}H_{86}N_8O_{12}$

To the peptide **238** (20 mg; 0.03 mmol) in methanol (0.3 mL) 10% Pd/C (11 mg; 0.04 mmol) was added. The mixture was stirred for 30 min at room temperature under hydrogen atmosphere then filtered on celite and concentrated under reduced pressure.

The resulting product (16 mg; 0.03 mmol) in dimethylformamide (0.2 mL) was added to Boc-L-Val-L-Ala-L-Leu-OH (11 mg; 0,03) activated in advance with HATU (11 mg; 0.03 mmol) and *N*,*N*-Diisopropylethylamine (DIPEA) (5 μL ; 0.03 mmol) in dimethylformamide (0.2 mL) at room temperature under argon atmosphere for 15 min. The mixture was stirred for 12 h at room temperature. The solution was diluted with ethylacetate, treated with a 10% citric acid aqueous solution and washed with saturated solutions of sodium bicarbonate and sodium chloride. The organic layer was dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was precipitated in diethyl ether to give a white solid in 81% yield (22 mg).

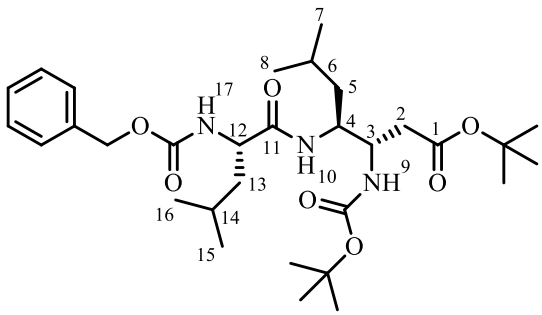
RMN H^1 400 MHz $CDCl_3$ (500 μL)+DMSO (140 μL) δ (ppm) : 0.70-0.89 (m ; H_5, H_6, H_{15}, H_{16}, H_{24}, H_{25}, H_{32}, H_{33}, H_{42} and H_{43} ; 30 H) ; 1.19-1.39 (m ; H_{10} ; 3H) ; 1.20-1.39 (m ; H_{37} ; 3H) ; 1.24-1.36 (m ; H_3, H_{22} and H_{30} ; 6H) ; 1.32-1.64 (m ; H_4 ; 1H) ; 1.38 (s ; tBu ; 9H) ; 1.40-1.64 (m ; H_{23} and H_{31} ; 2H) **;** 1.81-2.04 (m ; H_{40} ; 1H) ; 2.09-2.18 (m ; H_{19} ; 1H) ; 2.19-2.27 (m ; H_{19} ; 1H) ; 2.23-2.33 (m ; H_{14} ; 1H) ; 3.58 (s ; H_{Me} ; 3H) ; 3.84-3.92 (m ; H_{40} ; 1H) ; 3.92-4.09 (m ; H_{13} ; 1H) ; 4.03-4.14 (m ; H_{20} ; 1H) ; 4.06-4.13 (m ; H_{29} ; 1H) ; 4.08-4.20 (m ; H_{21} ; 1H) ; 4.10-4.21 (m ; H_{36} ; 1H) ; 4.24-4.34 (m ; H_2 ; 1H) ; 4.32-4.46 (m ; H_9 ; 1H) ; 5.66 (d, *J* = 7.7 Hz ; H_{44} ; 1H) ; 6.08 (d, *J* = 9.2 Hz ; H_{27} ; 1H) ; 7.24-7.28 (sl ; H_{17} ; 1H) ; 7.36 (d, *J* = 7.1 Hz ; H_{34} ; 1H) ; 7.49-7.53 (sl ; H_{26} ; 1H) ; 7.50-7.54 (sl ; H_7 ; 1H) ; 8.00 (d, *J* = 5.5 Hz ; H_{38} ; 1H) ; 8.10 (d, *J* = 7.0 Hz ; H_{11} ; 1H)

RMN C^{13}: the quantity of the peptide 9 is insufficient to get quality C^{13} spectrum.

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 955.6443 found $M+H^+$= 955.6429 $M+Na^+$ = 977.6246

Synthesis of Boc-L-Ala-L-Leu-β,γ-Leu-L-Ala-L-Leu-β,γ-Leu -Val-OMe 242

***Peptide 266* : Cbz-L-Leu-β/γ-Leu-O*t*Bu**



Mr = 577.37 g/mol

$C_{31}H_{57}N_3O_7$

To the compound **72c** (63 mg; 0.14 mmol) in methanol (1.7 mL) 10% Pd/C (17 mg; 0.4 mmol) was added. The mixture was stirred for 30 min at room temperature under hydrogen atmosphere then filtered on celite and concentrated under reduced pressure.

The resulting product (45 mg; 0.14 mmol) was added to a solution of hydroxybenzotriazole (22 mg; 0.16 mmol), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDCI) (31 mg; 0.16 mmol), Cbz-L-Leu (40 mg; 0.15 mmol) and *N*,*N*-Diisopropylethylamine (DIPEA) (31 μL; 0.18 mmol) in dimethylformamide (1.8 mL). The resulting mixture was stirred for 12 h at room temperature. The solution was diluted with ethyl acetate, treated with a 10% citric acid aqueous solution and washed with saturated solutions of sodium bicarbonate and sodium chloride. The organic layer was dried with magnesium sulfate and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica

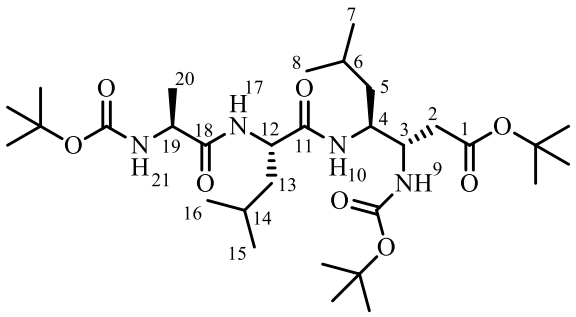
gel column chromatography cyclohexane/ethyl acetate (1/1) to give the white solid in 92% yield (72 mg).

RMN H^1 400 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 0.83 (d, *J*=7.1 Hz ; H_7 or H_8 ; 3H) ; 0.85 (d, *J*=7.1 Hz ; H_7 or H_8 ; 3H) ; 0.91 (d, *J*=6.0 Hz ; H_{15} and H_{16} ; 6H) ; 1.27-1.35 (m ; H_{13} ; 2H) ; 1.39 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 1.41 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 1.50-1.68 (m ; H_5, H_6 and H_{14} ; 4H) ; 2.33 (dd, *J*=14.9 Hz, 7.9 Hz ; H_2 ; 1H) ; 2.44 (dd, *J*=14.9 Hz, 3.9 Hz ; H_2 ; 1H) ; 3.84-3.96 (m ; H_3 ; 1H) ; 3.99-4.17 (m ; H_4 et H_{12} ; 2H) ; 5.04-5.11 (m ; H_9 ; 1H) ; 5.07 (s ; H_{Cbz} ; 2H) ; 5.22- 5.32 (m ; H_{17} ; 1H) ; 6.48 (d, *J*=9.1 Hz ; H_{10} ; 1H) ; 7.26-7.35 (m ; H_{Ar} ; 5H)

RMN C^{13} 100 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 22.1 (C_7 or C_8) ; 23.2 (C_{15} and C_{16}) ; 23.5 (C_7 or C_8) ; 24.8 (C_6 and C_{14}) ; 28.3 (C_{tBu}) ; 28.6 (C_{tBu}) ; 39.3 (C_2) ; 41.5 (C_5) ; 41.8 (C_{13}) ; 50.7 (C_4) ; 52.1 (C_3) ; 54.2 (C_{12}) ; 67.4 (C_{Cbz}) ; 79.7 ($C_{q\ tBu}$) ; 81.2 ($C_{q\ tBu}$) ; 128.2 (C_{Ar}) ; 128.4 (C_{Ar}) ; 128.7 (C_{Ar}) ; 136.4 ($C_{q\ Ar}$) ; 156.0 (CO_{Boc}) ; 156.5 (CO_{Cbz}) ; 170.5 (C_{11}) ; 172.5 (C_1)

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 578.3727 found $M+H^+$= 578.3805 $M+Na^+$ = 600.3597

***Peptide 267* : Boc-Ala-Leu-β/γ-Leu-O*t*Bu**



Mr = 614.42 g/mol

$C_{31}H_{58}N_4O_8$

To the peptide **266** (60 mg; 0.11mmol) in methanol (0.8 mL) 10% Pd/C (34 mg; 0.17 mmol) was added. The mixture was stirred for 30 min at room temperature under hydrogen atmosphere then filtered on celite and concentrated under reduced pressure.

To the resulting product (41 mg; 0.09 mmol), hydroxybenzotriazole (15 mg; 0.11 mmol), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDCI) (21 mg; 0.11 mmol), Boc-L-Ala-OH (25 mg; 0.09 mmol), *N*,*N*-Diisopropylethylamine (DIPEA) (21 μL; 0.12 mmol) and dimethylformamide (1.2 mL) were added. The resulting mixture was stirred for 12 h at room temperature. The solution was diluted with ethyl acetate, treated with a 10% citric acid aqueous solution and washed with saturated

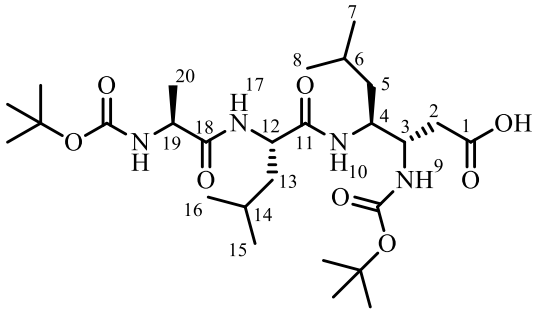
solutions of sodium bicarbonate and sodium chloride. The organic layer was dried with magnesium sulfate and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography with ethyl acetate/heptane (4/6) to give the white solid in 68% yield (41 mg).

RMN H^1 250 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 0.81-0.90 (m ; H_7, H_8, H_{15} and H_{16} ; 12H) ; 1.29-1.35 (m ; H_5 and H_{13} ; 4H) ; 1.34-1.36 (m ; H_{20} ; 3H) ; 1.36 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 1.39 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 1.41 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 1.46-1.65 (m ; H_6 and H_{14} ; 2H) ; 2.30 (dd, *J*=15.4 Hz, 8.2 Hz ; H_2 ; 1H) ; 2.42 (dd, *J*=15.4 Hz, 5.7 Hz ; H_2 ; 1H) ; 3.97-4.19 (m ; H_3, H_4, H_{19} ; 3H) ; 4.24-4.34 (m ; H_{12} ; 1H) ; 5.12-5.19 (m ; H_9 and H_{21} ; 2H) ; 6.53 (d, *J*=6.1 Hz ; H_{17} ; 1H) ; 6.71 (d, *J*=9.1 Hz ; H_{10} ; 1H)

RMN C^{13} 100 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 17.8 (C_{20}) ; 21.9 (C_7 or C_8) ; 22.2 (C_7 or C_8) ; 23.2 (C_{15} or C_{16}) ; 23.3 (C_{15} or C_{16}) ; 24.9 (C_6) ; 25.2 (C_{14}) ; 28.2 (C_{tBu}) ; 28.5 (C_{tBu}) ; 28.6 (C_{tBu}) ; 39.5 (C_2) ; 40.8 (C_5) ; 41.6 (C_{13}) ; 50.4 (C_4) ; 51.3 (C_3) ; 51.9 (C_{12}) ; 52.8 (C_{19}) ; 79.2 ($C_{q\ tBu}$) ; 80.8 ($C_{q\ tBu}$) ; 81.0 ($C_{q\ tBu}$) ; 155.9 (CO_{Boc}) ; 156.3 (CO_{Boc}) ; 170.6 (C_{11}) ; 171.9 (C_{18}) ; 173.1 (C_1)

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 615.4335 found $M+H^+$ = 615.4314 $M+Na^+$ = 637.4140

***Peptide 267a* : Boc-L-Ala-L-Leu-β,γ-Leu-OH**



Mr = 558.36 g/mol

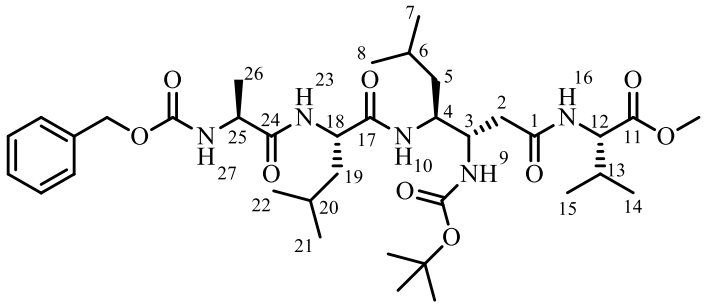
$C_{27}H_{50}N_4O_8$

Peptide **267** (0.03 g; 0.049 mmol) was dissolved in dichloromethane (0.4 mL) and a trifluoroacetic acid (0.04 mL; 0.5 mmol) was added slowly at 0°C. The resulting mixture was stirred for 3 h at room temperature, then solvent was evaporated under reduced pressure.

The resulting product (0.017 g; 0.05 mmol) was dissolved in methanol (0.13 mL) was added triethylamine (0.01 mL) at room temperature under argon atmosphere. The solution was stirred for 15 min and Boc_2O (0.011 g; 0.05 mmol) in methanol (0.13 mL) was slowly added. The resulting mixture was stirred for 12 h at room temperature. Then the solvent was evaporated under reduced pressure, the crude product was dissolved in ethyl acetate (2 mL) and washed with 10% citric acid aqueous solution and sodium chloride saturated solution. The organic layer was dried with magnesium sulfate, filtered

and concentrated under reduced pressure. The crude product was precipitated with diethyl ether to give a white solid in 54% yield (15 mg).

***Peptide 268*: Cbz-L-Ala-L-Leu-β/γ-Leu-L-Val-O*t*Bu**



Mr = 705.43 g/mol

$C_{36}H_{59}N_5O_9$

To the peptide **227** (77 mg; 0.11mmol) in methanol (1 mL) 10% Pd/C (44 mg; 0.16 mmol) was added. The mixture was stirred for 30 min at room temperature under hydrogen atmosphere then filtered on celite and concentrated under reduced pressure.

To the resulting product (68 mg; 0.14 mmol), hydroxybenzotriazole (22 mg; 0.16 mmol), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDCI) (31 mg; 0.16 mmol), Cbz-L-Ala (33 mg; 0.15 mmol), *N*,*N*-Diisopropylethylamine (DIPEA) (23 µL; 0.18 mmol) and dimethylformamide (2 mL) were added. The resulting mixture was stirred for 12 h at room temperature. The solution was diluted with ethyl acetate, treated with a 10% citric acid aqueous solution and washed with saturated solutions of sodium bicarbonate and sodium chloride. The organic layer was dried with magnesium sulfate and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography with ethyl acetate 100% to give the white solid in 57% yield (55 mg).

