

# THÈSE

PRÉSENTÉE A

**L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Par Claire VENIN

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : chimie organique

## **SYNTHÈSE EN PARALLÈLE D'HÉTÉROCYCLES DÉRIVÉS DE SÉQUENCES DIPEPTIDIQUES ET PROFIL D'ACTIVITÉ INHIBITRICE SUR LES PHOSPHOLIPASES A<sub>2</sub> SÉCRÉTÉES**

Directeur de recherche : Gilles Guichard

Soutenue le : 24 septembre 2013

Devant la commission d'examen formée de :

Pr Patricia MELNYK	Université de Lille 2	Rapporteur
Pr Dirk TOURWE	Free University of Brussels	Rapporteur
Pr Jean GUILLON	Université de Bordeaux 2	Examinateur, président
Dr Isabelle PARROT	Université de Montpellier 2	Examinatrice
Dr Gérard LAMBEAU	Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire	Membre invité



## Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier le D<sup>r</sup> Eric Dufourc pour m'avoir accueilli dans son laboratoire de chimie et biologie des membranes et des nano-objets (Allée de St Hilaire Bât B14, 33600 Pessac).

Je remercie également le D<sup>r</sup> Gilles Guichard pour m'avoir encadrée pour mes travaux de thèse ainsi que pour sa grande disponibilité ainsi que le D<sup>r</sup> Gérard Lambeau pour les tests sur les phospholipases A<sub>2</sub>.

De même je remercie Robert Zimmer, directeur de la société ImmuPharma pour m'avoir fait confiance et avoir financé mes recherches.

Je remercie le D<sup>r</sup> Karine Gionnet pour les bons moments que nous avons passés ensemble au laboratoire et à l'extérieur ainsi que pour ses conseils. Merci aussi au D<sup>r</sup> Céline Douat pour son aide et ses conseils.

Je remercie ma famille qui ne m'a pas beaucoup vue pendant ma thèse mais ils ont l'habitude. ...

Un très très grand merci à mes amis, grâce à vous j'ai très bien vécu l'éloignement de ma famille, les longues heures au laboratoire et la rédaction :

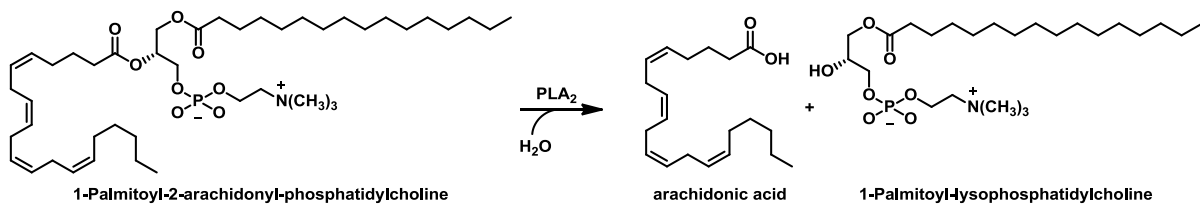
Lucile, Juliette, Caterina, Karolina, Marie-Charlotte, Emilie, Gloria, Cinzia, Simon, Kris, Christos, Gavin, Arnaud, Neil, Yella-Reddy, Nagendar, Mickael, Christel, Fabien, Stéphanie, Guillaume, Hélène, Filipa, Paulo, Isabelle.

Cela a été un vrai et grand plaisir de vous cotoyer tous pendant ses quatre années, vous m'avez beaucoup aidé dans les moments difficiles. Vous allez tous beaucoup me manquer et je ne vous oublierai jamais.



## 1) Introduction : inhibiteurs de phospholipases A<sub>2</sub> sécrétées

Les phospholipases A<sub>2</sub> constituent une famille d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse des phospholipides en position *Sn*-2. Lors de cette hydrolyse, un acide gras (par exemple : l'acide arachidonique) et un lysophospholipide (par exemple : le 1-palmitoyl-lysophosphatidylcholine) sont libérés dans le milieu (**figure 1**).



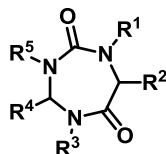
**Figure 1** : Réaction catalysée par les sPLA<sub>2</sub>

Le génome humain possède onze gènes codant pour onze isoformes de sPLA<sub>2</sub> dont deux sont inactives. Ce sont des protéines de faible poids moléculaire, riches en ponts disulfure et dont la localisation dans les différents tissus varie selon l'isoforme.

L'activité catalytique des sPLA<sub>2</sub> se fait en deux temps : l'absorption à la surface de la membrane puis l'hydrolyse en elle-même. Cette dernière est rendue possible grâce à la présence d'un ion calcium et d'une dyade catalytique formée d'une histidine et d'un acide aspartique dans le site actif.

Les sPLA<sub>2</sub> sont impliquées dans un grand nombre de processus biologiques sans que leurs rôles ne soient clairement définis, de plus, elles constituent une cible thérapeutique de par leur rôle central de production de médiateurs lipidiques. Le développement d'inhibiteurs de sPLA<sub>2</sub> doit permettre de clarifier le rôle de ces enzymes ainsi que d'aider à mieux comprendre le mécanisme d'hydrolyse des phospholipides. Enfin ces molécules pourraient devenir des molécules à visée thérapeutique. Les premiers inhibiteurs développés sont des analogues de phospholipides, ces derniers peuvent se montrer efficaces mais ne sont pas spécifiques. D'autres composés tels que des acides dicarboxyliques, des sulfonamides ou des amides ont montrés des activités intéressantes tout en étant spécifiques mais les composés les plus prometteurs restent les dérivés indoles tel que le Me-Indoxam.

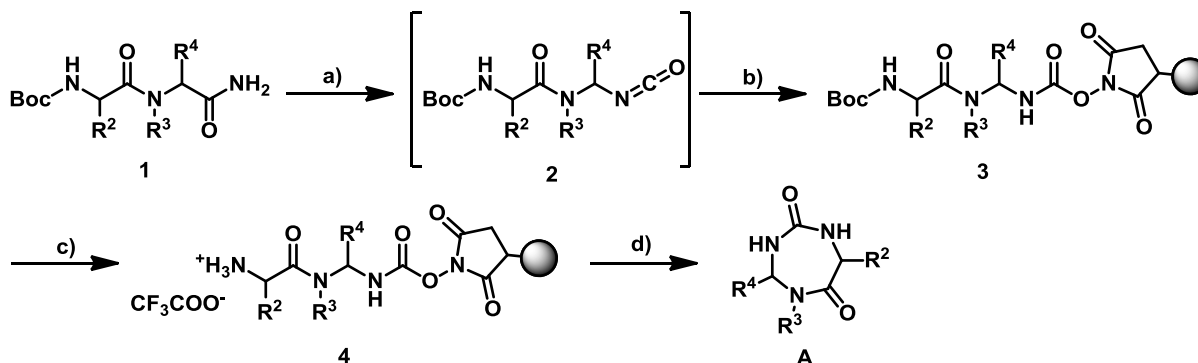
Les phospholipases A<sub>2</sub> secrétées ont été identifiées par un screening virtuel comme cibles d'hétérocycles à 7 chaînons dérivant des dipeptides : les 1,3,5-triazépane-2,6-diones. Ces cycles sont intéressants par leur rigidité, leur non-planarité, leurs cinq points de diversité et par la présence des urées permettant la formation des liaisons hydrogène (**figure 2**).



**Figure 2** : squelette 1,3,5-triazépane-2,6-dione

## II) création d'une chimiothèque de 1,3,5-triazépane-2,6-diones

L'un des but de ma thèse était la mise en place d'une voie de synthèse en parallèle permettant la création d'une chimiothèque de 1,3,5-triazépane-2,6-diones. La voie de synthèse sur support solide mise au point se déroule en trois temps : (i) synthèse de dipeptides amides **1** ayant recours à la résine *Sieber* (ii) réarrangement *d'Hoffmann* et piégeage de l'isocyanate par une résine N-hydroxysuccinimide et (iii) cycloclivage (**schéma 1**).



a) PIFA (0,8 eq.), pyridine (1,6 eq.), THF anhydre, TA, 1h; b) résine N-hydroxysuccinimide (0,2 eq.), THF anhydre, TA, 4h; c) TFA/DCM (1/3, v/v), TA, 2x 30 min; d) DIEA (5 eq.), THF, 35°C, 4h.

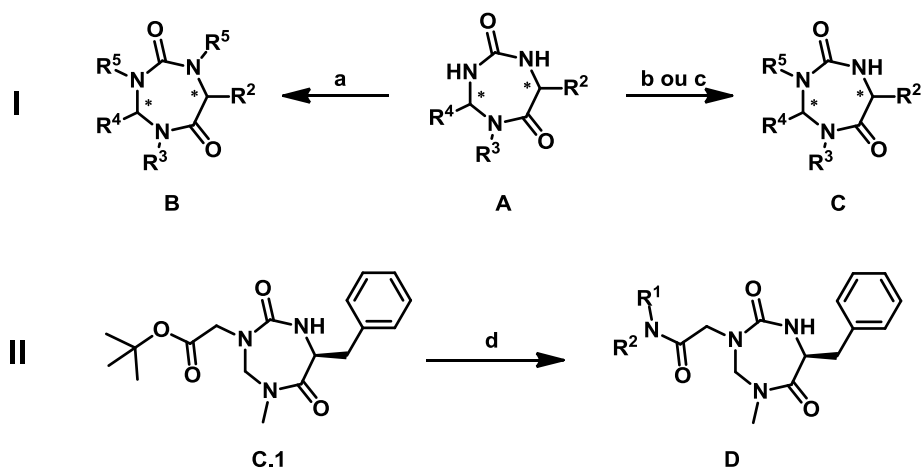
### **Schéma 1** : synthèse de 1,3,5-triazépane-2,6-diones sur support solide

La synthèse en phase solide est très proche de celle en solution, en effet, l'amide du dipeptide **1** subit le réarrangement *d'Hofmann* en présence du dérivé d'iode hypervalent PIFA. L'isocyanate **2** ainsi formé est piégé par la résine N-hydroxysuccinimide pour donner le carbamate supporté **3**. Les deux dernières étapes consistent au clivage du groupement protecteur Boc et au cyclo-clivage.

Cette méthode a permis l'obtention de plus d'une centaine de cycles avec des rendements de 5 à 88 % avec des puretés HPLC supérieures à 80 % pour les composés bruts. Néanmoins, cette voie de

synthèse n'est pas adaptée aux acides aminés présentant des fonctions sensibles à l'oxydation tels que la cystéine, le tryptophane ou l'histidine.

Pour augmenter la diversité autour du squelette 1,3,5-triazépane-2,6-dione, deux petites chimiothèques ont été créées par des réactions d'alkylation **I** et d'acylation **II** (schéma 2).



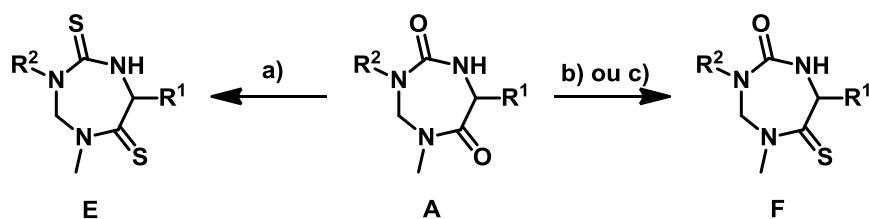
a) NaH (4 éq.), R<sup>5</sup>-X (4 éq.), THF, 25-60°C, 24h ; b) KF/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 40 % wt (10 éq.), R<sup>5</sup>-X (2 éq.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 40°C, 24h, c) NaH (3 éq.), R<sup>5</sup>-X (3 éq.), THF, TA, 24h; d) (i) TFA, 0°C, 30 min, (ii) PS-DIPAM (1,5 éq.), PS-IIDQ (2 éq.), R<sup>1</sup>R<sup>2</sup>NH (1,2 éq.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>CN (2:1,v:v), TA, 3 jours

**Schéma 2** : réactions d'alkylation de l'urée et d'acylation

La *N,N*-di-alkylation de l'urée est réalisée en présence de quatre équivalents d'hydruure de sodium et de quatre équivalents de dérivé halogéné dans le THF tandis que la *N*-mono-alkylation requiert dix équivalents de KF/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et deux équivalents de dérivé halogéné. Le KF/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> induit la *N*-mono-alkylation sélective de l'azote *gem*-diamino de l'urée, la formation du composé *N,N*-di-alkylé est minoritaire (< 1%). La synthèse des dérivés amides **D** est réalisée en présence de réactifs supportés : la résine PS-IIDQ comme agent de couplage et la résine PS-DIPAM comme base. Ces synthèses ont conduit à la formation d'une chimiothèque de onze composés de type **C** et six composés de type **D**.

### III) Analogues des 1,3,5-triazépane-2,6-diones présentant une fonction thiocarbonyle

Une autre diversification post-cyclisation possible est la thionation des carbonyles. Cette réaction a pour but d'augmenter la lipophilie des cycles et donc leur activité biologique. Il est possible de réaliser la thionation de l'amide et de l'urée ou la thionation de l'amide seule (schéma 3).

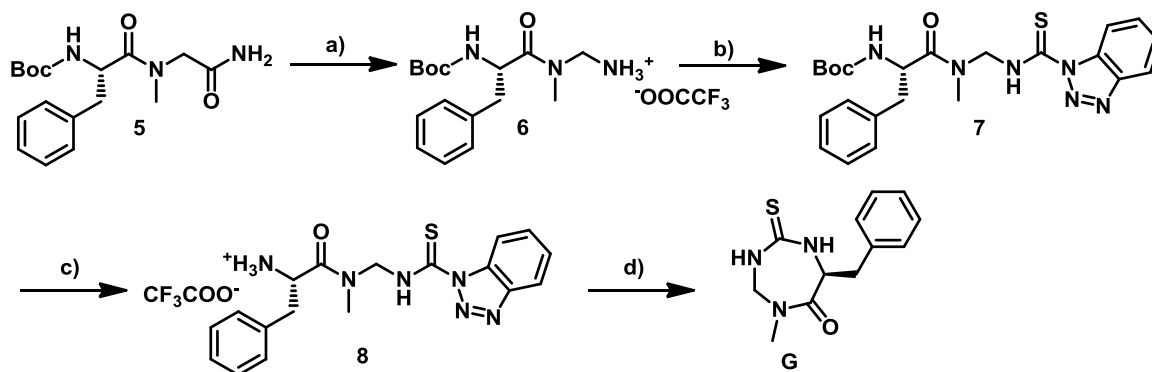


a) LR (1 eq), toluène, 80°C, 48h; b) LR (1 eq), THF, TA; c) LR (3 eq.), THF, 60°C, 72h.

### Schéma 3: thionation des carbonyles

L'utilisation du réactif de Lawesson (LR) permet d'obtenir la formation du thioamide à température ambiante lorsque l'urée du cycle n'est pas *N*-mono-alkylée ou à reflux lorsque cette dernière est *N*-mono-alkylée. La thionation des deux fonctions carbonyles nécessite quant-à-elle, le chauffage à 80°C dans le toluène.

La formation d'une thiourée à partir d'une urée n'est pas favorable lorsque l'urée est secondaire donc une nouvelle voie de synthèse a été mise en place pour obtenir un composé possédant une thiourée et un amide (schéma 4).



a) IBTFA (1,2 eq), CH<sub>3</sub>CN, H<sub>2</sub>O, TA, 2h; b) Bisbenzotriazol-1-yl methanethione (1 eq), DCM distillé, TA, une nuit; c) TFA, 0°C, 30 min; d) DIEA (1,2 eq), CH<sub>3</sub>CN, TA, une nuit.

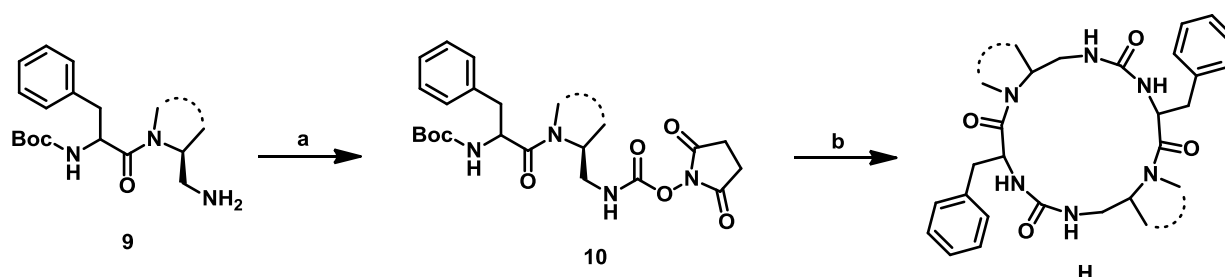
### Schéma 4: synthèse de 2-thio-1,3,5-triazépan-6-one

L'amide du dipeptide **5** réagit avec l'IBTFA ([Bis(trifluoroacetoxy)iodo]benzene) donnant l'isocyanate correspondant qui est directement hydrolysé sel de TFA **6**. Après avoir libérée l'amine du sel de TFA, cette dernière est couplée sur la bisbenzotriazol-1-yl methanethione pour donner le thiocarbamoylbenzotriazole **7**. Le groupement protecteur Boc est éliminé en présence de TFA puis l'étape finale de cyclisation est effectuée en milieu basique dilué.



#### IV) cycles analogues à huit membres

La dernière diversification envisagée est la synthèse de cycles à 8 chaînons. Les premiers tests concernaient les cycles analogues possédant une urée et un amide (**schéma 5**). Mais lors de l'étape de cyclisation, le manque de flexibilité de la liaison urée a conduit à l'oligomérisation des carbamates et à la synthèse de macrocycles de 16 ou 24 chaînons.

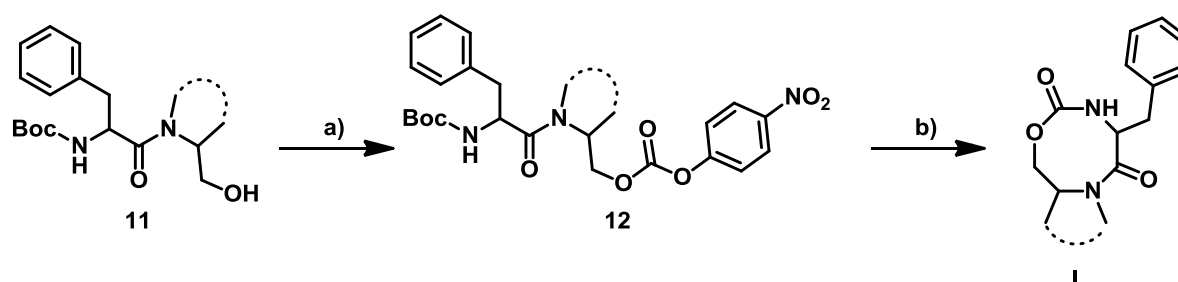


a) DSC (1,2 eq) DCM distillé, TA, une nuit; b) (i) TFA, 0°C, 30 min; (ii) DIEA (2 eq), CH<sub>3</sub>CN, TA, 2h.

#### Schéma 5 : formation d'un macrocycle

L'amine libre du dipeptide **9** est activée sous forme de carbamate de succinimide **10** grâce au carbonate de diméthylsuccinimide puis, de même que lors de la synthèse des 1,3,5-triazépane-2,6-dione, le groupement Boc est clivé en présence de TFA et la cyclisation a lieu en milieu basique très dilué. Cette synthèse a conduit à la formation de 3 macrocycles de 16 chaînons et un de 24 chaînons.