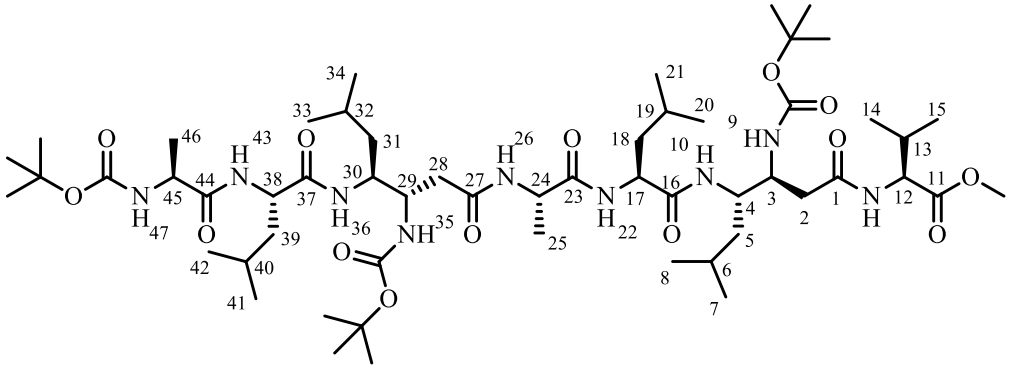
RMN H^1 250 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 0.82-0.94 (m ; H_7, H_8, H_{14}, H_{15}, H_{21} and H_{22} ; 18H) ; 1.38 (m ; H_{26} ; 3H) ; 1.39 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 1.47-1.69 (m ; H_5, H_6, H_{19} and H_{20} ; 6H) ; 2.12-2.21 (m ; H_{13} ; 1H) ; 2.27 (dd, *J*=12.6 Hz, 9.6 Hz ; H_2 ; 1H) ; 2.49 (dd ; *J*=12.6 Hz, 6.0 Hz ; H_2 ; 1H) ; 3.69 (s ; H_{Me} ; 3H) ; 3.70-3.75 (m ; H_{18} ; 1H) ; 4.08-4.19 (m ; H_3, H_4 and H_{25} ; 3H) ; 4.43 (dd ; *J*=8.4 Hz, 6.6 Hz ; H_{12} ; 1H) ; 5.10 (s ; H_{Cbz} ; 2H) ; 5.53 (sl ; H_{27} ; 1H) ; 6.09 (sl ; H_9 ; 1H) ; 6.60 (sl ; H_{10} ; 1H) ; 7.27-7.40 (m ; H_{23} and H_{Ar} ; 6H) ; 7.76 (d, *J*=8.0 Hz ; H_{16} ; 1H)

RMN C^{13} 75 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 17.9 (C_{26}) ; 18.2 (C_{14} or C_{15}) ; 19.4 (C_{14} or C_{15}) ; 22.0 (C_{21} or C_{22}) ; 22.2 (C_7 or C_8) ; 22.9 (C_{21} or C_{22}) ; 23.3 (C_7 or C_8) ; 25.1 (C_6) ; 25.3 (C_{20}) ; 28.7 (C_{tBu}) ; 30.5 (C_{13}) ; 40.0 (C_2) ; 40.5 (C_5 and C_{19}) ; 51.5 (C_{25}) ; 51.7 (C_{18}) ; 52.3 (C_{Me}) ; 53.6 (C_3 and C_4) ; 58.0 (C_{12}) ; 67.7 (C_{Cbz}) ;

79.1 ($C_{q\ Boc}$) ; 128.4 (C_{Ar}) ; 128.7 (C_{Ar}) ; 128.9 (C_{Ar}) ; 136.1 ($C_{q\ Cbz}$) ; 156.0 (CO_{Boc}) ; 156.8 (CO_{Cbz}) ; 171.5 (C_{24}) ; 173.0 (C_{17}) ; 173.4 (C_1) ; 174.0 (C_{11})

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 706.4391 found $M+H^+$ = 706.4381 $M+Na^+$ = 728.4208

Peptide 242 **: Boc-L-Ala-L-Leu-β/γ-Leu-L-Ala-L-Leu-β/γ-Leu –L-Val-OMe**



Mr = 1111.75 g/mol

$C_{55}H_{101}N_9O_{14}$

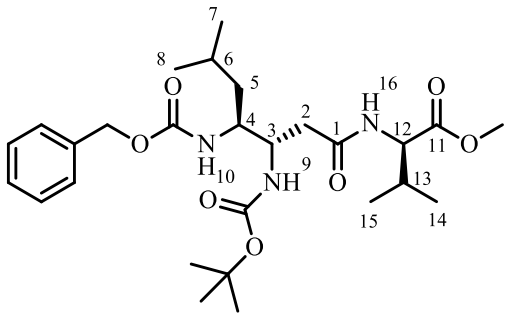
To the peptide **268** (43 mg; 0.06 mmol) in methanol (0.6 mL) 10% Pd/C (16 mg; 0.06 mmol) was added. The mixture was stirred for 30 min at room temperature under hydrogen atmosphere then filtered on celite and concentrated under reduced pressure to 34 mg of crude product.

The resulting product (9 mg; 0.016 mmol) in dimethylformamide (0.1 mL) was added to peptide **267a** (9 mg; 0.02) activated with hydroxybenzotriazole (3 mg; 0.019 mmol), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDCI) (0.04; 0,019) and *N*,*N*-Diisopropylethylamine (DIPEA) (4 µL; 0.021 mmol) in dimethylformamide (0.1 mL) at room temperature under argon atmosphere for 15 min. The mixture was stirred for 12 h at room temperature. The solution was diluted with ethyl acetate, treated with a 10% citric acid aqueous solution and washed with saturated solutions of sodium bicarbonate and sodium chloride. The organic layer was dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. Currently the peptide **242** is under purification by HPLC.

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 1112.7546 found $M+H^+$ = 1112.7516 $M+Na^+$ = 1134.7367

Synthesis of Boc-D-Ala-D-Leu-β,γ-Leu-D-Val-D-Ala-NHMe 233

***Peptide 230*: Cbz-β/γ-Leu-D-Val-OMe**



Mr = 521.65 g/mol

$C_{27}H_{43}N_3O_7$

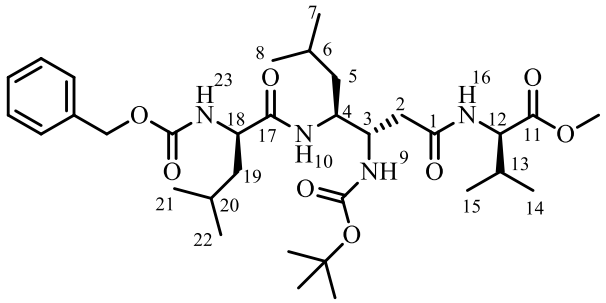
To a solution of hydroxybenzotriazole (20 mg; 0.1 mmol), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDCI) (28 mg; 0.15 mmol), D-valine methyl ester (16 mg; 0.12 mmol) and **84c** (50 mg; 0.1 mmol) in dimethylformamide (1.6 mL) was added *N*,*N*-Diisopropylethylamine (DIPEA) (28 µL; 0.16 mmol). The resulting mixture was stirred for 12 h at room temperature. The solution was diluted with ethyl acetate, treated with 10% citric acid aqueous solution and washed with saturated solutions of sodium bicarbonate and sodium chloride. The organic layer was dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography with heptane/ethyl acetate (1/1) to give the white solid in 57 % yield (15 mg).

RMN H^1 300 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 0.84-0.95 (m ; H_7, H_8, H_{14} and H_{15} ; 12H) ; 1.25-1.32 (m ; H_5 ; 2H) ; 1.40 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 1.41-1.49 (m ; H_6 ; 1H) ; 2.11-2.21 (m ; H_{13} ; 1H) ; 2.48 (sl ; H_2 ; 2H) ; 3.68 (s ; H_{Me} ; 3H) ; 3.76-3.88 (m ; H_3 et H_4 ; 2H) ; 4.47 (dd, *J*=7.9 Hz, 4.6 Hz ; H_{12} ; 1H) ; 5.04 (d, *J*=12.2 Hz ; H_{Cbz} ; 1H) ; 5.10 (d, *J*=12.2 Hz ; H_{Cbz} ; 1H) ; 5.20 (d, *J*=7.4 Hz ; H_9 ; 1H) ; 5.69 (d, *J*=5.8 Hz ; H_{10} ; 1H) ; 6.83 (d, *J*=6.8 Hz ; H_{16} ; 1H) ; 7.29-7.35 (m ; H_{Ar} ; 5H)

RMN C^{13} 63 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 18.0 (C_{14} or C_{15}) ; 19.2 (C_{14} or C_{15}) ; 22.2 (C_7 or C_8) ; 23.3 (C_7 or C_8) ; 25.0 (C_6) ; 28.5 (C_{tBu}) ; 31.3 (C_{13}) ; 37.6 (C_2) ; 42.1 (C_5) ; 52.2 (C_{Me}) ; 53.0 (C_3) ; 53.9 (C_4) ; 57.5 (C_{12}) ; 67.1 (C_{Cbz}) ; 79.7 ($C_{q\ tBu}$) ; 128.3 (C_{Ar}) ; 128.3 (C_{Ar}) ; 128.7 (C_{Ar}) ; 136.6 ($C_{q\ Cbz}$) ; 156.2 (CO_{Boc}) ; 157.1 (CO_{Cbz}) ; 170.5 (C_1) ; 172.6 (C_{11})

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 522.3179 found $M+H^+$ = 522.3132 $M+Na^+$ = 544.2961

Peptide 231 **: Cbz-D-Leu-β/γ-Leu-D-Val-OMe**



Mr = 634.39 g/mol

$C_{33}H_{54}N_4O_8$

To the peptide **230** (45 mg; 0.07 mmol) in methanol (0.5 mL) the 10% Pd/C (20 mg; 0.1 mmol) was added. The mixture was stirred for 30 min at room temperature under hydrogen atmosphere then filtered on celite and concentrated under reduced pressure.

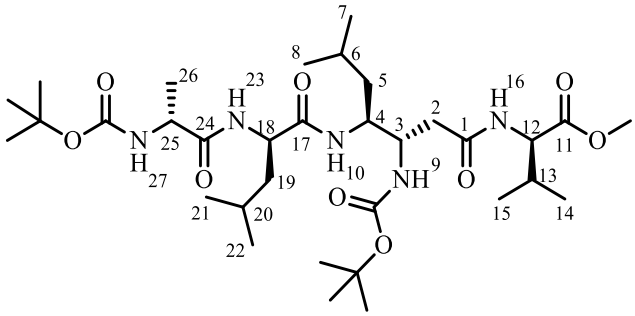
To the resulting product (26 mg; 0.1 mmol), hydroxybenzotriazole (11 mg; 0.08 mmol), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDCI) (15 mg; 0.08 mmol), Cbz-D-Leu-OH (18 mg; 0.07 mmol), *N*,*N*-Diisopropylethylamine (DIPEA) (15 µL; 0.09 mmol) and dimethylformamide (0.9 mL) were added. The mixture was stirred for 12 h at room temperature. The solution was diluted with ethyl acetate, treated with a 10% citric acid aqueous solution and washed with saturated solutions of sodium bicarbonate and sodium chloride. The organic layer was dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography with cyclohexane/ethyl acetate (1/1) to give the white solid in 74% yield (55 mg).

RMN H^1 360 MHz MeOD δ (ppm) : 0.85-0.97 (m ; H_7, H_8, H_{14} H_{15}, H_{21} and H_{22} ; 18H) ; 1.25-1.35 (m ; H_5 ; 2H) ; 1.43 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 1.45-1.58 (m ; H_{19} ; 2H) ; 1.50-1.59 (m ; H_6 ; 1H) ; 1.64-1.72 (m ; H_{20} ; 1H) ; 2.06-2.12 (m ; H_{13} ; 1H) ; 2.23 (dd, *J* = 14.0 Hz, 7.8 Hz ; H_2 ; 1H) ; 2.48 (dd, *J* = 14.0 Hz, 6.6 Hz ; H_2 ; 1H) ; 3.70 (s ; H_{Me} ; 3H) ; 4.03-4.11 (m ; H_3, H_4 and H_{18} ; 3H) ; 4.35 (dd, *J*=8.1 Hz, 6.5 Hz ; H_{12} ; 1H) ; 5.09 (d, *J*=12.7 Hz ; H_{Cbz} ; 2H) ; 5.14 (d, *J*=12.7 Hz ; H_{Cbz} ; 2H) ; 6.35 (d, *J* = 9.6 Hz ; H_9 ; 1H) ; 7.26-7.35 (m ; H_{23} and H_{Ar} ; 6H) ; 7.81 (d, *J* = 9.3 Hz ; H_{10} ; 1H) ; 8.06 (d, *J* = 8.2 Hz ; H_{16} ; 1H)

RMN C^{13} 63 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 18.7 (C_{14} or C_{15}) ; 19.7 (C_{14} or C_{15}) ; 22.1 (C_7 or C_8) ; 22.3 (C_{21} or C_{22}) ; 23.5 (C_7 or C_8) ; 22.8 (C_{21} or C_{22}) ; 26.1 (C_6 and C_{20}) ; 28.9 (C_{tBu}) ; 32.2 (C_{13}) ; 40.8 (C_2) ; 42.2 (C_5) ; 42.4 (C_{19}) ; 51.9 (C_{18}) ; 52.6 (C_{Me}) ; 53.5 (C_3) ; 55.5 (C_4) ; 59.3 (C_{12}) ; 67.8 (C_{Cbz}) ; 80.3 ($C_{q\ tBu}$) ; 128.9 (C_{Ar}) ; 129.2 (C_{Ar}) ; 129.6 (C_{Ar}) ; 138.3 ($C_{q\ Ar}$) ; 157.9 (CO_{Boc}) ; 158.7 (CO_{Cbz}) ; 173.3 (C_1) ; 173.6 (C_{17}) ; 175.9 (C_{11})

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 635.4020 found $M+H^+$ = 635.4001 $M+Na^+$ = 657.3824

***Peptide 232*: Boc-D-Ala-D-Leu-β/γ-Leu-D-Val-OMe**



Mr = 671.45 g/mol

$C_{33}H_{61}N_5O_9$

To the peptide **231** (28 mg; 0.04 mmol) in methanol (0.4 mL) 10% Pd/C (16 mg; 0.06 mmol) was added. The mixture was stirred for 30 min at room temperature under hydrogen atmosphere then filtered on celite and concentrated under reduced pressure.

To the resulting product (20 mg; 0.04 mmol), hydroxybenzotriazole (6 mg; 0.05 mmol), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDCI) (9 mg; 0.05 mmol), Boc-D-Ala-OH (8 mg; 0.04 mmol), *N*,*N*-Diisopropylethylamine (DIPEA) (9 μL; 0.05 mmol) and dimethylformamide (0.5 mL) were added. The mixture was stirred for 12 h at room temperature. The solution was diluted with ethyl acetate, treated with a 10% citric acid aqueous solution and washed with saturated solutions of sodium bicarbonate and sodium chloride. The organic layer was dried with magnesium sulfate and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography with pure ethyl acetate to give the white solid in 56% yield (17 mg).