Pour favoriser une géométrie propice à la fermeture du cycle, nous avons finalement choisi de remplacer la fonction urée par une fonction carbamate et d'évaluer la formation d'hétérocycles de type 1,3,6-oxadiazocane-2,5-dione (**schéma 6**).



a) chloroformate de 4-nitrophényle (2 eq.), pyridine (1,1 eq.), DCM, TA, 12h; b) (i) TFA, 0°C, 30 min; (ii) HOBt (1 eq.), DIEA (2 eq.), CH<sub>3</sub>CN, TA, 3 jours.

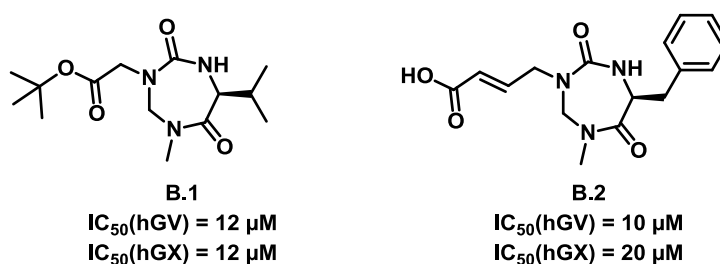
#### Schéma 6 : synthèse de 1,3,6-oxadiazocane-2,5-dione

Le groupement carbamate du cycle **I** est introduit grâce au dérivé carbonate **12**. Ce dernier est formé directement par le couplage de l'alcool du dipeptide **11** sur le chloroformate de 4-nitrophényle en

milieu basique. Contrairement aux cycles présentant une fonction urée, la cyclisation de la fonction carbamate nécessite l'utilisation de HOBt. Il est à noter que la formation du monomère cyclique s'accompagne de celle du dimère cyclique et que la cyclisation du dipeptide de séquence hétérochirale ne conduit pas au monomère cyclique.

## V) Evaluation biologique des 1,3,5-triazépane-2,6-diones

Un screening virtuel réalisé précédemment avait identifié les sPLA<sub>2</sub> comme cibles potentielles des 1,3,5-triazépane-2,6-diones. Deux molécules, **B.1** et **B.2** (**figure 3**), ont été sélectionnées car ayant une activité inhibitrice sur les sPLA<sub>2</sub> hGV et hGX.

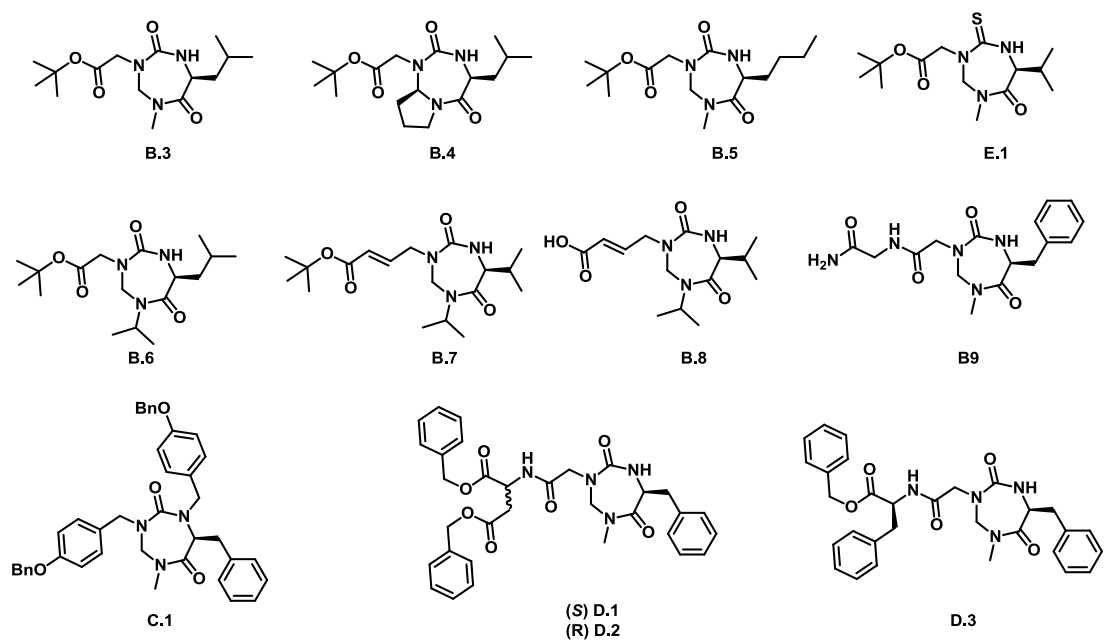


**Figure 3** : composés identifiés comme inhibiteurs de sPLA<sub>2</sub> hGV et hGX

L'un des buts de ma thèse était la recherche de nouveaux inhibiteurs de sPLA<sub>2</sub> hGV et hGX possédant de meilleurs  $IC_{50}$ . Trois approches ont été utilisées pour cela :

- étude de la relation structure/activité autour de **B.1** et **B.2**,
- analogie avec un inhibiteur puissant de type indole (création d'un pince à calcium),
- screening virtuel sur la sPLA<sub>2</sub> hGX

Lors de l'étude de relation structure/activité, de nouveaux lots de composés **B.1** et **B.2** ont été préparés et les tests enzymatiques réalisés avec ces nouveaux lots ont montré un manque de reproductibilité de l'activité inhibitrice. Ce manque d'activité a été confirmé par purification par HPLC préparative d'un échantillon de composé **B.1** datant de 2006. Néanmoins, 12 composés se sont révélés être des inhibiteurs modérés mais spécifiques des sPLA<sub>2</sub> hGV et hGX (**figure 4**).



**Figure 4** : composés actifs sur les sPLA<sub>2</sub> hGV et hGX

Les composés **C.1**, **D.1**, **D.2** et **D.3** sont les composés sélectionnés par simulation moléculaire.



<b><u>Chapitre I : Les inhibiteurs de phospholipases A<sub>2</sub> sécrétées</u></b>	<b>1</b>
<b>I. Les phospholipases A<sub>2</sub> sécrétées</b>	<b>2</b>
<b>I.1. Propriétés générales des phospholipases A<sub>2</sub> sécrétées</b>	<b>2</b>
<b>I.2. Rôles des sPLA<sub>2</sub></b>	<b>6</b>
<b>I.2.a. sPLA<sub>2</sub> et inflammation</b>	<b>7</b>
<b>I.2.b. sPLA<sub>2</sub> et athérosclérose</b>	<b>8</b>
<b>I.2.c. Rôle antibactérien et antiviral</b>	<b>9</b>
<b>I.2.d. Autres fonctions biologiques des sPLA<sub>2</sub></b>	<b>10</b>
<b>I.2.d.1 Digestion des phospholipides du bol alimentaire</b>	<b>10</b>
<b>I.2.d.2 Coagulation</b>	<b>10</b>
<b>I.2.d.3. Cancers</b>	<b>10</b>
<b>I.2.d.4. Rôle des sPLA<sub>2</sub> présentes dans l'épiderme</b>	<b>11</b>
<b>I.2.d.5. Reproduction</b>	<b>11</b>
<b>I.2.d.6. Autres processus biologiques dans lesquels sont impliqués les sPLA<sub>2</sub></b>	<b>11</b>
<b>I.3. Les récepteurs de sPLA<sub>2</sub></b>	<b>12</b>
<b>II. Les Inhibiteurs de sPLA<sub>2</sub></b>	<b>14</b>
<b>II.1. Analogues de phospholipides</b>	<b>15</b>
<b>II.1.a. Les inhibiteurs résistants à l'hydrolyse</b>	<b>15</b>
<b>II.1.b. Les inhibiteurs analogues de l'état de transition</b>	<b>18</b>
<b>II.1.c. Les inhibiteurs suicides</b>	<b>22</b>
<b>II.2. Les dérivés amides</b>	<b>24</b>
<b>II.2.a. FLP 67047XX et ses dérivés</b>	<b>24</b>
<b>II.2.b. les amides primaires</b>	<b>28</b>
<b>II.3. Les acides carboxyliques</b>	<b>29</b>
<b>II.4. les sulfonamides et les oxoamides</b>	<b>36</b>
<b>II.5. Les dérivés de type indole et indolizine</b>	<b>42</b>
<b>II.5.a. Indoles</b>	<b>42</b>
<b>II.5.b. Indolizines</b>	<b>47</b>
<b>II.6. Les inhibiteurs d'origine naturelle</b>	<b>49</b>
<b>II.6.a. Les inhibiteurs se liant de façon covalente à une Lysine de l'enzyme</b>	<b>49</b>
<b>II.6.b. Autres types d'inhibiteurs naturels</b>	<b>53</b>
<b>II.7. Les dérivés oxadiazolones</b>	<b>56</b>
<b>III. Conclusion</b>	<b>62</b>

<b><u>Chapitre II : Objectifs de la thèse</u></b>	<b>63</b>
<b>I. Contexte de la thèse</b>	<b>64</b>
<b>II. 1,3,5-triazépane-2,6-diones</b>	<b>66</b>
<b>II.1. Synthèse</b>	<b>66</b>
<b>II.2. Evaluation biologique des 1,3,5-triazépane-2,6-diones</b>	<b>67</b>
<b><u>Chapitre III : Création d'une chimiothèque de 1,3,5-triazépane-2,6-diones, mise au point de la synthèse en parallèle sur support solide</u></b>	<b>69</b>
<b>I. Travaux précédents</b>	<b>70</b>
<b>I.1. Synthèse en solution du squelette 1,3,5-triazépane-2,6-dione</b>	<b>70</b>
<b>I.2. Premiers essais de synthèse en parallèle du squelette 1,3,5-triazépane-2,6-dione</b>	<b>72</b>
<b>I.2.a. Synthèse sur support solide du squelette 1,3,5-triazépane-2,6-dione par réarrangement de Curtius d'un dipeptide</b>	<b>72</b>
<b>I.2.b. Création d'une chimiothèque de 1,3,5-triazépane-2,6-diones faisant appel au <i>réarrangement de Curtius</i> d'un acide <math>\alpha</math>-aminé</b>	<b>74</b>
<b>II. Synthèse en parallèle sur support solide de 1,3,5-triazépane-2,6-diones : utilisation du <i>réarrangement d'Hofmann</i></b>	<b>76</b>
<b>II.1. Obtention d'urées par <i>réarrangement d'Hofmann</i></b>	<b>78</b>
<b>II.2. Préparation d'une chimiothèque de dipeptide carboxamide <i>N</i>-protégés</b>	<b>79</b>
<b>II.2.a. Voie A : acides aminés commerciaux</b>	<b>79</b>
<b>II.2.b. Voie B : voie peptoïdique</b>	<b>89</b>
<b>II.3 Validation de la séquence réactionnelle</b>	<b>95</b>
<b>II.4. Chimiothèque de 1,3,5-triazépane-2,6-diones</b>	<b>101</b>
<b>II.5. Limitation de cette approche</b>	<b>110</b>
<b>III. Diversification post-cyclisation : création de chimiothèques de 1,3,5-triazépane-2,6-dione fonctionnalisées</b>	<b>114</b>
<b>III.1. Alkylation</b>	<b>114</b>
<b>III.2. Mise au point d'une synthèse parallèle de dérivés 1,3,5-triazépane-2,6-dione fonctionnalisés par une fonction amide</b>	<b>116</b>
<b>IV. Etudes structurales des composés de la chimiothèque</b>	<b>118</b>
<b>V. Conclusion</b>	<b>125</b>

<b><u>Chapitre IV : Analogues de 1,3,5-triazépane-2,6-dione présentant une fonction thiocarbonyle</u></b>	<b>127</b>
<b>I. Généralités à propos des thiocarbonyles</b>	<b>128</b>
<b>II. Synthèse du chassis 2-thioxo-1,3,5-triazépane-6-one : formation de la thiourée par cyclisation</b>	<b>130</b>
<b>II.1. Synthèse des thiourées dissymétriques</b>	<b>131</b>
<b>II.2. Synthèse de <i>cyclo</i>(Phe-<i>g</i>Sar-CS)</b>	<b>134</b>
<b>II.3. Comparaison de <i>cyclo</i>(Phe-<i>g</i>Sar-CS) et de <i>cyclo</i>(Phe-<i>g</i>Sar-CO)</b>	<b>136</b>
<b>II.3.a. comparaison par spectrométrie RMN</b>	<b>136</b>
<b>II.3.b. comparaison des structures cristallographiques</b>	<b>137</b>
<b>III. Thionation du squelette 1,3,5-triazépane-2,6-dione</b>	<b>141</b>
<b>III.1. Réactifs de thionation des carbonyles</b>	<b>141</b>
<b>III.2. Utilisation du réactif de Lawesson sur le squelette 1,3,5-triazépane-2,6-diones</b>	<b>144</b>
<b>III.3. Comparaison des structures cristallographiques des composés III.30 F et IV.32</b>	<b>151</b>
<b>IV. Conclusion</b>	<b>153</b>
<b><u>Chapitre V : Synthèse de cycles analogues aux 1,3,5-triazépane-2,6-diones à huit membres</u></b>	<b>155</b>
<b>I. Augmentation de taille de cycle</b>	<b>156</b>
<b>II. Cycle de type 1,3,6-triazocane-2,5-dione</b>	<b>158</b>
<b>III. Cycles de type 1,3,6-oxadiazocane-2,5-dione</b>	<b>167</b>
<b>IV. Conclusion</b>	<b>180</b>
<b><u>Chapitre VI : Evaluation biologique des 1,3,5-triazépane-2,6-diones</u></b>	<b>181</b>
<b>I. Travaux antérieurs : Criblage inverse et premières activités inhibitrices sur les sPLA<sub>2</sub>s</b>	<b>182</b>
<b>II. Activité inhibitrices des 1,3,5-triazépane-2,6-diones sur les sPLA<sub>2</sub> hGV et hGX</b>	<b>185</b>
<b>II.1. Evaluation biologique de composés issus des chimiothèques</b>	<b>185</b>

<b>II.1.a.</b> Composés issus de la chimiothèque de 1,3,5-triazépane-2,6-diones sans diversification post-cyclisation	185
<b>II.1.b.</b> Composés issus de la chimiothèque de 1,3,5-triazépane-2,6-dione <i>N</i> -monoalkylées : analogues du composé <b>III.30 F</b>	188
<b>II.2.</b> Optimisation de l'inhibition par introduction de groupements susceptibles de complexer le calcium des sites actifs des sPLA <sub>2</sub>	190
<b>II.2.a.</b> Analogues de <b>VI.6</b>	190
<b>II.2.b.</b> Evaluation biologique des analogues du composé <b>VI.6</b>	194
<b>II.2.c.</b> Création d'une pince sur l'urée des 1,3,5-triazépane-2,6-diones par <i>N,N'</i> -dialkylation	197
<b>II.2.c.1.</b> Dialkylation sélective	197
<b>II.2.c.2.</b> Introduction de la première chaîne carboxamide sur l'azote du résidu <i>gem</i> -diamino	202
<b>II.2.c.3.</b> fonctionnalisation du deuxième azote de l'urée	204
<b>II.2.d.</b> Essai de d'élaboration d'une pince sur l'urée des 1,3,5-triazépane-2,6-diones par réaction d'acylation	207
<b>II.2.e.</b> Evaluation biologique des composés conçus pour se lier au calcium	208
 <b>III. Comparaison des différents lots des composés III.30 F et VI.6</b>	210
<b>III.1.</b> Etude de la stabilité des hétérocycles	212
<b>III.2.</b> Identification des composés responsables de l'inhibition	214
 <b>IV. Etude structurale des sPLA<sub>2</sub> secrétées</b>	216
<b>IV.1.</b> Mise au point des conditions de cristallisation de la sPLA <sub>2</sub> hGX	216
<b>IV.2.</b> Structures de la sPLA <sub>2</sub> hGX sous forme apo	217
<b>IV.3.</b> Co-cristallisation de sPLA <sub>2</sub> hGX avec <b>VI.6</b>	219
 <b>V. Criblage virtuel sur la sPLA<sub>2</sub> hGX : recherche de nouveaux inhibiteurs de sPLA<sub>2</sub></b>	224
<b>V.1.</b> Généralités	224
<b>V.2.</b> Criblage de la chimiothèque de 1,3,5-triazépane-2,6-diones	225
<b>V.3.</b> Evaluation biologique des composés sélectionnés	227
 <b>VI. Conclusion</b>	228
 <b><u>Chapitre VII : Conclusion générale</u></b>	<b>231</b>
 Références	238
 <b><u>Partie expérimentale</u></b>	<b>249</b>



## Abréviations :

<b>%</b> : pourcent	<b>DMAP</b> : 4-diméthylaminopyridine
<b>°C</b> : degré celsius	<b>DMF</b> : diméthylformamide
<b>μM</b> : micromolaire	<b>DMSO</b> : diméthylsulfoxyde
<b>2D</b> : deux dimensions	<b>DPPA</b> : azoture de diphenylphosphoryle
<b>3D</b> : trois dimensions	<b>DSC</b> : carbonate de disuccinimide
<b>Ac</b> : acétate	<b>E. coli</b> : Escherichia coli
<b>ADN</b> : acide désoxyribonucléique	<b>ED<sub>50</sub></b> : dose effective
<b>Aib</b> : acide 2-aminoisobutyrique	<b>EDC</b> : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
<b>Ala</b> : alanine	<b>éq.</b> : équivalent
<b>Alloc</b> : allyloxycarbonyle	<b>ESI</b> : ionisation par électronébuliseur
<b>Arg</b> : arginine	<b>ESI-MS</b> : analyse de masse par ionisation par electrospray
<b>ASA</b> : analogue de substrat amide	<b>EST</b> : œstrogène sulfotransférase
<b>Asp</b> : acide aspartique	<b>Et</b> : éthyle
<b>Asp</b> : acide aspartique	<b>Fmoc</b> : fluorenylméthoxycarbonyle
<b>bGIB</b> : phospholipases A <sub>2</sub> du groupe IB d'origine bovine	<b>FT-IR</b> : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
<b>Bn</b> : benzyle	<b>GABA</b> : acide aminobutyrique
<b>Boc</b> : tertibutyloxycarbonyle	<b>GIB</b> : phospholipases A <sub>2</sub> du groupe IB
<b>BOP</b> : hexafluorophosphate de Benzotriazol-1-yloxy-tris(diméthylamino)-phosphonium	<b>GIIA</b> : phospholipases A <sub>2</sub> du groupe IIA
<b>BPI</b> : bactericidal permeability-increasing protein, protéine augmentant la perméabilité de la membrane des bactéries	<b>GIIC</b> : phospholipases A <sub>2</sub> du groupe IIC
<b>Bu</b> : butyle	<b>GIID</b> : phospholipases A <sub>2</sub> du groupe IID
<b>CCM</b> : chromatographie sur couche mince	<b>GIIE</b> : phospholipases A <sub>2</sub> du groupe IIE
<b>CD</b> : dichroïsme circulaire	<b>GIIF</b> : phospholipases A <sub>2</sub> du groupe IIF
<b>CDI</b> : 1,1'-Carbonyldiimidazole	<b>GIII</b> : phospholipases A <sub>2</sub> du groupe III
<b>Cha</b> : cyclohexylalanine	<b>Glu</b> : acide glutamique
<b>Chg</b> : cyclohexylglycine	<b>Gly</b> : glycine
<b>cHx</b> : cyclohexyle	<b>GP</b> : groupe protecteur
<b>cm<sup>-1</sup></b> : par centimètre	<b>GV</b> : phospholipases A <sub>2</sub> du groupe V
<b>COSY</b> : Spectroscopie de corrélation	<b>GX</b> : phospholipases A <sub>2</sub> du groupe X
<b>cPLA<sub>2</sub></b> : phospholipases A <sub>2</sub> cytosoliques	<b>GXIIA</b> : phospholipases A <sub>2</sub> du groupe XIIA
<b>cPLA<sub>2</sub>α</b> : phospholipases A <sub>2</sub> cytosoliques de type α	<b>GXIIB</b> : phospholipases A <sub>2</sub> du groupe XIIB
<b>CRD</b> : carbohydrates	<b>h</b> : heure
<b>CTLD</b> : C-lectines	<b>HDL</b> : lipoprotéines de haute densité
<b>Cys</b> : cystéine	<b>HFIP</b> : Hexafluoroisopropanol
<b>D</b> : debye	<b>hGIB</b> : phospholipases A <sub>2</sub> du groupe IB d'origine humaine
<b>DBU</b> : 1,8-Diazabicyclo-(5,4,0)-undec-7-ène	<b>hGIIA</b> : phospholipases A <sub>2</sub> du groupe IIA d'origine humaine
<b>DIC</b> : <i>N,N'</i> -diisopropylcarbodiimide	<b>hGIIC</b> : phospholipases A <sub>2</sub> du groupe IIC d'origine humaine
<b>DIEA</b> : <i>N,N</i> -diisopropyléthylamine	<b>hGIID</b> : phospholipases A <sub>2</sub> du groupe IID d'origine humaine