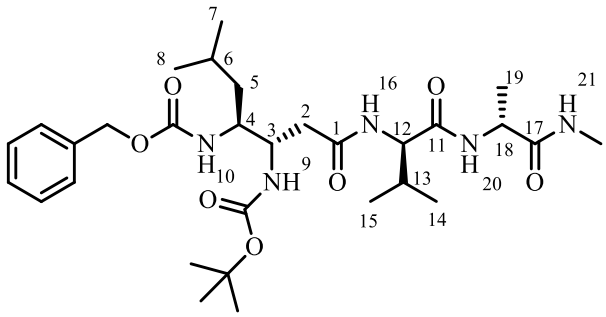
RMN H^1 250 MHz CD_3CN δ (ppm) : 0.79-0.87 (m ; H_7 and H_8 ; 6H) ; 0.84-0.92 (m ; H_{21} and H_{22} ; 6H) ; 0.91-0.94 (m ; H_{14} et H_{15} ; 6H) 1.21-1.33 (m ; H_6 and H_{20} ; 2H) ; 1.27 (d, *J*=7.1 Hz ; H_{26} ; 3H) ; 1.40 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 1.42 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 1.47-1.68 (m ; H_5 and H_{19} ; 4H) ; 2.01-2.10 (m ; H_{13} ; 1H) ; 2.16-2.20 (m ; H_2 ; 1H) ; 2.38 (dd, *J*=14.2 Hz, 7.6 Hz ; H_2 ; 1H) ; 3.66 (s ; H_{Me} ; 3H) ; 3.84-3.94 (m ; H_3 ; 1H) ; 3.96-4.05 (m ; H_{25} ; 1H) ; 4.01-4.06 (m ; H_4 ; 1H) ; 4.10-4.16 (m ; H_{18} ; 1H) ; 4.28 (dd, *J*=8.2 Hz, 5.5 Hz ; H_{12} ; 1H) ; 5.46 (d, *J*=8.7 Hz ; H_9 ; 1H) ; 5.72 (d, *J*=5.4 Hz ; H_{27} ; 1H) ; 6.65 (d, *J*=6.5 Hz ; H_{10} ; 1H) ; 6.97 (d, *J*=6.5 Hz ; H_{23} ; 1H) ; 7.27 (d, *J*=8.2 Hz ; H_{16} ; 1H)

RMN C^{13} 75 MHz CD_3CN δ (ppm) : 18.5 (C_{26}) ; 19.5 (C_{14} or C_{15}) ; 22.0 (C_{14} or C_{15}) ; 22.1 (C_{21} or C_{22}) ; 22.1 (C_7 or C_8) ; 23.4 (C_{21} or C_{22}) ; 23.5 (C_7 or C_8) ; 25.5 (C_6) ; 25.6 (C_{20}) ; 28.6 (C_{tBu}) ; 28.6 (C_{tBu}) ; 31.7 (C_{13}) ; 40.5 (C_2) ; 41.1 (C_5) 41.5 (C_{19}) ; 51.0 (C_{25}) ; 51.6 (C_{18}) ; 52.5 (C_{Me}) ; 53.2 (C_3) 53.6

(C_4) ; 58.7 (C_{12}) ; 79.6 ($C_{q\ tBu}$) ; 80.4 ($C_{q\ tBu}$) ; 156.7 (CO_{Boc}) ; 156.8 (CO_{Boc}) ; 171.4 (C_{24}) ; 173.3 (C_{17}) ; 173.8 (C_1) ; 174.3 (C_{11})

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 672.4541 found $M+H^+$ = 672.4522

***Peptide 235* : Cbz-β/γ-Leu-D-Val-D-Ala-NHMe**



Mr = 591.36 g/mol

$C_{30}H_{49}N_5O_7$

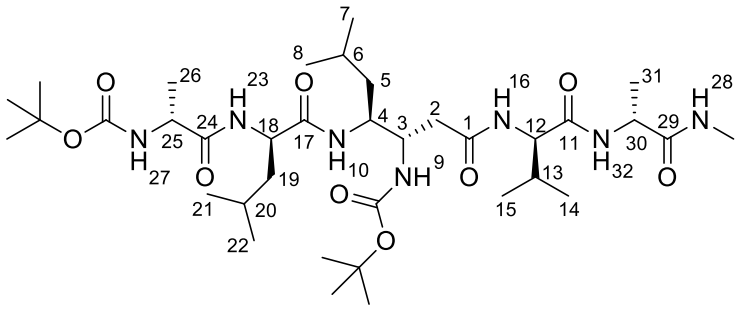
The H_2N-D-Val-D-Ala-NHMe (49 mg; 0.16 mmol) in dimethylformamide (1.0 mL) was added to **84c** (74 mg; 0.18) activated in advance with HATU (62 mg; 0.16 mmol) and *N*,*N*-Diisopropylethylamine (DIPEA) (57 μL; 0.33 mmol) in dimethylformamide (1.2 mL) at room temperature under argon atmosphere for 15 min. The mixture was stirred for 12 h at room temperature. The solution was diluted with ethyl acetate, treated with a 10% citric acid aqueous solution and washed with saturated solutions of sodium bicarbonate and sodium chloride. The organic layer was dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The rude product was precipitated with diethyl ether to give white solid in 44% yield (47 mg).

RMN H^1 250 MHz MeOD δ (ppm) : 0.76-0.88 (m ; H_7, H_8, H_{14} et H_{15} ; 12H) ; 1.17-1.25 (m ; H_5 ; 2H) ; 1.23 (d, *J* = 7.3 Hz ; H_{19} ; 3H) ; 1.29 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 1.49-1.55 (m ; H_6 ; 1H) ; 1.93-2.04 (m ; H_{13} ; 1H) ; 2.22 (dd, *J* = 13.9 Hz, 8.0 Hz ; H_2 ; 1H) ; 2.44 (dd, *J* = 13.9 Hz, 5.8 Hz ; H_2 ; 1H) ; 2.60 (sl ; H_{Me} ; 3H) ; 3.65-3.72 (m ; H_4 ; 1H) ; 3.88-3.96 (m ; H_3 ; 1H) ; 3.98-4.04 (m ; H_{12} ; 1H) ; 4.17-4.23 (m ; H_{18} ; 1H) ; 4.97 (s ; H_{Cbz} ; 2H) ; 6.70 (d, *J*=9.3 Hz ; H_{10} ; 1H) ; 7.12-7.35 (m ; H_{Ar} ; 5H) ; 7.64 (sl ; H_{21} ; 1H) ; 7.87 (d, *J* = 6.2 Hz ; H_{16} ; 1H) ; 8.04 (d, *J* = 6.4 Hz ; H_{20} ; 1H)

RMN C^{13} 63 MHz MeOD δ (ppm) : 18.2 (C_{19}) ; 18.8 (C_{14} or C_{15}) ; 19.9 (C_{14} or C_{15}) ; 22.5 (C_7 or C_8) ; 23.8 (C_7 or C_8) ; 26.1 (C_6) ; 26.5 (C_{Me}) ; 28.9 (C_{tBu}) ; 31.9 (C_{13}) ; 40.5 (C_2) ; 42.6 (C_5) ; 50.6 (C_{18}) ; 53.4 (C_3) ; 53.9 (C_4) ; 60.9 (C_{12}) ; 67.7 (C_{Cbz}) ; 80.4 ($C_{q\ tBu}$) ; 128.9 (C_{Ar}) ; 129.1 (C_{Ar}) ; 129.6 (C_{Ar}) ; 138.5 ($C_{q\ Ar}$) ; 157.9 (CO_{Boc}) ; 159.1 (CO_{Cbz}) ; 173.6 (C_1) ; 174.0 (C_{11}) ; 175.4 (C_{17})

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 592.3710 found $M+H^+$ = 592.3678 $M+Na^+$ = 614.3490

Peptide 233 **: Boc-D-Ala-D-Leu-β/γ-Leu-D-Val-D-Ala-NHMe**



Mr = 741.50 g/mol

$C_{36}H_{67}N_7O_9$

To the peptide **235** (44 mg; 0.07 mmol) in methanol (1.17 mL) 10% Pd/C (9 mg; 0.22 mmol) was added. The mixture was stirred for 30 min at room temperature under hydrogen atmosphere then filtered on celite and concentrated under reduced pressure.

The resulting product (34 mg; 0.07 mmol) in dimethylformamide (0,5 mL) was added to Boc-D-Ala-D-Leu-OH (23 mg; 0,075) activated in advance with HATU (26 mg; 0.07 mmol) and *N*,*N*-Diisopropylethylamine (DIPEA) (24 µL ; 0.14 mmol) in dimethylformamide (0,5 mL) at room temperature under argon atmosphere for 15 min. The mixture was stirred for 12 h at room temperature. The solution was diluted with ethyl acetate, treated with a 10% citric acid aqueous solution and washed with saturated solutions of sodium bicarbonate and sodium chloride. The organic layer was dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was precipitated with diethyl ether to give the white solid in 68% yield (36 mg).

RMN H^1 360 MHz MeOD δ (ppm) : 0.86-1.00 (m ; H_7, H_8, H_{14}, H_{15}, H_{21} et H_{22} ; 18H) ; 1.29-1.51 (m ; H_5 ; 2H) ;1.31 (d, *J* = 7.1 Hz ; H_{26} ; 3H) ; 1.34 (d, *J* = 7.1 Hz ; H_{26} ; 3H) ; 1.44 (s ; H_{tBu} ; 18H) ; 1.52-1.70 (m ; H_{19} ; 2H) ; 1.54-1.77 (m ; H_6 and H_{20} ; 2H) ; 2.04-2.13 (m ; H_{13} ; 1H) ; 2.27 (dd, *J* = 14.2 Hz, 7.3 Hz ; H_2 ; 1H) ; 2.49 (dd, *J* = 14.2 Hz, 5.9 Hz ; H_2 ; 1H) ; 2.73 (d, *J* = 4.5 Hz ; H_{Me} ; 3H) ; 4.00-4.16 (m ; H_3, H_4, H_{12} and H_{25} ; 4H) ; 4.26-4.35 (m ; H_{18} and H_{30} ; 2H) ; 4.82 (s ; H_{Cbz} ; 2H) ; 6.33 (d, *J* = 8.8 Hz ; H_9 ; 1H) ; 7.44 (sl ; H_{10} ; 1H (partially exchanged)) ; 7.75 (sl ; H_{27} ; 1H) ; 7.76 (sl ; H_{28} ; 1H) ; 7.99 (sl ; H_{16} ; 1H) ; 8.03 (sl ; H_{23} ; 1H) ; 8.11 (sl ; H_{32} ; 1H)

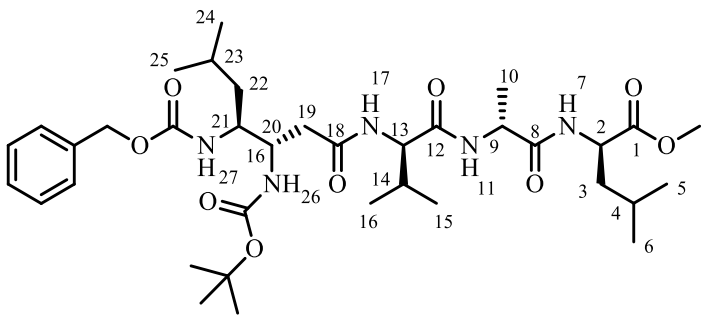
RMN C^{13} 90 MHz MeOD δ (ppm) : 18.2 (C_{31}) ; 18.3 (C_{26}) ; 18.9 (C_{14} or C_{15}) ; 19.9 (C_{14} or C_{15}) ; 22.2 (C_{21} or C_{22}) ; 22.4 (C_7 or C_8) ; 23.4 (C_{21} or C_{22}) ; 23.7 (C_7 or C_8) ; 25.9 (C_6) ; 26.0 (C_{Me}) ; 26.5 (C_{20}) ;

28.9 (C_{tBu}) ; 28.9 (C_{tBu}) ; 31.9 (C_{13}) ; 42.0 (C_2) ; 42.3 (C_5 and C_{19}) ; 50.5 (C_{30}) ; 51.7 (C_{25}) ; 52.0 (C_{18}); 54.0 (C_3 and C_4) ; 61.0 (C_{12}) ; 80.4 ($C_{q\ Boc}$) ; 80.9 ($C_{q\ Boc}$) ; 157.6 (CO_{Boc}) ; 157.9 (CO_{Boc}) ; 173.5 (C_{24}) ; 174.0 (C_{17}) ; 175.0 (C_1) ; 175.4 (C_{11}) ; 175.5 (C_{29})

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 742.5079 found $M+H^+$ = 742.5050 $M+Na^+$ = 764.4868

Synthesis of Boc-D-Val-D-Ala-D-Leu-β,γ-Leu-D-Val-D-Ala-D-Leu-OMe 241

***Peptide 239*: Cbz-β/γ-Leu-D-Val-D-Ala-D-Leu-OMe 239**



Mr = 705.43 g/mol

$C_{36}H_{59}N_5O_9$

The TFA.H_3N-D-Val-D-Ala-D-Leu-OMe (43 mg; 0.14 mmol) in dimethylformamide (1.0 mL) was added to **84c** (51 mg; 0.1) activated in advance with HATU (57 mg; 0.15 mmol) and *N*,*N*-Diisopropylethylamine (DIPEA) (4 µL ; 0.25 mmol) in dimethylformamide (0.6 mL) at room temperature under argon atmosphere for 15 min. The mixture was stirred for 12 h at room temperature. The solution was diluted with ethyl acetate, treated with a 10% citric acid aqueous solution and washed with saturated solutions of sodium bicarbonate and sodium chloride. The organic layer was dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was precipitated with diethyl ether to give the white solid in 57% yield (50 mg).

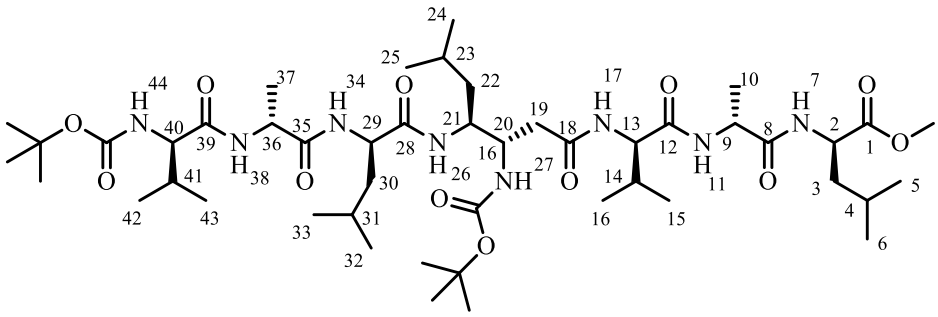
RMN H^1 360 MHz MeOD δ (ppm) : 0.87-0.98 (m ; H_5, H_6, H_{15}, H_{16}, H_{24} and H_{25} ; 18H) ; 1.24-1.31 (m ; H_{22} ; 2H) ; 1.35 (d, *J* = 6.9 Hz ; H_{10} ; 3H) ; 1.40 (s ; tBu ; 9H) ; 1.58-1.65 (m ; H_3 ; 2H) ; 1.68-1.75 (m ; H_4 and H_{23} ; 2H) ; 2.02-2.10 (m ; H_{14} ; 1H) ; 2.31 (dd, *J*= 14.2 Hz, 7.8 Hz ; H_{19} ; 1H) ; 2.53 (dd, *J*= 14.2 Hz, 6.2 Hz ; H_{19} ; 1H) ; 3.69 (s ; Me ; 3H) ; 3.76-3.82 (m ; H_{21} ; 1H) ; 3.98-4.05 (m ; H_{20} ; 1H) ; 4.18 (d, *J* = 6.4 Hz ; H_{13} ; 1H) ; 4.32-4.39 (m ; H_9 ; 1H) ; 4.44 (dd, *J* = 9.1 Hz, 6.0 Hz ; H_2 ; 1H) ; 5.08 (s ; H_{Cbz} ; 2H) ; 7.27-7.37 (m ; H_{Ar} ; 5H)

RMN C^{13} 63 MHz MeOD δ (ppm) : 18.1 (C_{10}) ; 18.8 (C_{15} or C_{16}) ; 20.0 (C_{15} or C_{16}) ; 22.0 (C_5 or C_6) ; 22.5 (C_5 or C_6) ; 23.5 (C_{24} or C_{25}) ; 23.8 (C_{24} or C_{25}) ; 26.0 (C_4) ; 26.1 (C_{23}) ; 28.9 (C_{tBu}) ; 32.3 (C_{14}) ;

40.5 (C_{19}) ; 41.6 (C_3) ; 42.6 (C_{22}) ; 50.4 (C_9) ; 52.3 (C_2) ; 52.8 (C_{Me}) ; 53.4 (C_{21}) ; 53.9 (C_{20}) ; 60.3 (C_{13}) ; 67.7 (C_{Cbz}) ; 80.3 ($C_{q\ tBu}$) ; 128.9 (C_{Ar}) ; 129.1 (C_{Ar}) ; 129.6 (C_{Ar}) ; 138.6 ($C_{q\ Ar}$) ; 157.9 (CO_{Boc}) ; 159.2 (CO_{Cbz}) ; 173.5 (C_{18} and C_8) ; 174.6 (C_{12}) ; 174.9 (C_1)

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 706.4391 found $M+H^+$ = 706.4386 $M+Na^+$ = 728.4201

***Peptide 241*: Boc-D-Val-D-Ala-D-Leu-β,γ-Leu-D-Val-D-Ala-D-Leu-OMe 241**



Mr = 954.64 g/mol

$C_{47}H_{86}N_8O_{12}$

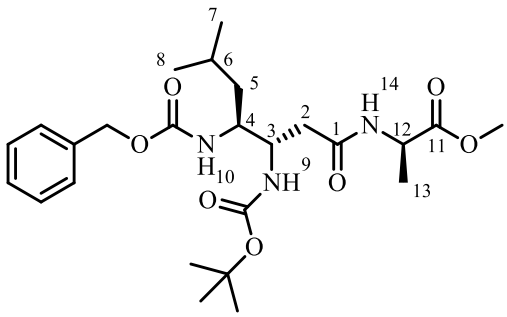
To the peptide **239** (30 mg; 0.04 mmol) in methanol (0,4 mL) 10% Pd/C (5 mg; 0.13 mmol) was added. The mixture was stirred for 30 min at room temperature under the hydrogen atmosphere then filtered on celite and concentrated under reduced pressure.