**hGIIE** : phospholipases A<sub>2</sub> du groupe IIE d'origine humaine  
**hGIIF** : phospholipases A<sub>2</sub> du groupe IIF d'origine humaine  
**hGIII** : phospholipases A<sub>2</sub> du groupe III d'origine humaine  
**hGIV** : phospholipases A<sub>2</sub> du groupe IV d'origine humaine  
**hGV** : phospholipases A<sub>2</sub> du groupe V d'origine humaine  
**hGX** : phospholipases A<sub>2</sub> du groupe X d'origine humaine  
**hGXIIA** : phospholipases A<sub>2</sub> du groupe XIIA d'origine humaine  
**hGXIIIB** : phospholipases A<sub>2</sub> du groupe XIIIB d'origine humaine  
**His** : histidine  
**HMDO** : hexaméthylsiloxane  
**HOBt** : *N*-hydroxybenzotriazole  
**HOSu** : *N*-hydroxysuccinimide  
**HPLC** : chromatographie liquide à haute performance  
**IBCF** : chloroformiate d'isobutyle  
**iBu** : isobutyle  
**IC<sub>50</sub>** : concentration inhibitrice médiane  
**Ile** : isoleucine  
**iPLA<sub>2</sub>** : phospholipases A<sub>2</sub> indépendantes du calcium  
**Ka** : constante d'association  
**Kd** : constante de dissociation  
**kDa** : kilodalton  
**kg** : kilogramme  
**Ki** : constante d'inhibition  
**LDL** : lipoprotéines de basse densité  
**Leu** : leucine  
**IGIIA** : phospholipases A<sub>2</sub> du groupe IIA du lapin  
**LiHMDS** : Bis(triméthylsilyl)amidure de lithium  
**LPPLA<sub>2</sub>** : phospholipases A<sub>2</sub> lysosomales  
**Lys** : lysine  
**MA** : méthionine aminopeptidase  
**Me** : méthyle  
**mg** : milligramme  
**mGIB** : phospholipases A<sub>2</sub> du groupe IB d'origine murine

**mGIIA** : phospholipases A<sub>2</sub> du groupe IIA d'origine murine  
**mGIIC** : phospholipases A<sub>2</sub> du groupe IIC d'origine murine  
**mGIID** : phospholipases A<sub>2</sub> du groupe IID d'origine murine  
**mGIIE** : phospholipases A<sub>2</sub> du groupe IIE d'origine murine  
**mGIIF** : phospholipases A<sub>2</sub> du groupe IIF d'origine murine  
**mGIII** : phospholipases A<sub>2</sub> du groupe III d'origine murine  
**mGV** : phospholipases A<sub>2</sub> du groupe V d'origine murine  
**mGX** : phospholipases A<sub>2</sub> du groupe X d'origine murine  
**mGXIIA** : phospholipases A<sub>2</sub> du groupe XIIA d'origine murine  
**MHz** : méga Hertz  
**MIC** : concentration minimale d'inhibition  
**min** : minute  
**mL** : millilitre  
**mM** : millimolaire  
**Mol** : molaire  
**MPD** : 2-Méthyl-2,4-Pentanediol  
**NaHMDS** : Bis(triméthylsilyl)amidure de sodium  
**NBS** : *N*-bromosuccinimide  
**nm** : nanomètre  
**nM** : nanomolaire  
**NMM** : *N*-méthylmorpholine  
**NOESY** : nuclear overhauser effect spectroscopy  
**Oic** : acide octahydro-1H-indole-3-carboxylique  
**Orn** : ornithine  
**PAF** : facteur d'activation plaquettaire  
**PAF-AH** : PAF acétylhydrolases  
**PC** : phosphatidylcholine  
**PDB** : Protein Data Bank  
**PE** : phosphatidyléthanolamine  
**PEG** : polyéthylène glycol  
**pGIB** : phospholipases A<sub>2</sub> du groupe IB d'origine porcine  
**Ph** : phényle  
**Phe** : phenylalanine  
**PIFA** : bis(trifluoroacétoxy)-iodobenzène

**Pip** : acide pipécolique  
**PLA<sub>2</sub>** : phospholipases A<sub>2</sub>  
**PM** : Petrosaspongiolide M  
**PNP** : purine nucléoside phosphorylase  
**ppm** : partie par million  
**Pro** : proline  
**PS** : polystyrène  
**PS-DIPAM** : diisopropylaminométhyle supportée sur du polystyrène  
**PS-IIDQ** : *N*-isobutoxycarbonyl-2-isobutoxy-1,2-dihydroquinoléine supportée sur du polystyrène  
**PS-oxime** : résine Oxime  
**PS-SuOH** : *N*-hydroxysuccinimide supporté par du polystyrène  
**quant.** : quantitatif  
**rdt** : rendement  
**rGIIA** : phospholipases A<sub>2</sub> du groupe IIA du rat  
**RMN** : Résonance magnétique nucléaire  
**ROESY** : rotating frame overhauser effect spectroscopy  
**RPE**: résonance paramagnétique électronique  
**s** : seconde  
**Sar** : sarcosine  
**SDRA** : syndrome de détresse respiratoire aigu  
**Ser** : sérine  
**SIBLINKS** : Suicide-Inhibitory Bifunctionally LINKed Substrats  
**sPLA<sub>2</sub>** : phospholipases A<sub>2</sub> secrétées  
**t<sub>1/2</sub>** : temps de demi-vie  
**TA** : température ambiante  
**tBu** : tertbutyle  
**TEA** : triéthylamine  
**TFA** : acide trifluoroacétique  
**THF** : tétrahydrofurane  
**Thr** : thréonine  
**Tic** : acide 1,2,3,4-tétrahydroisoquinoléine-3-carboxylique  
**TK** : thymidine kinase  
**Tos** : tosyle  
**Tris** : trishydroxyméthylaminométhane  
**Trp** : tryptophane  
**TSA** : analogue de l'état de transition  
**UV** : ultra-violet

**Val** : valine  
**V<sub>hydrolyse</sub>** : vitesse d'hydrolyse  
**VIH-1** : virus de l'immunodéficience humaine de type I  
**wt** : masse  
**Xaa** : acide aminé  
**Xbb** : acide aminé  
**Z** : benzyloxycarbonyle  
**X<sub>1</sub>(50)** : fraction molaire inhibant 50% de la protéine

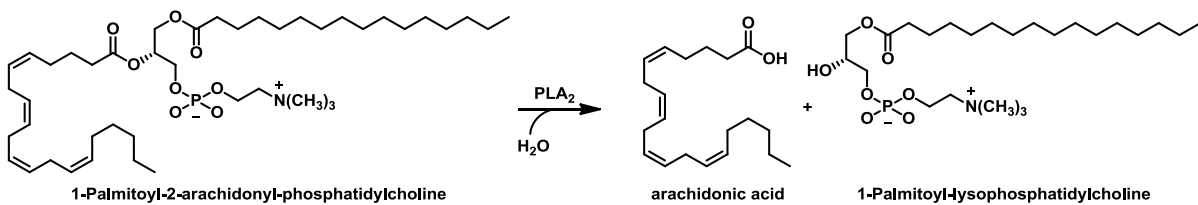


## Chapitre I : Introduction bibliographique

### Les inhibiteurs de phospholipases A<sub>2</sub> sécrétées

## I. Les phospholipases A<sub>2</sub> sécrétées

Les phospholipases A<sub>2</sub> constituent une famille d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse des phospholipides en position *Sn*-2. Lors de cette hydrolyse, un acide gras (par exemple : l'acide arachidonique) et un lysophospholipide (par exemple : le 1-palmitoyl-lysophosphatidylcholine) sont libérés dans le milieu (**figure I.1**).



**Figure I.1** : Réaction catalysée par les PLA<sub>2</sub>

Il existe cinq classes de phospholipases A<sub>2</sub> : les PLA<sub>2</sub> sécrétées (sPLA<sub>2</sub>), les PLA<sub>2</sub> cytosoliques (cPLA<sub>2</sub>), les PLA<sub>2</sub> indépendantes du calcium (iPLA<sub>2</sub>), les PAF acétylhydrolases (PAF-AH, PAF est le facteur d'activation plaquettaire, c'est un type de phosphoglycérines) et les PLA<sub>2</sub> lysosomales (LPPLA<sub>2</sub>). Les phospholipases A<sub>2</sub> sécrétées ainsi qu'une phospholipase acétylhydrolase (PAF du groupe VII, Lp-pLA<sub>2</sub>) sont des enzymes présentes dans le milieu extracellulaire tandis que les autres phospholipases sont des enzymes intracellulaires.

### I.1. Propriétés générales des phospholipases A<sub>2</sub> sécrétées

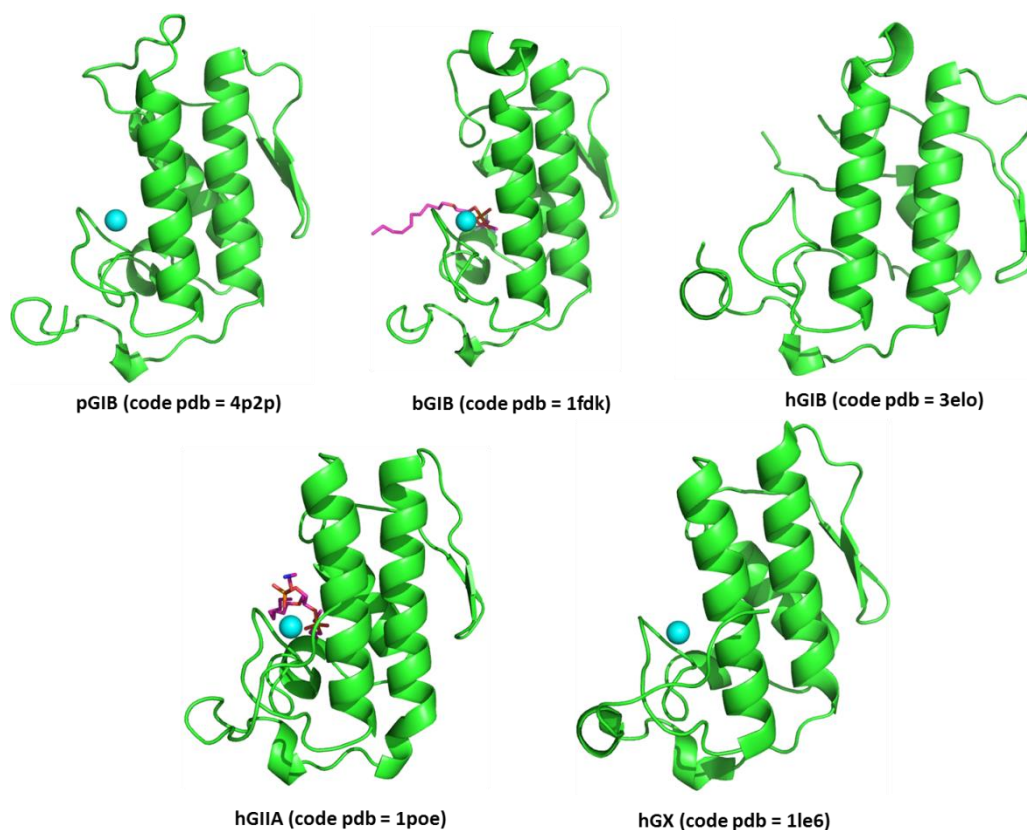
Les sPLA<sub>2</sub> sont présentes chez les mammifères, les bactéries, les virus, les plantes ainsi que dans les venins. Le génome humain possède onze gènes codant pour onze isoformes de sPLA<sub>2</sub> dont deux sont inactives. Ce sont des protéines de faible poids moléculaire, riches en ponts disulfure et dont la localisation dans les différents tissus varie selon l'isoforme (**tableau I.1**).<sup>1</sup>

Groupe de sPLA <sub>2</sub>	Poids moléculaire	Nb de ponts disulfure	Prop. Mol.	Expression tissulaire
<b>IB</b>	14.1 kDa	7	active	sécrétion pancréatique, poumon, foie, rate, ovaire, rein, cerveau
<b>IIA</b>	13.9 kDa	7	active	muqueuse intestinale, cellules des glandes lacrymales, cellules épithéliales de la prostate
<b>IIC</b>	14.6 kDa	8	Pseudo-gène	testicules
<b>IID</b>	14.3 kDa	7	active	pancréas, rate, thymus, peau, poumon, ovaire
<b>IIE</b>	13.9 kDa	7	active	glandes thyroïdiennes, utérus, embryon
<b>IIF</b>	16.8 kDa	7	active	placenta, testicules, thymus, foie, rein
<b>III</b>	16 kDa <sup>a</sup>	5	active	rein, cœur, foie, muscle, placenta, leucocytes
<b>V</b>	13.8 kDa	6	active	cœur, yeux, pancréas, macrophage, neutrophiles, mastocytes
<b>X</b>	13.6 kDa	8	active	intestins, poumons, testicules, estomac, neutrophiles, macrophages
<b>XIIA</b>	18.7 kDa	7	active	cœur, muscles, rein, pancréas
<b>XIIB</b>	19,7 kDa	7	inactive	foie, rein, muscles, cœur
<b>Otoconine-95</b>	90-95 kDa		inactive	oreille interne

<sup>a</sup> précurseur de 55 kDa

**Tableau I.1** : caractéristiques des sPLA<sub>2</sub> humaines

Certaines protéines telles que la sPLA<sub>2</sub> IB du porc<sup>2</sup> (pGIB), la GIB<sup>3</sup> des bovidés (bGIB), ainsi que les sPLA<sub>2</sub> des groupes IB<sup>4</sup> (hGIB), IIA<sup>5</sup> (hGIIA) et X<sup>6</sup> (hGX) humaines ont pu être cristallisées et leurs structures ont été analysées par diffraction aux rayons X (**figure I.2**). Les protéines bGIB et hGIIA ont été co-cristallisées avec un phospholipide tandis que les autres sont présentées sans ligands.



**Figure I.2** : structures cristallographiques de différentes sPLA<sub>2</sub> de mammifères, le calcium est représenté par une sphère bleue et lorsqu'il est présent, le ligand est en rose.

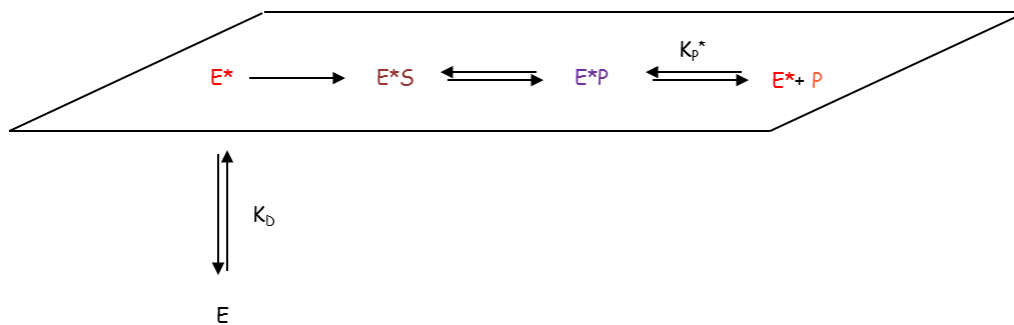
D'après les structures cristallographiques présentées à la **figure I.2**, les structures des sPLA<sub>2</sub> des groupes I, II et X sont très semblables.

L'utilisation de ces données cristallographiques ainsi que l'alignement des séquences ont permis de démontrer que les sPLA<sub>2</sub> des groupes IB (GIB), IIA (GIIA), IIC (GIIC), IID (GIID), IIE (GIIIE), IIF (GIIF), V (GV), et X (GX) partageaient une structure semblable. La sPLA<sub>2</sub> III (hGIII) est quant-à-elle différente mais elle partage des ressemblances avec la sPLA<sub>2</sub> III du venin d'abeille. De même, la sPLA<sub>2</sub> XIIA (hGXIIA) a également une structure différente des autres sPLA<sub>2</sub> humaines. En revanche, même si elles ont des structures 3D différentes, les sPLA<sub>2</sub> partagent une structure commune en ce qui concerne le site actif, ce dernier comprend une dyade catalytique formée d'une histidine et d'un acide aspartique ainsi qu'un ion calcium.

Les sPLA<sub>2</sub> sont des enzymes interfaciales.<sup>7</sup> Elles doivent d'abord interagir avec les phospholipides organisés en micelles ou en bicouches lipidiques (par exemple des



membranes cellulaires) puis ensuite, seulement, elles peuvent hydrolyser un phospholipide (**figure I.3**).