The resulting product (20 mg; 0.03 mmol) in dimethylformamide (0,4 mL) was added to Boc-D-Val-D-Ala-D-Leu-OH (11 mg; 0,03) activated in advance with HATU (11 mg; 0.03 mmol) and *N*,*N*-Diisopropylethylamine (DIPEA) (5 μL ; 0.03 mmol) in dimethylformamide (0,2 mL) at room temperature under the argon atmosphere for 15 min. The mixture was stirred for 12 h at room temperature. Solution was diluted with ethyl acetate treated with 10% citric acid aqueous solution and washed with saturated solutions of sodium bicarbonate and sodium chloride. The organic layer was dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was precipitated with diethyl ether to give a white solid in 39% yield (16 mg). Currently the peptide 241 is under purification by HPLC.

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 955.6433 found $M+H^+$ = 955.6413 $M+Na^+$ = 977.6237

Synthesis of Boc-D-Ala-D-Leu-β,γ-Leu-D-Ala-D-Leu-β,γ-Leu-D-Val-OMe 243

***Peptide 269* : Cbz-β,γ-Leu-D-Ala-OMe**



Mr = 493.28 g/mol

$C_{25}H_{39}N_3O_7$

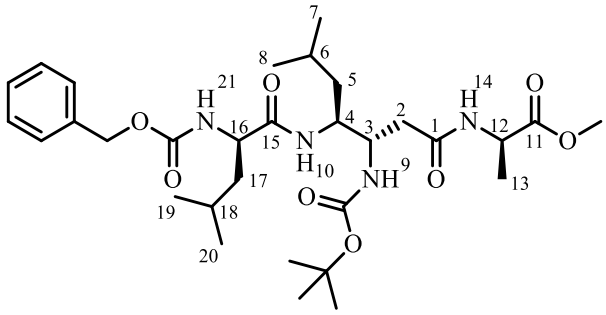
The HCl · H_2N-D-Ala-OMe (37 mg; 0.27 mmol) in dimethylformamide (2.0 mL) was added to **84c** (100 mg; 0.20 mmol) activated in advance with HATU (93 mg; 0.24 mmol) and *N*,*N*-Diisopropylethylamine (DIPEA) (85 µL ; 0.49 mmol) in dimethylformamide (1.2 mL) at room temperature under argon atmosphere for 15 min. The mixture was stirred for 12 h at room temperature. The solution was diluted with ethyl acetate, treated with a 10% citric acid aqueous solution and washed with saturated solutions of sodium bicarbonate and sodium chloride. The organic layer was dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography with cyclohexane/ethyl acetate (1/1) to give a white solid in 59% yield (71 mg).

RMN H^1 360 MHz MeOD δ (ppm) : 0.89 (d, *J* = 6.7 Hz ; H_7 or H_8 ; 3H) ; 0.92 (d, *J* = 6.7 Hz ; H_7 or H_8 ; 3H) ; 1.28-1.32 (m ; H_5 ; 2H) ; 1.74 (d, *J* = 7.4 Hz ; H_{13} ; 3H) ; 1.41 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 1.60-1.69 (m ; H_6 ; 1H) ; 2.31 (dd, *J* = 14.2 Hz, 8.4 Hz ; H_2 ; 1H) ; 2,47 (dd, *J* = 14.2 Hz, 6.0 Hz ; H_2 ; 1H) ; 3.69 (s ; H_{Me} ; 3H) ; 3.81 (m, *J* = 4.8 Hz ; H_4 ; 1H) ; 4.01-4.06 (m ; H_3 ; 1H) ; 4.33-4.41 (m ; H_{12} ; 1H) ; 5.06 (d, *J*=12.7 Hz ; H_{Cbz} ; 1H) ; 5.06 (d, *J*=12.7 Hz ; H_{Cbz} ; 1H) ; 6.23 (d, *J*=9.4 Hz ; H_9 ; 1H) ; 6.72 (d, *J* = 9.5 Hz ; H_{10} ; 1H) ; 7.28-7.38 (m ; H_{Ar} ; 5H) ; 8.17 (d, *J* = 6.8 Hz ; H_{14} ; 1H)

RMN C^{13} 90 MHz MeOD δ (ppm) : 17.7 (C_{13}) ; 22.5 (C_7 or C_8) ; 23.7 (C_7 or C_8) ; 24.9 (C_6) ; 28.8 (C_{tBu}) ; 40.1 (C_2) ; 42.7 (C_5) ; 49.6 (C_{12}) ; 52.9 (C_{Me}) ; 53.4 (C_3) ; 53.9 (C_4) ; 67.7 (C_{Cbz}) ; 80.3 ($C_{q\ tBu}$) ; 128.9 (C_{Ar}) ; 129.1 (C_{Ar}) ; 129.6 (C_{Ar}) ; 138.5 ($C_{q\ Ar}$) ; 158.0 (CO_{Boc}) ; 159.1 (CO_{Cbz}) ; 172.9 (C_1) ; 174.8 (C_{11})

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 494.2866 found $M+H^+$ = 494.2847 $M+Na^+$ = 516.2684

***Peptide 270* : Cbz-D-Leu-β,γ-Leu-D-Ala-OMe**



Mr = 606.36 g/mol

$C_{31}H_{50}N_4O_8$

To the peptide **269** (60 mg; 0.12 mmol) in methanol (0.8 mL) 10% Pd/C (34 mg; 0.18 mmol) was added. The mixture was stirred for 30 min at room temperature under hydrogen atmosphere then filtered on celite and concentrated under reduced pressure.

The resulting product (45 mg; 0.1 mmol) in dimethylformamide (1,6 mL) was added to Cbz-D-Leu-OH (37 mg; 0,14 mmol) activated in advance with HATU (48 mg; 0.13 mmol) and *N*,*N*-Diisopropylethylamine (DIPEA) (44 µL ; 0.25 mmol) in dimethylformamide (0,6 mL) at room temperature under argon atmosphere for 15 min. The mixture was stirred for 12 h at room temperature. The solution was diluted with ethyl acetate, treated with a 10% citric acid aqueous solution and washed with saturated solutions of sodium bicarbonate and sodium chloride. The organic layer was dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography with cyclohexane/ethyl acetate (1/1) to give a white solid in 72% yield (53 mg).

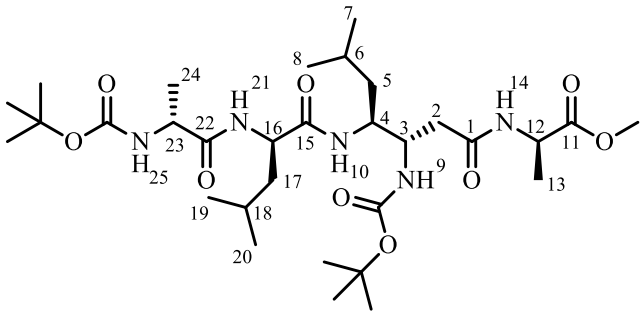
RMN H^1 360 MHz MeOD δ (ppm) : 0.86-0.97 (m ; H_7, H_8, H_{19} and H_{20} ; 12H) ; 1.27-1.39 (m ; H_5 ; 2H) ; 1.35 (d, *J* = 7.3 Hz ; H_{13} ; 3H) ; 1.43 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 1.42-1.54 (m ; H_{17} ; 2H) ; 1.56-1.62 (m ; H_6 ; 1H) ; 1.63-1.70 (m ; H_{18} ; 1H) ; 2.23 (dd, *J* = 14.1 Hz, 7.6 Hz ; H_2 ; 1H) ; 2.42 (dd, *J* = 14.1 Hz, 6.4 Hz ; H_2 ; 1H) ; 3.70 (s ; H_{Me} ; 3H) ; 4.02-4.12 (m ; H_3, H_4 and H_{16} ; 3H) ; 4.33-4.39 (m ; H_{12} ; 1H) ; 5.09 (d, *J* = 12.7 Hz ; H_{Cbz} ; 1H) ; 5.13 (d, *J* = 12.7 Hz ; H_{Cbz} ; 1H) ; 6.31 (d, *J* = 9.6 Hz ; H_9 ; 1H) ; 7.21 (d, *J* = 7.0 Hz ; H_{21} ; 1H) ; 7.28-7.37 (m ; H_{Ar} ; 5H) ; 7.75 (d, *J* = 8.9 Hz ; H_{10} ; 1H) ; 8.01 (d, *J* = 6.9 Hz ; H_{14} ; 1H)

RMN C^{13} 63 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 17.8 (C_{13}) ; 22.2 (C_7 or C_8) ; 22.4 (C_7 or C_8) ; 23.5 (C_{19} or C_{20}) ; 23.7 (C_{19} or C_{20}) ; 26.0 (C_6 or C_{18}) ; 26.1 (C_6 or C_{18}) ; 28.9 (C_{tBu}) ; 40.6 (C_2) ; 42.3 (C_5 or C_{17}) ; 42.5 (C_5 or C_{17}) ; 49.3 (C_{12}) ; 51.7 (C_4) ; 52.9 (C_{Me}) ; 53.2 (C_3) ; 55.6 (C_{16}) ; 67.9 (C_{Cbz}) ; 80.4 ($C_{q\ tBu}$) ; 128.9

(C_{Ar}) ; 129.2 (C_{Ar}) ; 129.6 (C_{Ar}) ; 138.3 ($C_{q\ Ar}$) ; 157.9 (CO_{Boc}) ; 158.7 (CO_{Cbz}) ; 172.8 (C_1) ; 174.8 (C_{15}) ; 175.8 (C_{11})

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 607.3707 found $M+H^+$ = 607.3677 $M+Na^+$ = 629.3497

Peptide 271 **: Cbz-D-Ala-D-Leu-β,γ-Leu-D-Ala-OMe**



Mr = 643.42 g/mol

$C_{31}H_{57}N_5O_9$

To the peptide **270** (37 mg; 0.06 mmol) in methanol (0.5 mL) 10% Pd/C (21 mg; 0.09 mmol) was added. The mixture was stirred for 30 min at room temperature under hydrogen atmosphere then filtered on celite and concentrated under reduced pressure.

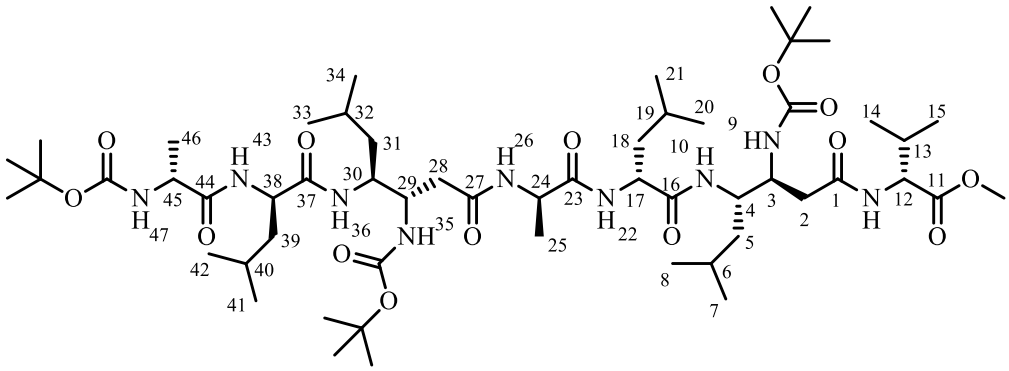
The resulting product (27 mg; 0.1 mmol) in dimethylformamide (0.5 mL) was added to Boc-D-Ala-OH (12 mg; 0.06 mmol) activated in advance with HATU (24 mg; 0.06 mmol) and *N*,*N*-Diisopropylethylamine (DIPEA) (20 μL ; 0.12 mmol) in dimethylformamide (0.6 mL) at room temperature under argon atmosphere for 15 min. The mixture was stirred for 12 h at room temperature. The solution was diluted with ethyl acetate, treated with a 10% citric acid aqueous solution and washed with saturated solutions of sodium bicarbonate and sodium chloride. The organic layer was dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was precipitated with diethyl ether to give a white solid in 65% yield (26 mg).

RMN H^1 360 MHz MeOD δ (ppm) : 0.87-0.98 (m ; H_7, H_8, H_{19} and H_{20} ; 12H) ; 1.27-1.36 (m ; H_5 ; 2H) ; 1.31 (d, *J* = 7.1 Hz ; H_{13} ; 3H) ; 1.36 (d, *J* = 7.1 Hz ; H_{24} ; 3H) ; 1.44 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 1.45 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 1.52-1.62 (m ; H_{18} ; 1H) ; 1.54-1.68 (m ; H_{17} ; 2H) ; 1.65-1.75 (m ; H_6 ; 1H) ; 2.23 (dd, *J* = 14.1 Hz, 8.1 Hz ; H_2 ; 1H) ; 2.40 (dd, *J* = 14.1 Hz, 6.2 Hz ; H_2 ; 1H) ; 3.70 (s ; H_{Me} ; 3H) ; 4.02-4.08 (m ; H_3 and H_4 ; 2H) ; 4.01-4.11 (m ; H_{23} ; 1H) ; 4,28 (dd, *J* = 9.3 Hz, 5.7 Hz ; H_{16} ; 1H) ; 4.32-4.39 (m ; H_{12} ; 1H) ; 6.27 (d, *J* = 10.0 Hz ; H_9 ; 1H) ; 7.75 (sl ; H_{10} ; 1H) ; $H_{14,}$ H_{21} and H_{25} has exchanged with D.