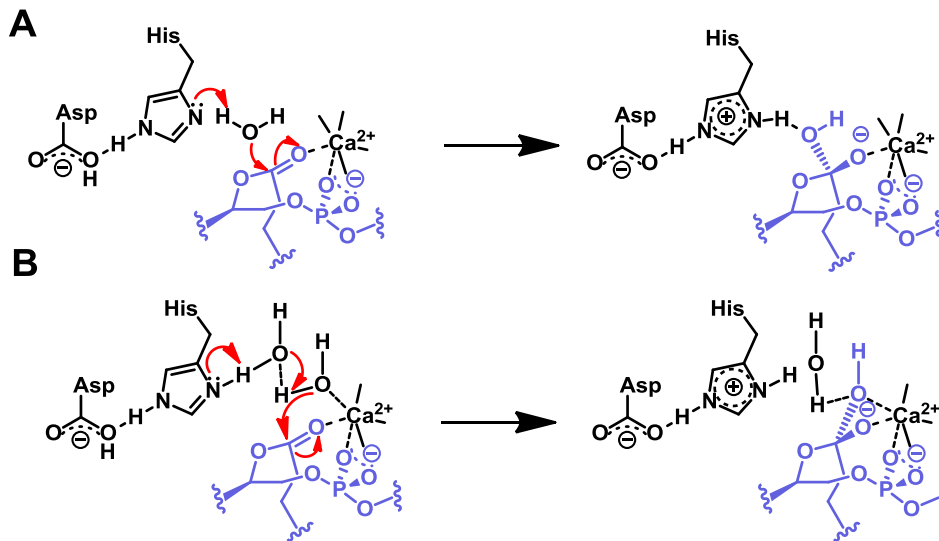
**Figure I.3** : Modèle de cinétique interfaciale

La première étape de l'hydrolyse consiste en l'adsorption de l'enzyme E à l'interface lipidique (représentée par un parallépipède sur la **figure I.3**) donnant la forme activée E\*. Ensuite, le complexe E\*S est obtenu par diffusion du phospholipide-substrat S dans le site actif de l'enzyme où l'hydrolyse a lieu (E\*P) formant ainsi les produits P qui sont libérés dans le milieu.<sup>8</sup>

L'interaction entre l'enzyme et la surface lipidique se fait par l'intermédiaire d'un domaine de liaison (~15 acides aminés) qui est différent du site actif. La surface de contact entre la sPLA<sub>2</sub> et la membrane est de l'ordre de 20 à 40 phospholipides.<sup>9</sup> Des études RPE (résonance paramagnétique électronique) réalisées sur la sPLA<sub>2</sub> GIII du venin d'abeille et sur la GIIA de l'humain ont révélé que les interactions entre la sPLA<sub>2</sub> et la membrane n'étaient pas dues à des interactions de Van der Waals mais aux chaînes latérales des acides aminés (tryptophane, lysine et arginine) de l'enzyme qui peuvent s'immiscer à l'intérieur de la couche de phospholipides.<sup>10</sup>

La spécificité enzymatique des sPLA<sub>2</sub> vient de leur capacité à s'adsorber fortement ou non à la surface lipidique. En effet, les sPLA<sub>2</sub> n'ont pas la même affinité pour les différents types de phospholipides. En général, les sPLA<sub>2</sub> hydrolysent de façon préférentielle les phospholipides anioniques à l'exception des sPLA<sub>2</sub> GV et GX qui hydrolysent quasiment aussi bien les phospholipides anioniques que zwitterioniques.<sup>11</sup>

Le mécanisme catalytique des sPLA<sub>2</sub> a pu être mis en évidence grâce à l'étude structurale par diffraction des rayons X de plusieurs sPLA<sub>2</sub> ainsi que par la conservation des caractéristiques du site actif. Le mécanisme catalytique requiert la présence de la dyade acide aspartique/histidine et de l'ion calcium. Deux mécanismes d'hydrolyse très semblables ont été proposés, le premier fait intervenir une molécule d'eau<sup>12</sup> (**figure I.4, A**) tandis que le second fait intervenir deux molécules d'eau (**figure I.4, B**).<sup>13</sup>



**Figure I.4** : mécanismes catalytiques proposés

Les deux mécanismes proposés mettent en évidence le rôle clé de la dyade acide aspartique/histidine qui déprotonne une molécule d'eau. Selon le mécanisme A, cette molécule d'eau attaque le carbonyle du substrat donnant un oxyanion qui est stabilisé par le calcium. Dans le mécanisme B, la molécule d'eau déprotonée par l'imidazole attaque une autre molécule d'eau qui va réaliser l'attaque nucléophile sur le carbonyle. A l'heure actuelle, aucun des deux mécanismes n'est privilégié.

## I.2. Rôles des sPLA<sub>2</sub>

Les sPLA<sub>2</sub> possèdent des activités enzymatiques spécifiques<sup>11a</sup> et des distributions tissulaires qui leur sont propres. Ces deux éléments suggèrent que chaque enzyme exerce une fonction distincte.

### I.2.a. sPLA<sub>2</sub> et inflammation

L'inflammation est une réaction tissulaire normale face aux agressions telles que les infections bactériennes, les traumatismes physiques, les corps étrangers, etc...

L'inflammation peut être *aigüe*, c'est-à-dire de courte durée et qui tend à guérir naturellement ou bien *chronique*, c'est-à-dire dont la guérison n'est pas spontanée et qui évolue en persistant ou en s'aggravant donnant des pathologies telles que l'athérosclérose, l'arthrite rhumatoïdale...

Plusieurs sPLA<sub>2</sub> jouent un rôle dans l'inflammation par la production d'acide arachidonique qui est le précurseur des icosanoïdes. La sPLA<sub>2</sub> hGIIA est présente en grande quantité dans le fluide synovial de patients atteints d'arthrite rhumatoïdale<sup>14</sup> de même que la sPLA<sub>2</sub> hGV mais en quantité plus faible.<sup>15</sup> Le rôle des sPLA<sub>2</sub> lors du processus inflammatoire n'est pas encore connu.

Plusieurs études ont démontré une coopération entre hGIIA et la cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  pour la production d'acide arachidonique.<sup>16</sup> Cette coopération rend difficile la compréhension du rôle précis de chaque enzyme dans le processus inflammatoire. De plus, les sPLA<sub>2</sub> sont des enzymes sécrétées qui devraient donc agir depuis le milieu extracellulaire sur la membrane plasmique. Cependant, ces enzymes pourraient également agir pendant leur sécrétion et hydrolyser les membranes intracellulaires.<sup>16a</sup> Il est difficile à l'heure actuelle de confirmer ces hypothèses *in-vivo*. Inversement, d'après Boilard et *coll.* la sPLA<sub>2</sub> hGV pourrait jouer un rôle anti-inflammatoire.<sup>17</sup>

Le rôle des sPLA<sub>2</sub> dans des maladies inflammatoires pulmonaires telles que l'asthme ou le syndrome de détresse respiratoire aigu (SDRA) a également été étudié.

Le syndrome de détresse respiratoire aigu est une pathologie inflammatoire qui conduit à la dégradation du surfactant pulmonaire et donc à un défaut respiratoire sévère. Une augmentation de la concentration de sPLA<sub>2</sub> a été détectée dans des lavages broncho-alvéolaires de patients atteints de cette maladie et cette augmentation est corrélée à la sévérité de la pathologie.<sup>18</sup> Le rôle principal des sPLA<sub>2</sub> lors du SDRA est vraisemblablement l'hydrolyse des phospholipides du surfactant pulmonaire,<sup>19</sup> en effet, une concentration accrue de lysophosphatidylcholine a été détectée dans les lavages broncho-alvéolaires des patients atteints de SDRA.

La deuxième pathologie pulmonaire dans laquelle les sPLA<sub>2</sub> semblent jouer un rôle est l'asthme. Des études ont montré que des souris transgéniques n'exprimant pas la sPLA<sub>2</sub> GX présentaient une réponse inflammatoire diminuée après exposition à des allergènes par rapport aux souris non modifiées.<sup>20</sup> Néanmoins, d'autres sPLA<sub>2</sub> pourraient également être impliquées dans cette pathologie comme la GV<sup>21</sup> et la GXIIA.<sup>22</sup>

### **1.2.b. sPLA<sub>2</sub> et athérosclérose**

L'athérosclérose se caractérise par la formation de plaques à l'intérieur des artères conduisant à leur obstruction.

Quatre sPLA<sub>2</sub> sont connues pour leur rôle dans cette pathologie : hGIIA, hGIII, hGV et hGX.<sup>23,24</sup> Ces protéines contribuent à l'athérosclérose de plusieurs façons :

- 1) par production de médiateurs lipidiques pro-inflammatoires (prostaglandines, thromboxanes, leucotriènes et lysophospholipides),<sup>25</sup>
- 2) par hydrolyse des lipoprotéines entraînant la production des molécules pro-inflammatoires et de lipoprotéines modifiées pro-athérogènes,
- 3) en modifiant les processus inflammatoires à partir de différentes cellules du tissu vasculaire.

La première sPLA<sub>2</sub> mise en cause pour son rôle de l'athérosclérose est la sPLA<sub>2</sub> hGIIA. Différentes études cliniques ont montré un lien entre expression de hGIIA et maladies cardio-vasculaires.<sup>26</sup> Ces constatations ont été confirmées par l'étude de souris transgéniques surexprimant cette enzyme.<sup>27</sup> En effet, ces souris ont développé plus de lésions athérosclérotiques que les souris de contrôle. Mais l'hypothèse de la seule implication de hGIIA dans l'athérosclérose est remise en cause par la découverte dans les lésions des sPLA<sub>2</sub> GV et GX. Ces deux enzymes hydrolysent bien plus facilement les lipoprotéines de basse densité (LDL) et lipoprotéines de haute densité (HDL) que la sPLA<sub>2</sub> GIIA.<sup>28</sup> Or, l'hydrolyse de ces lipoprotéines est un élément clé du développement de l'athérosclérose. Le rôle de la sPLA<sub>2</sub> GIIA dans cette pathologie est donc à l'heure actuelle encore mal compris. Par hydrolyse des LDL et HDL, les sPLA<sub>2</sub> GV et GX participent à la formation des cellules spumeuses (macrophages saturés de gouttelettes de graisse) qui s'accumulent dans la paroi vasculaire formant ainsi la plaque d'athérome.<sup>28a, 29</sup>