RMN C^{13} 63 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 17.9 (C_{13}) ; 18.3 (C_{24}) ; 22.3 (C_7 or C_8) ; 22.4 (C_7 or C_8) ; 23.5 (C_{19} or C_{20}) ; 23.7 (C_{19} or C_{20}) ; 26.0 (C_6 and C_{18}) ; 28.9 ($2C_{tBu}$) ; 40.6 (C_2) ; 42.0 (C_5 or C_{17}) ; 42.4 (C_5 or C_{17}) ; 49.9 (C_{12}) ; 51.7 (C_4) ; 51.9 (C_{23}) ; 52.9 (C_{Me}) ; 53.3 (C_3) ; 54.0 (C_{16}) ; 80.4 ($C_{q\ tBu}$) ; 80.9 ($C_{q\ tBu}$) ; 157.9 ($2CO_{Boc}$) ; 172.9 (C_1) ; 174.7 (C_{15}) ; 174.9 (C_{22}) ; 176.2 (C_{11})

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 644.4235 found $M+H^+$ = 644.4220 $M+Na^+$ = 666.4055

Peptide 243 **: Boc-D-Ala-D-Leu-β/γ-Leu-D-Ala-D-Leu-β/γ-Leu-D-Val-OMe**



Mr = 1111.75 g/mol

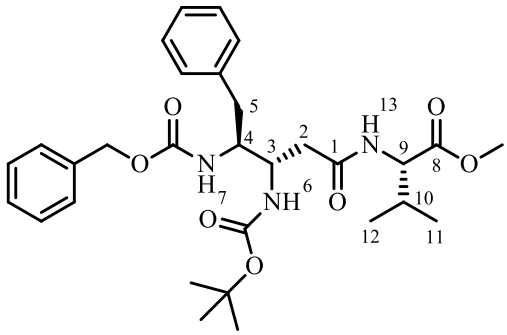
$C_{55}H_{101}N_9O_{14}$

To the peptide **270** (41 mg; 0.06 mmol) in methanol (0.6 mL) 10% Pd/C (23 mg; 0.1 mmol) was added. The mixture was stirred for 30 min at room temperature under hydrogen atmosphere then filtered on celite and concentrated under reduced pressure to give 35 mg of crude product.

The resulting product (18 mg; 0.03 mmol) in dimethylformamide (0.2 mL) was added to peptide **271** (21 mg; 0.04) saponified with 4 N sodium hydroxide (36 µL; 0.33 mmol) in methanol (0.33 mL) and activated in advance with HATU (14 mg; 0.04 mmol) and *N*,*N*-Diisopropylethylamine (DIPEA) (12 µL ; 0.07 mmol) in dimethylformamide (0,2 mL) at room temperature under argon atmosphere for 15 min. The mixture was stirred for 12 h at room temperature. The solution was diluted with ethyl acetate, treated with a 10% citric acid aqueous solution and washed with saturated solutions of sodium bicarbonate and sodium chloride. The organic layer was dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was precipitated with diethyl ether to give the white solid. Currently the peptide **243** under purification.

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 1112.7546 found $M+H^+$ = 1112.7470 $M+Na^+$ = 1134.7322

***Peptide 272* : Cbz-β,γ-Phe-L-Val-OMe**



Mr = 555.29 g/mol

$C_{30}H_{41}N_3O_7$

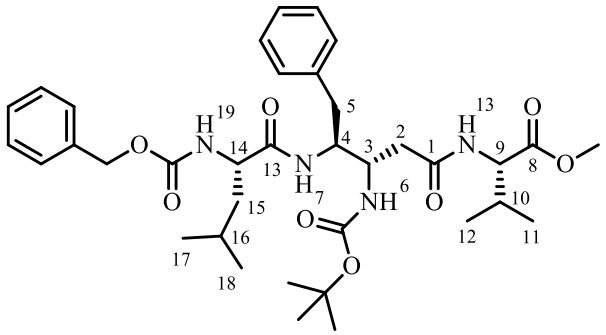
The solution of HATU (86 mg; 0.23 mmol), L-valine methyl ester (42 mg; 0.25 mmol) and **84d** (100 mg; 0.23 mmol) in dimethylformamide (2.3 mL) and *N*,*N*-Diisopropylethylamine (DIPEA) (83 µL; 0.48 mmol) was placed in the microwave. The resulting mixture was irradiated at 30-40 W for 15 min at 100°C. The solution was diluted with ethyl acetate, treated with the 10% citric acid aqueous solution and washed with saturated solutions of sodium bicarbonate and sodium chloride. The organic phase was dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under the reduced pressure. The crude product was precipitated with diethyl ether to give the white solid in 66% yield (83 mg).

RMN H^1 360 MHz CD_3CN δ (ppm) : 0.91 (d, *J* = 6.7 Hz ; H_{11} or H_{12} ; 3H) ; 0.92 (d, *J* = 6.7 Hz ; H_{11} or H_{12} ; 3H) ; 1.41 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 2.06-2.10 (m ; H_{10} ; 1H) ; 2.36-2.47 (m ; H_2 ; 2H) ; 2.66 (dd, *J* = 14.0 Hz, 9.9 Hz ; H_5 ; 1H) ; 2.89 (dd, *J* = 14.0 Hz, 3.9 Hz ; H_5 ; 1H) ; 3.67 (s ; H_{Me} ; 3H) ; 3.95-4.09 (m ; H_3 and H_4 ; 2H) ; 4.32 (dd, *J* = 8.4 Hz, 5.6 Hz ; H_9 ; 1H) ; 4.35 (d, *J* = 13.0 Hz ; H_{Cbz} ; 1H) ; 4.38 (d, *J* = 13.0 Hz ; H_{Cbz} ; 1H) ; 5.59 (d, *J* = 8.5 Hz ; H_6 ; 1H) ; 5.80 (d, *J* = 8.6 Hz ; H_7 ; 1H) ; 7.02 (d, *J* = 7.9 Hz ; H_{13} ; 1H) ; 7.17-7.36 (m ; H_{Ar} ; 10H)

RMN C^{13} 75 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 18.5 (C_{11} or C_{12}) ; 19.6 (C_{11} or C_{12}) ; 28.8 (C_{tBu}) ; 31.5 (C_{10}) ; 38.9 (C_5) ; 40.0 (C_2) ; 52.6 (C_{Me}) ; 53.0 (C_4) ; 57.2 (C_3) ; 58.8 (C_9) ; 66.9 (C_{Cbz}) ; 79.7 ($C_{q\ tBu}$) ; 127.3 (C_{Ar}) ; 128.4 (C_{Ar}) ; 128.8 (C_{Ar}) ; 129.3 (C_{Ar}) ; 129.5 (C_{Ar}) ; 130.1 (C_{Ar}) ; 138.4 ($C_{q\ Ar}$) ; 139.8 ($C_{q\ Ar}$) ; 156.28 (CO_{Boc}) ; 157.8 (CO_{Cbz}) ; 171.6 (C_1) ; 173.3 (C_8)

HRMS (ESI+): calculated = 556.3023 found $M+H^+$ = 556.3000 $M+Na^+$ = 578.2813

***Peptide 273* : Cbz-L-Leu-β,γ-Phe-L-Val-OMe**



Mr = 668.38 g/mol

$C_{36}H_{52}N_4O_8$

To the peptide **272** (36 mg; 0.06 mmol) in methanol (1.0 mL) 10% Pd/C (8 mg; 0.19 mmol) was added. The mixture was stirred for 30 min at room temperature under hydrogen atmosphere then filtered on celite and concentrated under reduced pressure.

To the solution of resulting product (27 mg; 0.06 mmol), hydroxybenzotriazole (10 mg; 0.08 mmol), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDCI) (15 mg; 0.08 mmol), and Cbz-L-leucine (20 mg; 0.08 mmol) in dimethylformamide (0.8 mL) was added *N*,*N*-Diisopropylethylamine (DIPEA) (30 µL; 0.2 mmol). The resulting mixture was stirred for 12 h at room temperature. The solution was diluted with ethyl acetate, treated with a 10% citric acid aqueous solution and washed with saturated solutions of sodium bicarbonate and sodium chloride. The organic layer was dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was washed with a diethyl ether and petroleum ether to give the white solid in 71 % yield (31 mg).

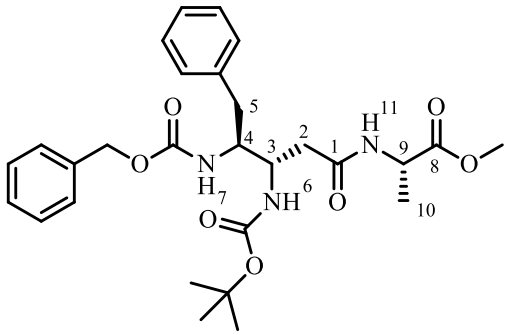
RMN H^1 250 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 0.72 (d, *J* = 5.0 Hz ; H_{17} or H_{18} ; 3H) ; 0.75 (d, *J* = 5.0 Hz ; H_{17} or H_{18} ; 3H) ; 0.87 (d, *J* = 6.9 Hz ; H_{11} or H_{12} ; 3H) ; 0.92 (d, *J*=6.7 Hz ; H_{11} or H_{12} ; 3H) ; 1.29-1.37 (m ; H_{15} ; 2H) ; 1.45 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 2.08 (dd, *J* = 13.7 Hz, 11.0 Hz ; H_2 ; 1H) ; 2.16-2.22 (m ; H_{10} ; 1H) ; 2.53 (dd, *J* = 13.7 Hz, 5.9 Hz ; H_2 ; 1H) ; 2.79 (dd, *J* = 14.0 Hz, 4.7 Hz ; H_5 ; 1H) ; 3.17 (dd, *J* = 14.0 Hz, 11.1 Hz ; H_5 ; 1H) ; 3.56-3.66 (m ; H_3 ; 1H) ; 3.65 (s ; H_{Me} ; 3H) ; 3.84 (q, *J* = 7.1 Hz ; H_4 ; 1H) ; 4.30-4.38 (m ; H_{14} ; 1H) ; 4.43 (dd, *J* = 8.4 Hz, 5.4 Hz ; H_9 ; 1H) ; 5.08 (s ; H_{Cbz} and H_{19} ; 3H) ; 6.55 (d, *J* = 9.9 Hz ; H_6 ; 1H) ; 7.10-7.33 (m ; H_{Ar} ; 10H) ; 7.49 (d, *J* = 7.4 Hz ; H_7 ; 1H) ; 7.64 (d, *J* = 8.4 Hz ; H_{13} ; 1H) ;

RMN C^{13} 63 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 18.1 (C_{11} or C_{12}) ; 19.5 (C_{11} or C_{12}) ; 22.2 (C_{17} or C_{18}) ; 22.5 (C_{17} or C_{18}) ; 24.7 (C_{16}) ; 28.8 (C_{tBu}) ; 29.9 (C_{10}) ; 35.2 (C_5) ; 39.8 (C_2) ; 40.9 (C_{15}) ; 51.4 (C_3) ; 52.5 (C_{Me}) ; 54.6 (C_{14}) ; 55.3 (C_4) ; 57.9 (C_9) ; 67.6 (C_{Cbz}) ; 79.2 ($C_{q\ tBu}$) ; 126.5 (C_{Ar}) ; 128.0 (C_{Ar}) ; 128.5 (C_{Ar}) ;

128.8 (C_{Ar}) ; 129.3 (C_{Ar}) ; 136.4 ($C_{q\ Ar}$) ; 138.9 ($C_{q\ Ar}$) ; 155.9 (CO_{Boc}) ; 157.0 (CO_{Cbz}) ; 171.8 (C_{13}) ; 174.4 (C_1) ; 175.0 (C_8)

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 669.3785 found $M+H^+$ = 669.3864 $M+Na^+$ = 691.3685

***Peptide 274* : Cbz-β,γ-Phe-L-Ala-OMe**



Mr = 527.26 g/mol

$C_{28}H_{37}N_3O_7$

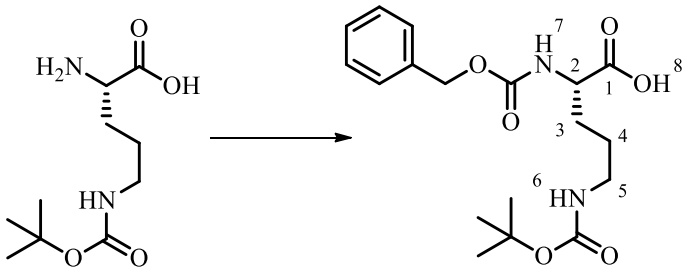
To the solution of hydroxybenzotriazole (12 mg; 0.09 mmol), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDCI) (17 mg; 0.09 mmol), L-alanine methyl ester hydrochloride (15 mg; 0.1 mmol) and **84d** (40 mg; 0.09 mmol) in dimethylformamide (1.2 mL) was added *N*,*N*-Diisopropylethylamine (DIPEA) (24 µL; 0.14 mmol). The resulting mixture was stirred for 12 h at room temperature. The solution was diluted with ethyl acetate, treated with 10% citric acid aqueous solution and washed with saturated solutions of sodium bicarbonate and sodium chloride. The organic layer was dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was precipitated in diethyl ether to give white solid in 85 % yield (41 mg).

RMN H^1 250 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 1.34 (d, *J* = 7.0 Hz ; H_{10} ; 3H) ; 1.41 (s ; H_{tBu} ; 9H) ; 2.36-2.51 (m ; H_2 ; 2H) ; 2.78 (dd, *J* = 14.5 Hz, 8.5 Hz ; H_5 ; 1H) ; 2.89 (dd, *J* = 14.5 Hz, 6.0 Hz ; H_5 ; 1H) ; 3.70 (s ; H_{Me} ; 3H) ; 3.91-4.09 (m ; H_3 and H_4 ; 2H) ; 4.32 (dd, *J*=8.0 Hz, 7.0 Hz ; H_9 ; 1H) ; 4.93-5.06 (m ; H_{Cbz} ; 2H) ; 5.42 (d, *J* = 7.6 Hz ; H_6 ; 1H) ; 5.63 (d, *J* = 7.9 Hz ; H_7 ; 1H) ; 6.51 (d, *J* = 5.8 Hz ; H_{11} ; 1H) ; 7.17-7.31 (m ; H_{Ar} ; 10H)

RMN C^{13} 90 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 18.1 (C_{10}) ; 28.6 (C_{tBu}) ; 39.1 (C_5) ; 39.1 (C_2) ; 48.3 (C_{Me}) ; 51.4 (C_4) ; 52.6 (C_9) ; 56.3 (C_3) ; 66.9 (C_{Cbz}) ; 80.0 ($C_{q\ tBu}$) ; 126.8 (C_{Ar}) ; 128.1 (C_{Ar}) ; 128.2 (C_{Ar}) ; 128.7 (C_{Ar}) ; 129.4 (C_{Ar}) ; 136.7 ($C_{q\ Ar}$) ; 137.9 ($C_{q\ Ar}$) ; 156.4 (CO_{Boc}) ; 156.9 (CO_{Cbz}) ; 170.4 (C_1) ; 173.5 (C_8)

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 528.2710 found $M+H^+$ = 528.2686 $M+Na^+$ = 550.2507

Protection of ornithine 275



Mr = 366.18 g/mol

$C_{18}H_{26}N_2O_6$

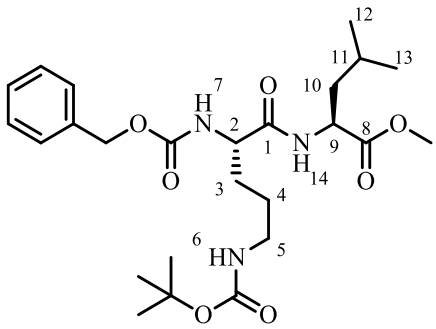
The protected ornithine (0.2 g; 0.8 mmol) was dissolved in 5% sodium bicarbonate aqueous solution (27 mL). The benzyl chloroformate (140 µL; 1.0 mmol) was added and the reaction mixture was stirred one night at the room temperature. Then it was washed with diethyl ether, the aqueous layer was acidified with 2N hydrochloric acid to pH = 1 and extracted with a diethyl ether. The organic layer was dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give a colorless oil in 91% yield (287 mg).

RMN H^1 360 MHz MeOD δ (ppm) : 1.43 (s ; tBu ; 9H) ; 1.50-1.60 (m ; H_4 ; 2H) ; 1.63-1.73 (m ; H_3 ; 1H) ; 1.81-1.92 (m ; H_3 ; 1H) ; 3.05 (t, *J* = 6.8 Hz ; H_5 ; 2H) ; 4.18 (dd, *J* = 8.7 Hz, 4.6 Hz ; H_2 ; 1H) ; 5.08 (s ; $CH_{2\ Cbz}$; 2H) ; 7.27-7.36 (m ; H_{ar} ; 5H)

RMN C^{13} 63 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 27.5 (C_4) ; 28.9 (C_{tBu}) ; 30.2 (C_3) ; 40.9 (C_5) ; 55.2 (C_2) ; 67.7 (C_{Cbz}) ; 80.0 ($C_{q\ tBu}$) ; 128.9 (C_{Ar}) ; 129.0 (C_{Ar}) ; 129.5 (C_{Ar}) ; 138.2 ($C_{q\ Ar}$) ; 158.5 (CO_{Boc}) ; 158.7 (CO_{Cbz}) ; 175.8 (C_1)

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 367.1869 found $M+H^+$ = 367.1853 $M+Na^+$ = 389.1676

***Peptide 276* : Cbz-L-Orn(Boc)-L-Leu-OMe**



Mr = 493.28 g/mol

$C_{25}H_{39}N_3O_7$

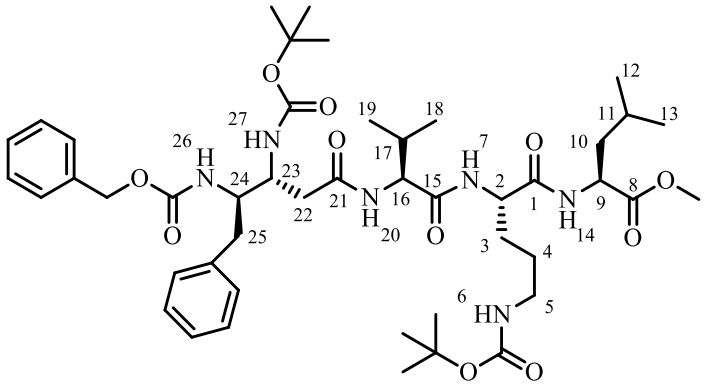
The L-leucine methylester hydrochloride (73 mg ; 0.4 mmol) in dimethylformamide (1.8 mL) was added to the aminoacid **275** (133 mg ; 0.36) activated in advance with HATU (138 mg ; 0.36 mmol) and *N*,*N*-Diisopropylethylamine (DIPEA) (130 µL ; 0.73 mmol) in dimethylformamide (3.0 mL) at room temperature under the argon atmosphere for 15 min. The mixture was stirred for 12 h at room temperature. The solution was diluted with ethyl acetate, treated with 10% citric acid aqueous solution and washed with saturated solutions of sodium bicarbonate and sodium chloride. The organic layer was dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography with ethyl acetate/cyclohexane (1:1) to give colorless oil in 78% yield (140 mg).

RMN H^1 360 MHz MeOD δ (ppm) : 0.90 (d, *J* = 6.4 Hz ; H_{12} or H_{13} ; 3H) ; 0.94 (d, *J* = 6.4 Hz ; H_{12} or H_{13} ; 3H) ; 1.43 (s ; tBu ; 9H) ; 1.51-1.71 (m ; H_3, H_4 and H_{10} ; 6H) ; 1.73-1.84 (m ; H_{11} ; 1H) ; 3.03-3.09 (m ; H_5 ; 2H) ; 3.69 (s ; H_{Me} ; 3H) ; 4.17 (dd, *J* = 8.1 Hz, 5.6 Hz ; H_2 ; 1H) ; 4.17 (q, *J* = 7.5 Hz ; H_9 ; 1H) ; 5.08 (s ; H_{Cbz} ; 2H) ; 7.26-7.35 (m ; H_{ar} ; 5H) ; 8.25 (d, *J* = 7.5 Hz ; H_{14} ; 1H)

RMN C^{13} 63 MHz $CDCl_3$ δ (ppm) : 22.0 (C_{12} or C_{13}) ; 23.5 (C_{12} or C_{13}) ; 26.0 (C_3) ; 27.4 (C_4) ; 28.9 (C_{tBu}) ; 30.8 (C_{10}) ; 40.9 (C_5) ; 41.5 (C_{11}) ; 52.3 (C_9) ; 52.8 (C_{Me}) ; 55.9 (C_2) ; 67.7 (C_{Cbz}) ; 80.0 ($C_{q\ tBu}$) ; 128.9 (C_{Ar}) ; 129.0 (C_{Ar}) ; 129.6 (C_{Ar}) ; 138.3 ($C_{q\ Ar}$) ; 158.4 (CO_{Boc}) ; 158.6 (CO_{Cbz}) ; 174.6 (C_1) ; 175.0 (C_8)

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 494.2866 found $M+H^+$ = 494.2845 $M+Na^+$ = 516.2665

***Peptide 259* : Cbz-β/γPhe-L-Val-L-Orn(Boc)-L-Leu-OMe**



Mr = 882.51 g/mol

$C_{46}H_{70}N_6O_{11}$

The H_2N-L-Val-L-Orn(Boc)-L-Leu-OMe (57 mg ; 0.12 mmol) in dimethylformamide (0.5 mL) was added to the aminoacid **255** (50 mg ; 0.11) saponified in advance with 4N sodium hydroxide and activated with HATU (43 mg ; 0.11 mmol) and *N*,*N*-Diisopropylethylamine (DIPEA) (40 µL ; 0.22 mmol) in dimethylformamide (1.0 mL) at room temperature under the argon atmosphere for 15 min. The mixture was stirred for 12 h at room temperature. The solution was diluted with ethyl acetate, treated with 10% aqueous solution of citric acid and washed with saturated solutions of sodium bicarbonate and sodium chloride. The organic layer was dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was precipitated with diethyl ether to give a white solid in quantitative yield (100 mg).

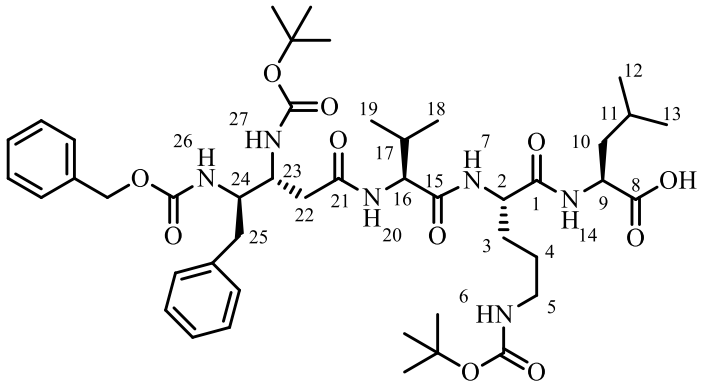
RMN H^1 250 MHz MeOD+$CDCl_3$ (1:1) δ (ppm) : 0.79-0.87 (m ; H_{12}, H_{13}, H_{18} and H_{19} ; 12H) ; 1.34 (s ; tBu ; 9H) ; 1.35 (s ; tBu ; 9H) ; 1.40-1.62 (m ; H_3, H_4 and H_{10} ; 6H) ; 1.68-1.79 (m ; H_{11} ; 1H) ; 1.90-2.02 (m ; H_{17} ; 1H) ; 2.31 (dd, *J* = 14.3 Hz, 7.3 Hz ; H_{22} ; 1H) ; 2.47 (dd, *J* = 14.3 Hz, 6.1 Hz ; H_{22} ; 1H) ; 2.58 (dd, *J* = 14.0 Hz, 9.6 Hz ; H_{25} ; 1H) ; 2.82 (dd, *J* = 14.0 Hz, 4.4 Hz ; H_{25} ; 1H) ; 2.92-3.03 (m ; H_5 ; 2H) ; 3.62 (s ; H_{Me} ; 3H) ; 3.84-3.95 (m ; H_{24} ; 1H) ; 3.98-4.12 (m ; H_{23} and H_{16} ; 2H) ; 4.28-4.42 (m ; H_9 and H_2 ; 2H) ; 4.85 (d, *J* = 11.4 Hz ; H_{Cbz} ; 2H) ; 4.87 (d, *J* = 11.4 Hz ; H_{Cbz} ; 1H) ; 7.04-7.25 (m ; H_{ar} ; 10H)

RMN C^{13} 63 MHz MeOD+$CDCl_3$ (1:1) δ (ppm): 18.7 (C_{18} or C_{19}) ; 19.7 (C_{18} or C_{19}) ; 21.9 (C_{12} or C_{13}) ; 23.3 (C_{12} or C_{13}) ; 25.5 (C_{11}) ; 26.6 (C_4) ; 28.9 (C_{tBu}) ; 29.9 (C_3) ; 31.6 (C_{17}) ; 39.3 (C_{25}) ; 40.2 (C_{22}) ; 40.4 (C_5) ; 41.1 (C_{10}) ; 51.7 (C_9) ; 52.3 (C_{23}) ; 52.7 (C_{Me}) ; 53.4 (C_2) ; 56.9 (C_{24}) ; 59.8 (C_{16}) ; 67.2 (C_{Cbz}) ; 79.8 ($C_{q\ tBu}$) ; 80.2 ($C_{q\ tBu}$) ; 127.1 (C_{Ar}) ; 128.2 (C_{Ar}) ; 128.6 (C_{Ar}) ; 129.0 (C_{Ar}) ; 129.1

(C_{Ar}) ; 129.9 (C_{Ar}) ; 137.6 ($C_{q\ Ar}$) ; 138.9 ($C_{q\ Cbz}$) ; 157.3 (CO_{Boc}) ; 157.9 (CO_{Boc}) ; 158.2 (CO_{Cbz}) ; 172.4 (C_{21}) ; 172.9 (C_1) ; 173.2 (C_{15}) ; 174.2 (C_8)

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 883.5181 found $M+H^+$ = 883.5167 $M+Na^+$ = 905.4981

Peptide 259a **:Cbz-β/γPhe-L-Val-L-Orn(Boc)-L-Leu-OH**

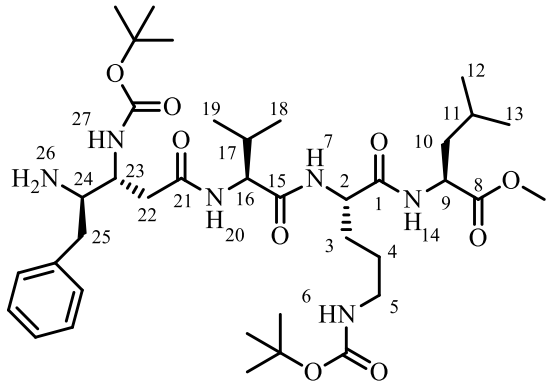


Mr = 869.49 g/mol

$C_{45}H_{68}N_6O_{11}$

To the tetrapeptide **259** (27 mg; 0.03) in methanol (0.3 mL) the 4N sodium hydroxide (0.25 mL) was added at room temperature under the argon atmosphere. The mixture was stirred for 2 h at room temperature. Then the mixture was acidified to the pH = 1 and extracted with dichloromethane. The organic layer was dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product **237** was used in the next step without any purification.

Peptide 259b **:H_2N-β/γPhe-L-Val-L-Orn(Boc)-L-Leu-OMe**

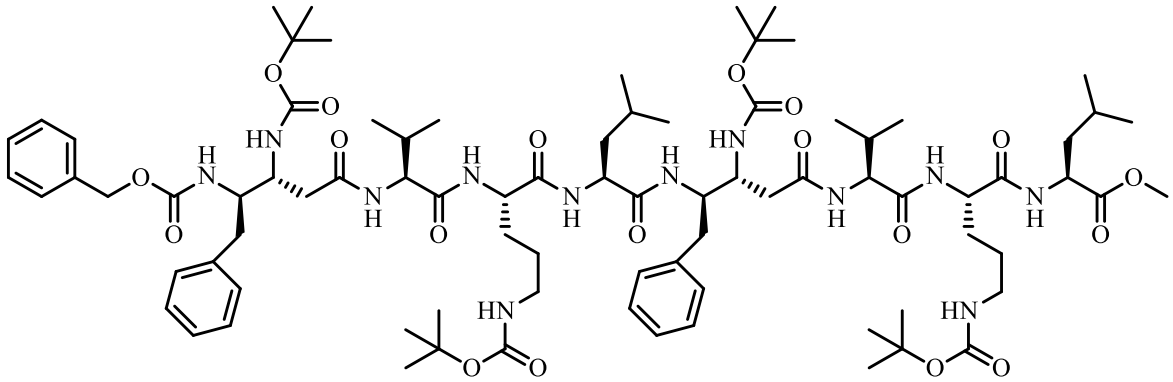


Mr = 748.47 g/mol

$C_{38}H_{64}N_6O_9$

To the peptide **259** (43 mg; 0.05 mmol) in methanol (1.2 mL) the 10% Pd/C (6 mg; 0.15 mmol) was added. The mixture was stirred for 30 min at room temperature under the hydrogen atmosphere then filtered on the celite and concentrated under reduced pressure. The crude product was used in the next step without any purification.

Peptide 260 **:Cbz-β/γ-D-Phe-L-Val-L-Orn(Boc)-L-Leu-β/γ-D-Phe-L-Val-L-Orn(Boc)-L-Leu-OMe**



Mr = 1598.96 g/mol

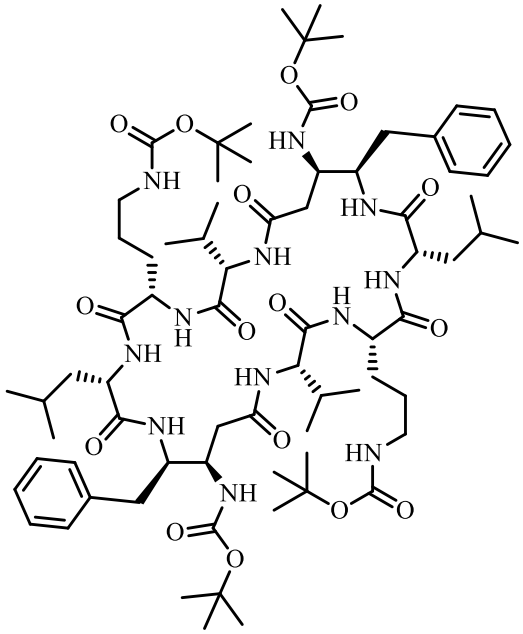
$C_{83}H_{130}N_{12}O_{19}$

The tétrapeptide **259b** (50 mg; 0.07 mmol) in dimethylformamide (0.3 mL) was added to tétrapeptide **259a** (39 mg; 0.045 mmol) activated in advance with HATU (17 mg; 0.045 mmol) and *N*,*N*-Diisopropylethylamine (DIPEA) (16 μL; 0.09 mmol) in dimethylformamide (0.6 mL) at room temperature under the argon atmosphere for 15 min. The mixture was stirred for 12 h at room temperature. The solution was diluted with ethyl acetate, treated with 10% citric acid aqueous solution

and washed with saturated solutions of sodium bicarbonate and sodium chloride. The organic phase was dried with magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was precipitated with diethyl ether to give white solid in 51% yield (37 mg).

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 1600.9972 found $M+H^+$ = 1600.9773 $M+Na^+$ = 1622.9603

Peptide 261 **: Cyclic octapeptide -(L-Orn(Boc)-L-Leu-β/γPhe-L-Val)-**



Mr = 1432.89 g/mol

$C_{74}H_{120}N_{12}O_{17}$

The **260** (23 mg; 0.014 mmol) was saponified with 4N sodium hydroxide (0.016 mL) in methanol (0.14 mL) to give 23 mg of the crude product.

To the crude product (23 mg; 0.0015 mmol) in methanol (0.6 mL) 10% Pd/C (2 mg; 0.044 mmol) was added. The mixture was stirred for 30 min at room temperature under the hydrogen atmosphere then filtered on celite and concentrated under reduced pressure.

The totally deprotected product (11 mg; 0.008 mmol) in dimethylformamide (0.4 mL) was added dropwise (1 drop in 5 minutes) to the solution of benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (PyBOP) (0.02 mg; 0.04 mmol), hydroxybenzotriazole (0.005 mg; 0.04 mmol) and *N*,*N*-Diisopropylethylamine (DIPEA) (0.02 μL; 0.11 mmol) in dimethylformamide (0.2 mL) at room temperature under the argon atmosphere. The mixture was stirred for 12 h at room temperature. The solution was diluted with ethyl acetate, treated with 10% citric acid aqueous solution and washed with saturated solutions of sodium bicarbonate and sodium chloride. The organic phase was dried with

magnesium sulfate and concentrated under reduced pressure. The crude product was washed with diethyl ether to give a white solid in 60% yield (12 mg). Currently the peptide **261** is under purification by HPLC.

HRMS (ESI+): calculated $M+H^+$ = 1433.9022 found $M+H^+$ = 1433.8854 $M+Na^+$ = 1455.8813

Molecular dynamics (MD) studies

All molecular dynamics simulations were performed using the Amber 11 software package and Amber force fields. The β,γ-diamino acid and the peptides moieties were created using the LEaP program and parameterized by the Antechamber program suite. Rectangular boxes of chloroform molecules (approximately 8A solvent layer on each side) were added. For the chloroform solvent model, the corresponding parameters of Amber 11 were used.

Simulated annealing

Each Simulation started with the peptide minimization (5000 steps). The energy-minimized structure was then subjected to a simulated annealing under NMR constraints. The ideal interatomic distances *d* were deduced from the volume integrals on the NOESY spectra using the distance between geminal protons for the distance calibration. Distance constraints have been then defined: $(d\text{-}0.5) \leq d \leq (d\text{+}0.5)$. Dihedrals were directly constrained by the Amber package using the *J* couplings determined on the 1H spectra, and properly parameterized Karpluss coefficients. The simulated annealing protocol consisted of 20000 steps including a heating stage (600 K) followed by a cooling to 0 K. For each peptide, 200 structures were calculated starting from extended folds. The ten lowest-energy structures were selected and were used to define the NMR structure ensemble.

Dynamics

The lowest energy structure obtained by simulated annealing was subjected to a molecular dynamics simulation. Pressure and temperature were equilibrated at 1 bar and 300 K, respectively. First, the solvent box was minimized over 10000 steps, peptide being fixed. Second, the whole system was minimized over 2500 steps. Third, the peptide remained fixed and the solvent box was warmed at 300 K while volume was kept constant (50000 steps, i.e. 50 ps). Fourth, the whole system was warmed at constant temperature (50000 steps, i.e. 50 ps). Fifth, the whole system was equilibrated at constant temperature (300 K) and pressure (1 bar) (50000 steps, i.e. 50 ps). Finally, molecular dynamics simulations were performed at constant temperature and concentration for 50 ns using 1 fs time steps. Coordinates and energies were recorded every 2000 steps, allowing analyses of trajectories. Three restraints were applied for the MD simulations of each peptide:

Cbz-Leu-β,γ-Leu-Val-OMe :

- $2.7 < H_{Cbz}\text{-}NH_{Val} < 3.7$ E
- $2.7 < H_{Cbz}\text{-}NH_{Val} < 3.7$ E

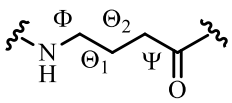
Boc-Ala-Leu-β,γ-Leu-Val-OMe :

- 2.5 < $H\alpha_{Leu}$-NHval < 3.5 E
- 2.5 < $NH\beta_{\beta,\gamma Leu}$-$H_{Boc}$ < 3.5 E
- 2.6 < $NH\gamma_{\beta,\gamma Leu}$-$H_{Boc}$ < 3.6 E

Analysis of hydrogen bonding was conducted by measurement of distances between proton of amides groups and oxygen of carbonyl groups for each snapshots of the trajectory using the ptraj program.

Dihedral angles

Averaged β,γ-Leu backbone dihedral angles with RMSD obtained on the average structure of peptides from molecular dynamics



	Φ	**Θ1**	**Θ2**	**Ψ**
Tripeptide	71,92	52,28	65,48	-113,77
Tetrapeptide	-135,86	57,11	56,54	-113,85

Abreviation

ACHC	acide aminocyclohexanecarboxylique
ACPC	acide aminocyclopentanecarboxylique
Aib	acide aminoisobutyrique
Ala	alanine
aq	aqueux
ar	aromatique
Asp	aspartique
Boc	*tert*-butyloxycarbonyle
cat	catalytique
Cbz	benzyloxycarbonyle
CD	dichroïsme circulaire
COSY	COrrelated SpectroscopY
CPP	cell-penetrating peptide
DEAD	azodicarboxylate de diéthyle
DIPEA	diisopropyléthylamine
DMAP	diméthylaminopyridine
DMF	*N*,*N*-diméthylformamide
DME	dimethoxyethane
DMSO	diméthylsufoxyde
EDCI	chlorhydrate de *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide
ee	excès énantiomérique
éq.	équivalent
Fmoc	fluorènylméthyloxycarbonyle
Gln	acide glutamique
Gly	glycine
Gpn	gabapentine
HATU	hexafluorophosphate de *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium
HBTU	hexafluorophosphate de *O*-(7-benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
IR	infrarouge
Leu	leucine
MEB	microscopie électronique à balayage
Ms	méthanesulfonyle
NMM	*N*-méthylmorpholine
NMP	*N*-méthylpyrrolidinone
NOE	effet nucléaire Overhauser
NOESY	Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY
Ph	phenyle
Phe	phenylalanine

ppb	partie par milliard
ppm	partie par million
Pro	proline
q	quaternaire
RMN	résonance magnétique nucléaire
ROESY	Rotating frame Overhauser Effect SpectroscopY
RX	Rayon X
SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis
t.a.	température ambiante
TFA	acide trifluoroacétique
THF	tétrahydrofurane
TMEDA	tetramethylethylenediamine
TOCSY	TOtally Correlated SpectroscopY
TROSY	Transverse Relaxation Optimized SpectroscopY
Ts	paratoluènesulfonyle
Val	valine

Références bibliographiques

1. Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Karle, I. L.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 13071-13072.
2. Gellman, D. H. Foldamer: a manifesto. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 173.
3. «any polymer with strong tendency to adopt a specific compact conformation»
4. Shiori, T.; Irako, N. *Chem. Lett.* **2002**, *1*, 130.
5. a). Shinagawa, S.; Kanamaru, T.; Harada, S.; Asai, M.; Okazaki, H. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1458. b). Calvisi, G.; Dell'Uomo, N.; De Angelis, F.; Dejas, R.; Giannessi, F.; Tinti, M. O. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 4501.
6. Andrews, D. M.; Barnes, M. C.; Dowle, M. D.; Hind, S. L.; Johnson, M. R.; P. S, Jones; Mills, G.; Patikis, A.; Pateman, T. J.; Redfern, T. J.; Robinson, J. E.; Slater, M. J.; Trivedi, N. *Org. Lett.*, **2003**, *54*, *4*631.
7. a). Potier, P.; Christine, C.; Ikhiri, K.; Ahond, A.; Al Mourabit, A.; Poupat, C. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 1837. b). Giri, N.; Petrini, M.; Profeta, R. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 7303. c). Matos, M. N.; Afonso, C. A. M.; Batey, R. A. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 1221.
8. Tasso, B.; Novelli, F.; Fasoli, F. ; Gotti, C. *J. Nat. Prod.*, **2013**, *76*, 727.
9. Umezawa, H.; Aoyagi, T.; Morishima, H.; Matsuzaki, M.; Hamada, M.; Takeuchi, T. *J. Antibiot*, **1970**, *23*, 259.
10. Arrowsmith, R. J.; Carter, K.; Dann, J. G.; Davies, D. E.; Harris, C.J.; Morton, J. A.; Lister, P. ; Robinson, J. A.; Williams, D. J. *Chem. Soc. Chem. Commun.* **1986**, *10*, 755.
11. Schostarez, H. J. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 3628.
12. Seo, R.; Ishizuka, T.; Alaa, A.-M.; Abdel-Aziz; Kunieda, Takehisa *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 6353.
13. a) Yoo, D.; Oh, J. S.; Kim, Y. G. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1213. b) Yoo, D.; Kwon, S.; Kim, Y. G. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 3762. c) Yoo, D.; Kim, H.; Kim, Y. G. *Synlett* **2005**, *11*, 1707.
14. a) Palomo, C.; Oiarbide, M.; Laso, A.; Lopez, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17622. b) Gomez-bengoa, E.; Linden, A.; Lopez, R.; Mugica-mendiola, I.; Oiarbide, M.; Palomo, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7955.
15. Concellon, J. M.; Rodriguez-Solla, H.; Simal, C.; Del Amo, V.; Garcia-Granda, S.; Rosario Diaz, M. *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 2991.
16. Yoon, D.-H.; Ha, H.-J.; Kim, B. C.; Lee, W. K. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 2181.
17. Lee, J. A.; Roberts, P. M.; Thomson, J. E.; Yin, J.; Davies, S. G. *Org. Lett.* **2012**, *1*, 218.
18. a) Doherty, A. M.; Kornberg, B. E.; Reily, M. D. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 795. b) Shiori, T.; Irako, N. *Chem. Lett.* **2002**, *2*, 130.
19. Merino, P.; Franco, S.; Merchan, F. L.; Tejero, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5575.
20. a) Martin-Martinez, M.; Bartolomé-Nebreda, J. M.; Gomez-Monterrey, I.; Gonzalez-Muniz, R.; Garcia-Lopez, M. T.; Ballaz, S.; Fortuno, A.; Del Rio, J.; Herranz, R. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3402. b) Bartolomé-Nebreda, J. M.; Garcia-Lopez, M. T.; Gonzalez-Muniz, R.; Cenarruzabeitia, E.; Latorre, M.; Del Rio, J.; Herranz, R. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4196.
21. Macdonald, S. J. F.; Clarke, G. D. E.; Dowle, M. D.; Harrison, L. A.; Hodgson, S. T.; Inglis, G. G. A.; Johnson, M. R.; Shah, P.; Upton, R. J.; Walls, S. B. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5166.
22. Hoang C. T.; *Thèse de doctorat*, Université Paris-Sud Orsay **2007**.
23. Thetiot-Laurent, S.; Bouillère, F.; Baltaze, J.-P.; Brisset, F.; Feytens, D.; Kouklovsky, C.; Miclet, E.; Alezra, V. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 9660.
24. Revue : H. S. P. Rao, S. Rafi, K. Padmavathy *Tetrahedron* **2008**, *64*, 8037. Réaction de Blaise réalisées dans notre laboratoire : a) Mauduit, M.; Kouklovsky, C.; Langlois, Y. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, *5*, 1595. b) Maudit, M.; Kouklovsky, C.; Langlois, Y. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1053.
25. Thompson, S. A.; Andrews, P. R.; Hanzlik, R. P. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 104.
26. Bouillère F.; *Thèse de doctorat*, Université Paris-Sud Orsay **2010**.
27. Hoang, C. T.; Alezra, V.; Guillot, R.; Kouklovsky, C. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2521.
28. Dale, J. A.; Mosher, H. S. *J. Am. Soc.* **1973**, *95*, 512.
29. Hoang, C. T.; Bouillère, F.; Johannesen, S.; Zulauf, A.; Panel, C.; Gori, D.; Pouilhes, A.; Alezra, V.; Kouklovsky, C. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 4177.
30. Bouillère, F.; Guillot, R.; Kouklovsky, C.; Alezra, V. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 394.
31. a). Iwanami, S.; Takashima, M. ; Hirata, Y.; Hasegawa, O.; Usuda, S. *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 1224. b). Huang, P. Q.; Wang, S. L.; Zheng, H.; Fei, X. S. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 271. c). Assié, M.-B.; Cosi, C.; Koek, W. *Eur.*

J. Pharmacol. **1997**, *334*, 141. d). Shibugushi, T.; Mihara, H.; Kuramochi, A.; Ohshima, T., Shibasaki, M. *Chem. Asian J.* **2007**, *2*, 794.
32. Hoang, C. T.; Nguyen, V. H.; Alezra, V.; Kouklovsky, C. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 1162.
33. Wu, X.; Rieke, R. D. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6658.
34. Lee, A. S.; Cheng, R. Y.; Pan, O. G. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 443.
35. Ley, S. V.; Low, C. M. R. Ultrasound in Synthesis; Springer: New York, NY, 1989.
36. Standtmuller, H.; Greve, B.; Lennick, K.; Chair, A.; Knochel, P. *Synthesis*, **1995**, *1*, 69.
37. Pauling, L.; Corey, R.B.; Branson, H.R. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1951**, *37*, 205.
38. Kendrew, J.C. ; Bodo, G. ; Dintzis, H.M. ; Parrish, R.G. ; Wyckoff, H. ; Phillips, D.C. *Nature* **1958**, *161*, 662.
39. Ramachandran, G.N.; Sasisekharan, V. Conformation of Polypeptides and Proteins. *Adv. Prot Chem*. **1968**, *23*, 283.
40. Stapley, B. J.; Creamer, T. P. *Protein Sci* **1999**, *8*, 587.
41. Rath, A.; A.R. Davidson and C.M. Deber, *Biopolymers*, **2005**, *80*, 179.
42. Adzhubei, A. A.; Sternberg, M. J. *J Mol Biol* **1993**, *229*, 472.
43. Kay, B. K.; Williamson, M. P.; Sudol, M. *FASEB J* **2000**, *14*, 231.
44. Karplus, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 2870.
45. Krimm, S.; Bondekar, J. *Adv. Prot. Chem.*, **1986**, *38*, 181.
46. http://www.cryst.bbk.ac.uk/PPS2/course/section8/ss-960531_21.html
47. Hintermann, T.; Gademann, K.; Jaun, B.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta*. **1998**, *81*, 983.
48. Hanessian, S.; Luo, X.; Schaum, R.; Michnick, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8569.
49. Seebach, D.; Overhand, M.; Kunhle, F. N. M.; Martinoni, B.; Oberer, L.; Hommel, U.; Widmer, H. *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 913.
50. Hintermann, T.; Seebach, D. *Synlett* **1997**, 437.
51. Seebach D.; Abele, S.; Gademann, K.; Guichard, G.; Hintermann, T.; Jaun, B.; Matthews, J. L.; Schreiber, J. V.; Oberer, L.; Hommel, U.; Widmer, H. *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 932.
52. Gademann, K.; Häne, A.; Rueping, M.; Jaun, B.; Seebach, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1534.
53. Abele, S.; Seiler, P.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 1559.
54. Fernandes, C.; Faure, S.; Pereira, E.; Théry, V.; Declerck, V.; Guillot, R.; Aitken, D. *J. Org. Lett.* **2010**, *12*, 3606.
55. Apella, D. H.; Christianson, L. A.; Klein, D. A.; Richards, M. R.; Powell, D.R.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7574.
56. Hetenyi, A.; Mandity, I. M.; Martinek, T.A.; Toth, G. K.; Fülöp, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 547.
57. Hetényi, A.; Szakonyi ,Z.; Mándity, I. M.; Szolnoki, É.; Tóth,G. K.; Martinek, T. A.; Fülöp, F. *Chem. Commun.*, **2009**, 177.
58. Claridge, T. D. W.; Goodman, J. M.; Moreno, A.; Angus, D.; Barker, S. F.; Taillefumier, C.; Watterson, M. P.; Fleet, G. W. J. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 4251.
59. Seebach, D.; Gademann, K.; Schreiber, J. V.; Matthews, J. L.; Hintermann, T.; Jaun, B.; Oberer, L.; Hommel, U.; Widmer, H. *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 2033.
60. Rueping, M.; Schreiber, J. V.; Lelais, G.; Jaun, B.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 2577.
61. Frackenpohl, J.; Arvidsson, P. I.; Schreiber, J. V.; Seebach, D. *Chem. Bio. Chem.* **2001**, *2*, 445.
62. Hamuro, Y.; Schneider, J. P.; DeGrado, W. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 12200.
63. Liu, D.; DeGrado, W. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7553.
64. Porter, E. A.; Weisblum, B.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7324.
65. Schmitt, M. A.; Weissblum, B.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6848.
66. Arvidsson, P. I.; Ryder, N. S.; Weiss, H. M.; Gross, G.; Kretz, O.; Woessner, R.; Seebach, D. *Chem.Bio.Chem* **2003**, *4*, 1345.
67. Seebach, D.; Namoto, K.; Mahajan, Y.; Bindschädler, P.; Sustmann, R.; Kirsch, M.; Ryder, N. S.; Weiss, M.; Sauer, M.; Roth, C.; Werner, S.; Beer, H.-D.; Munding, C.; Walde, P.; Voser, M. *Chem. Biodiv.* **2004**, *1*, 65.
68. Arvidsson, P. I.; Ryder, N. S.; Weiss, H. M.; Hook, D. F.; Escalante, J.; Seebach, D.; *Chem.Biodiv.* **2005**, *2*, 401.
69. Werder, M.; Hauser, H.; Abele, S.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta.* **1999**, *82*, 1774.
70. Kritzer, J.; Lear, J. D.; Hodsdon, M. E.; Schepartz, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9468.
71. Sadowski, J. D. ; Fairlie, W. D. ; Hadley, E. B.; Lee, H-S.; Umezawa, N.; Nikolovska-Coleska, Z.; Wang, S. ; Huang, D. C. S. ; Tomita, Y. ; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 139.
72. Umezawa, N.; Gelman, M. A.; Haigis, M. C.; Raines, R. T.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 368.
73. Li, X.; Wu, Y.-D., Yang, D. *Acc. Chem. Res.*, **2008**, *41*, 1428.

74. a) Gu1nther, R.; Hofmann, H.-J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 247. b) Acherar, S.; Salaün, A.; Le Grel, P.; Le Grel, B.; Jamart-Gregoire, B. *Eur. J. Chem.*, **2013**, *18*, 5603.
75. Fischer, L.; Didierjean, C.; Jolibois, F.; Semetey, V.; Lozano, J. M.; Briand, J. P.; Marraud, M.; Poteau, R.; Guichard G. *Org Biomol Chem*, **2008**, *6*, 2596.
76. Seebach, D.; Hook, D. F.; Glättli, A. Biopol., **2006**, *84*, 23.
77. Basuroy K.; Dinesh B.; Reddy M. B.; Chandrappa S.; Raghothama S.; Shamala N.; Balaram P. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 4866.
78. Seebach, D.; Brenner, M.; Rueping, M.; Jaun, B. *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 573.
79. Sharma, G. V. M.; Jayaprakash, P.; Narsimulu, K.; Ravi Sankar, A.; Ravinder Reddy, K.; Radha Krishna, P.; Kunwar, A. C. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2006**, *45*, 2944.
80. Vasudev, P. V.; Shamala, N.; Ananda, K.; Balaram, P. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2005**, *44*, 4972.
81. Hoffman, R. W. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2000**, *39*, 2054.
82. Hanessian, S.; Luo, X.; Schaum, R. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 4925.
83. Brenner, M.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 2155.
84. Brenner, M.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 1181.
85. Khurram, M.; Qureshi, N.; Smith, M. D. *Chem. Commun*. **2006**, *48*, 5006.
86. Woll, M. G. ; Lai, J. R.; Guzei, I. A.; Taylor, S. J. C.; Smith, M. E. B.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11077.
87. Farrera-Sinfreu, J.; Zaccaro, L. ; Vidal, D. ; Salvatella, X. ; Giralt, E. ; Pons, M. ; Albericio, F. ; Royo, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6048.
88. Kothari, A.; Khurram, M.; Qureshi, N.; Beck, E. M.; Smith, D. M. *Chem. Commun.* **2007**, *27*, 2814.
89. Seebach, D.; Brenner, M.; Rueping, M.; Schweizer, B.; Jaun, B. *Chem. Comm.* **2001**, *2*, 207.
90. Baldauf, C.; Gunther, R.; Hofmann, H. J. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1200.
91. Vasudev, P. G. ; Ananda, K.; Chatterjee, J.; Aravinda, S.; Shamala, N. ; Balaram, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4039.
92. Guo, L. ; Almeida A. M. ; Zhang, W. ; Reidenbach, A. G.; Hyuk Choi, S.; Guzei, I. A.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7868.
93. Sharma, G. V. M. ; Jadhav, V. B. ; Ramakrishna, K. V. S.; Jayaprakash, P.; Narsimulu, K.; Subash, V.; Kunwar, A. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14657.
94. Ananda, K.; Vasudev, P. G. ; Sengupta, A.; Poopathi Raja, K. M. ; Shamala, N. ; Balaram, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16668.
95. Chatterjee, J.; Vasudev, P. G. ; Ananda, K.; Raghotama, S.; Shamala, N. ; Balaram, P. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6595.
96. Chatterjee, J.; Vasudev, P. G. ; Raghotama, S.; Ramakrishnan, C.; Shamala, N. ; Balaram, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5956.
97. Dinesh, B.; Basuroy, K.; Shamala, N.; Balaram, P. *Tetrahedron*, **2012**, *68*, 4374.
98. a). Karle, I. L.; Flippen-Anderson, K. Uma; Balaram, P. *Biopolymers* **1993**, *33*, 827. b). Karle, I. L.; Flippen-Anderson, K. Uma; Balaram, P. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, *44*, 491.
99. Basuroy, K.; Dinesh, B.; Shamala, N.; Balaram, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 3136.
100. Basuroy, K.; Dinesh, B.; Shamala, N.; Balaram, P. *Angew. Chem. In. Ed.*. **2012**, *51*, 8736.
101. Dinesh, B.; Vinaya, V.; Ragothama, S.; Balaram, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013*, 3590.
102. Sont, R.; Dinesh, B.; Basuroy, K.; Raghothama, S.; Shamala, N.; Balaram, P. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 1656.
103. Guo, L. ; Chi, Y. ; Almeida, A. M. ; Guzei, I. A. ; Parker, B. K. ; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 1601.
104. Kusaka, R.; Zhang, D.; Walsh, P. S.; Gord, J. R.; Fisher, B. F.; Gellman, H. S. *J. Phys. Chem. A*, **2013**, *117*, 10847.
105. Guo, L.; Zhang, W.; Guzei, I. A.; Spencer, L. C.; Gellman, S. H. *Org. Lett.*, **2012**, *14*, 2582.
106. Bandyopadhyay, A.; Malik, A.; Kumar, G. M.; Gopi, H. N. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 294.
107. Stanfield, R. L.; Fieser, T. M.; Lerner, R. A.; Wilson, I. A. *Science* **1990**, *248*, 712.
108. Trabocchi, A. ; Occhiato, E. G. ; Potenza, D.; Guarna, A. *J. Org. Chem*. **2002**, *67*, 7483.
109. Chatterjee, J.; Vasudev, P. G. ; Raghotama, S.; Ramakrishnan, C.; Shamala, N. ; Balaram, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5956.
110. Roy, R. S.; Gopi, H. N.; Raghothama, S.; Karle, I. L.; Balaram, P. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 3295.
111. Baldauf, C.; Günther, R.; Hofmann, H.-J. *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 5351.

112. Hagihara, M.; Anthony, N. J.; Stout, T. J.; Clardy, J.; Schreiber, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6568.
113. Coutrot, P.; Grison, C.; Genève, S.; Didierjean, C.; Aubry, A.; Vicherat, A.; Marraud, M. *Lett. Pept. Sci.*, **1997**, *4*, 415.
114. Grison, C.; Coutrot, P.; Genève, S.; Didierjean, C. ; Marraud, M. *J. Org. Chem*. **2005**, *70*, 10753.
115. Yang, D. ; Zhang, Y-H. ; Zhu, N.-Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9966.
116. Yang, D. ; Zhang, Y-H. ; Zhu, N.-Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9966.
117. Yang, D. ; Zhang, Y-H. ; Li, B. ; Zhang, D.-W. ; Chan, J. C.-Y. ; Zhu, N.-Y. ; Luo, S.-W. ; Wu, Y.-D. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6956.
118. Zhang, Y-H. ; Song, K. ; Zhu, N.-Y. ; Yang, D. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 577.
119. Yang, D.; Zhang, D.-W. ; Hao, Y.; Zhu, N.-Y. ; Luo, S.-W. ; Wu, Y.-D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6719.
120. Wilson, M. E.; Nowick, J. S. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 6613.
121. Nowick, J. S.; Powell, N. A.; Martinez, E. J.; Smith, E. M.; Noronha, G. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 3763.
122. Nowick, J. S.; Abdi, M.; Bellamo, K. A.; Love, J. A.; Martinez, E. J.; Noronha, G.; Smith, E. M.; Ziller, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 89.
123. Nowick, J. S. *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 287.
124. Semetey, V.; Rognan, D. ; Hemmerlin, C.; Graff, R.; Briand, J.-P.; Marraud, M.; Guichard, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1893.
125. Hemmerlin, C.; Marraud, M.; Rognan, D.; Graff, R.; Semetey, V.; Briand, J.-P.; Guichard, G. *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 3692.
126. Violette, A.; Averlant-Petit, M. C. ; Sementey, V. ; Hemmerlin, C. ; Casimir, R. ; Graff, R. ; Marraud, M. ; Briand, J. –P. ; Rognan, D. ; Guichard, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2156.
127. Guichard, G. ; Violette, A. ; Chassaing, G. ; Miclet, E. *Magn. Reson. Chem*. **2008**, *46*, 918.
128. Fisher, L.; Claudon, P.; Pendem, N.; Miclet, E.; Didierjean, C.; Ennifar, E.; Guichard, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1067.
129. Fremaux, J.; Fiscer, L.; Arbogast, T.; Kauffmann, B.; Guichard, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11382.
130. Fremaux, J.; Kauffmann, B.; Guichard, G. *J. Org. Chem.*, **2014**, *79*, 5494.
131. Pendem, N.; Douat, C.; Claudon, P.; Laguerre, M.; Castano, S.; Desbat, B.; Cavagnat, D.; Ennifar, E.; Kauffmann, B.; Guichard, G. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 4884.
132. Fremaux, J.; Dolain, C.; Kauffmann, B.; Clayden, J.; Guichard, G. *Chem. Comm.*, **2013**, *49*, 7415.
133. Pendem, N.; Nelli, Y. R.; Douat, C.; Fischer, L.; Laguerre, M.; Ennifar, E.; Kauffmann, B.; Guichard, G. *J. Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4147.
134. Machetti, F. ; Ferrali, A. ; Menchi, G. ; Occhiato, E. G. ; Guarna, A. *Org. Lett*. **2000**, *2*, 3987.
135. Seebach, D. ; Schaeffer, L. ; Meinrad, B. ; Hoyer, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 776.
136. Lundberg, P. ; Langel, Ü. *J. Mol. Recognit*. **2003**, *16*, 227.
137. Farrera-Sinfreu, J.; Giralt, E. ; Castel, S. ; Albericio, F. ; Royo, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9459.
138. Schwarze, P. M. ; Dowdy, S. F. *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, *21*, 45.
139. Claudon, P. ; Violette, A. ; Lamour, K. ; Decossas, M. ; Fournel, S. ; Heurtault, B. ; Godet, J. ; Mély, Y. ; Jamaet-Gregoire, B. ; Averlant-Petit, M. C. ; Briand, J. P. ; Duportail, G. ; Monteil, H. ; Guichard, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1.
140. Rosés, C.; Carbajo, D.; Sanclimens, G.; Farrera-Sinfreu, J.; Blancafort, A.; Oliveras, G.; Cirac, D. A.; Bardaji, E.; Puig, T.; Planas, M.; Feliu, L.; Albericio, F.; Royo, M. *Tetrahedron*, **2012**, *68*, 4406.
141. Merrifield, R.B.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 2149.
142. Kaiser; *Anal. Biochem*, **1970**, *34*, 595.
143. Hancock; *Anal. Biochem*, **1976**, *71*, 260.
144. Kaul, R.; Balaral, P. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 105.
145. Thétiot-Laurent, S.; Bouillère, F.; Baltaze, J.-P.; Brisset, F.; Feytens, D.; Kouklovsky, C.; Miclet, E.; Alezra, V. *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, *10*, 9660.
146. F. Bouillère, D. Feytens, D. Gori, R. Guillot, C. Kouklovsky, E. Miclet, V. Alezra *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 1982.
147. Guichard, G.; Violette, A.; Chassaing, G.; Miclet, E. *Magn. Reson. Chem.* **2008**, *46*, 918.
148. Delaglio, F.; Dynamo NMR molecular structure engine, version 2.1, http.//spin.niddk.nih.gov/NMRPipe/dynamo/
149. Thétiot-Laurent, S.; Bouillère, F.; Baltaze, J.-P.; Brisset, F.; Feytens, D.; Kouklovsky, C.; Miclet, M.; Alezra, V. *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, *10*, 9660.
150. Copeland, G. T. ; Jarvo, E. R. ; Miller, S. J. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6784.

151. (a) Dado, G. P.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc*., **1994**, *116*, 1054; (b) James, W. H.; Buchanan, E. G.; Guo, L.; Gellman, S. H.; Zwier, T. S. *J. Phys. Chem. A.*, **2011**, *115*, 11960.
152. Copeland, G. T. ; Jarvo, E. R. ; Miller, S. J. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6784.
153. Hodgkin, D. C.; Oughton, B. M., *Biochem. J.* **1954**, *65*, 752.
154. Gause, G. F.; Brazhnikova, M. G. *Nature*, **1944**, *154*, 703.
155. Kondejewski, L. H.; Farmer, S. W; Wishart, D. S.; Hancock, R. E. W; Hodges, R. S., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1996**, *47*, 460.
156. Wadsten, C. J.; Bertilsson, C. A.; Sieradzki, H.; Edstrom, S., *Arch. Oto-Rhino-Laryngol.* **1985**, *242*, 135.
157. Xiao, J.; Weisblum, B.; Wipf, P. *J. Am. Chem. Soc*, **2005**, *127*, 5742.
158. Xiao, J.; Weisblum, B.; Wipf, P. *Org. Lett.*, **2006**, *21*, 4731.
159. Knijnenburg, A. D.; Tuin, A. W.; Spalburg, E.; Neeling, A. J.; Mars-Groenendijk, R. H.; Noort, D.; Otero, J.M.; Llamas-Saiz, A. L.; Raaij, M. J.; Marel, G. A.; Overkleeft, H. S.; Overhand, M. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 3995.
160. Grotenberg, A. E.; Buizert, A. E. M.; Llamas-Saiz, A. L.; Spalburg, E.; van Hooft, P. A. V.; de Neeling, A. J.; Noort, D.; Raaij, M. J.; Marel, G. A.; Overkleeft, H. S.; Overhand, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 7559.
161. Legrand, B.; Mathieu, L.; Lebrun, A.; Andriamanarivo, S.; Lisowski, S.; Masurier, N.; Zirah, S.; Kang, Y. K.; Martinez, J.; Maillard, L. T. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 6713.
162. Luo, J.; Otero, J., M.; Yu, C.-H.; Warmlander, S. K. T. S.; Graslund, A.; Overhand, M.; Abrahams, J. P. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 17338.
163. Kapoerchan, V. V.; Knijnenburg, A. D.; Niamat, M.; Spalburg, S.; Neeling, A. J.; Nibbering, P. H.; Mars-Groenendijk, R. H.; Noort, D.; Otero, J. M.; Llamas-Saiz, A. L.; Raaij, M. J.; Marel, G. A.; Overkleeft, H. S.; Overhand, M. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 12174.