### I.2.c Rôle antibactérien et antiviral

L'action antibactérienne de la sPLA<sub>2</sub> GIIA est sa fonction biologique la mieux documentée. Il a été démontré que la sPLA<sub>2</sub> GIIA peut éliminer les bactéries Gram-positives tel que le staphylocoque doré<sup>30</sup> ainsi que les bactéries Gram-négatives tel que *Escherichia coli*.<sup>31</sup> Une forte concentration de cette protéine est présente dans le sérum de patients infectés par une bactérie. Le taux de sPLA<sub>2</sub> hGIIA est 500 fois plus important chez les patients infectés que chez les sujets sains.<sup>32</sup> De plus, une étude a montré que des souris transgéniques surexprimant la sPLA<sub>2</sub> GIIA sont résistantes au staphylocoque doré, à *E. coli* et à l'anthrax,<sup>33</sup> cette enzyme participe également à l'élimination des bactéries de l'organisme.<sup>34</sup>

Le mécanisme d'action de la sPLA<sub>2</sub> GIIA contre les bactéries Gram-positives s'effectue en deux étapes. Premièrement, l'enzyme diffuse au travers de la paroi bactérienne par interactions électrostatiques entre la paroi polyanionique de la bactérie et la surface basique de la sPLA<sub>2</sub> puis deuxièmement, la sPLA<sub>2</sub> hydrolyse la membrane.<sup>35</sup> Concernant les bactéries Gram-négatives dont l'enveloppe cellulaire est constituée de lipopolysaccharides, l'intervention d'une autre protéine est nécessaire (telle que la BPI ou bactericidal permeability-increasing protein) pour permettre à la sPLA<sub>2</sub> de pénétrer la paroi bactérienne.<sup>36</sup> Les autres sPLA<sub>2</sub> possèdent également une activité antibactérienne mais plus faible que celle de la sPLA<sub>2</sub> GIIA, un classement a d'ailleurs pu être établi : GIIA > GX > GV > GXIIA > GIIE > GIB, GIIF.<sup>35b</sup>

Certaines sPLA<sub>2</sub> de venins et de mammifères possèdent aussi des propriétés antivirales et anti-parasitaires. Par exemple, les sPLA<sub>2</sub> GIII, GV et GX sont capables d'éviter l'infection d'une cellule par un adénovirus<sup>37</sup> en inhibant l'entrée de l'adénovirus dans les endosomes en ce qui concerne GV et GX<sup>37a</sup> ou en dégradant la membrane du virus dans le cas de GIII.<sup>37b</sup> Les sPLA<sub>2</sub> hGIII et hGX peuvent également inhiber l'infection par le VIH.<sup>38</sup> Une activité antiparasitaire a également été évoquée concernant le parasite responsable du paludisme. Les sPLA<sub>2</sub> issues du venin de serpent ou d'abeille bloquent le développement du parasite *Plasmodium falciparum* dans les globules rouges.<sup>39</sup> Néanmoins, une étude *in-vivo* est nécessaire pour confirmer cette hypothèse.

## **I.2.d. Autres fonctions biologiques des sPLA<sub>2</sub>**

### **I.2.d.1. Digestion des phospholipides du bol alimentaire**

La sPLA<sub>2</sub> hGIB est présente en grande quantité dans le suc pancréatique. L'étude de souris n'exprimant pas cette sPLA<sub>2</sub> pancréatique a permis de montrer son rôle lors de la digestion des phospholipides du bol alimentaire, avec un rôle exacerbé lorsque le régime est riche en lipides.<sup>40</sup>

Il semblerait que d'autres sPLA<sub>2</sub> (GIIA, GIID, GIIE, GIIF, GV et GX) également sécrétées dans l'appareil digestif participent à cette fonction.

### **I.2.d.2. Coagulation**

Plusieurs sPLA<sub>2</sub> de mammifères ou issues des venins ont montré une activité anticoagulante. Les sPLA<sub>2</sub> possédant des résidus basiques à leurs surfaces telle que GIIA, inhibent la formation du complexe prothrombinase (complexe enzymatique formé à la surface des plaquettes composé d'une enzyme, le facteur Xa; d'un cofacteur, le Va et de phospholipides) par fixation de l'enzyme sur le facteur Xa.<sup>41</sup> Cet effet est indépendant de l'activité catalytique des sPLA<sub>2</sub>. En revanche, les sPLA<sub>2</sub> plus acides telle que GX inhibent la coagulation par un processus faisant intervenir l'hydrolyse des phospholipides.<sup>1b</sup>

### **I.2.d.3. Cancers**

Une surexpression de hGIIA a été remarquée chez les patients atteints de différents cancers dont celui de la prostate<sup>42</sup> ou bien du côlon<sup>43</sup> avec une augmentation du taux de hGIIA en fonction de la taille de la tumeur. D'autres sPLA<sub>2</sub> telles que GIB, GX et GIII sont également présentes et impliquées dans le processus de cancérogenèse. Le rôle des sPLA<sub>2</sub> dans le développement des cancers n'est pas clairement défini, il se peut que ces enzymes favorisent la formation de tumeurs ou bien au contraire aient une action anti-cancéreuse.<sup>44</sup>

#### **1.2.d.4. Rôle des sPLA<sub>2</sub> présentes dans l'épiderme**

Les sPLA<sub>2</sub> pourraient également être impliquées dans la physiologie ainsi que certaines pathologies de la peau. Les sPLA<sub>2</sub> GIB, GIIA, GIID, GIIF, GIII, GV et GX, sont exprimées dans les différentes couches de la peau chez l'homme et la souris.<sup>45</sup> Les sPLA<sub>2</sub> joueraient un rôle dans l'intégrité de la barrière lipidique ainsi que dans le processus de photo-protection. Des souris transgéniques surexprimant la GIIA ont développé plusieurs pathologies (par exemple le psoriasis) et sont devenues plus sensibles aux agents cancérogènes.<sup>24a</sup>

#### **1.2.d.5. Reproduction**

Les sPLA<sub>2</sub> GIII et GX jouent un rôle au cours de la reproduction notamment en ce qui concerne la fertilité masculine. L'enzyme GIII est liée à la maturation des spermatozoïdes<sup>46</sup> alors que GX est active lors de la rencontre entre le spermatozoïde et l'ovule.<sup>47</sup> L'étude de souris mâles transgéniques n'exprimant pas la sPLA<sub>2</sub> GIII ou bien la sPLA<sub>2</sub> GX a montré une baisse de la fertilité de ces dernières.<sup>46-47</sup> D'autres sPLA<sub>2</sub> sont également exprimées dans différentes cellules de l'appareil reproducteur masculin suggérant ainsi des fonctions distinctes. Cependant des travaux complémentaires sont encore nécessaires.

#### **1.2.d.6 Autres processus biologiques dans lesquels sont impliqués les sPLA<sub>2</sub>**

Les sPLA<sub>2</sub> GIIA, GV et GX sont impliquées dans des maladies cardiovasculaires. Des souris transgéniques n'exprimant pas GV ou GX ont montré une résistance aux maladies cardiovasculaires ainsi qu'une diminution de la production d'icosanoïdes.<sup>48</sup> De même, l'étude de souris ayant subi une mutation sur le gène exprimant GIIA a montré le rôle pro-inflammatoire de cette dernière lors des pathologies cardiovasculaires.<sup>49</sup>

Les sPLA<sub>2</sub> auraient également une action sur le système nerveux central. En effet, la GIIA et la GX jouent un rôle lors de la production des neurotransmetteurs, de la neurogénèse, de l'apoptose neuronale, de la douleur et de plus, elles pourraient jouer un rôle dans des

maladies telles que l'ischémie (diminution de l'apport sanguin artériel à un organe), des scléroses multiples, ou encore la maladie d'Alzheimer.<sup>1b</sup>

Les activités biologiques des sPLA<sub>2</sub> sont souvent dues à l'hydrolyse des phospholipides mais pas toutes, certaines fonctions feraient intervenir des récepteurs de sPLA<sub>2</sub>. L'induction de la dégranulation (libération de molécules cytotoxiques à partir de vésicules situés à l'intérieur des cellules), la production de cytokines (protéines prenant part à la signalisation cellulaire), l'exocytose (libération de larges molécules) ou encore des effets sur la prolifération ou la survie des cellules font partie des fonctions biologiques des sPLA<sub>2</sub> qui ne requièrent pas d'hydrolyse catalytique.<sup>1b</sup>

### **I.3. Les récepteurs de sPLA<sub>2</sub>**

Pendant longtemps, les activités biologiques des sPLA<sub>2</sub> ont été considérées comme étant uniquement dues à l'hydrolyse des phospholipides membranaires. Cette certitude a été remise en question par la découverte de phospholipases A<sub>2</sub> sécrétées issues de venins myotoxiques mais inactives d'un point de vue catalytique (par mutation d'un acide aminé du site actif).<sup>50</sup> De plus, il y a une vingtaine d'années, Kini et Evans ont mis en évidence l'interaction entre des phospholipases A<sub>2</sub> et des cellules cibles qui sont différentes des phospholipides.<sup>50a</sup> Ces découvertes ont amené l'hypothèse de l'existence de récepteurs de sPLA<sub>2</sub>, lesquels ont été identifiés pour la première fois en utilisant la neurotoxine OS<sub>2</sub> du venin du serpent australien Taïpan comme ligand.<sup>51</sup>

Le premier de ces récepteurs a été appelé N car il est présent en grande quantité sur les cellules neuronales. Il semble également présent dans d'autres tissus tels que le cœur, les poumons, et les reins.<sup>52</sup> Les sPLA<sub>2</sub> neurotoxiques issues de venin comme la taïpoxine, la crotoxine et la notexine ont une très grande affinité pour les récepteurs de type N alors que ce n'est pas le cas pour les sPLA<sub>2</sub> non-neurotoxiques comme OS<sub>1</sub>. Ces observations semblent indiquer un lien entre la neurotoxicité des sPLA<sub>2</sub> des venins et les récepteurs de type N.<sup>51b</sup> Les récepteurs N n'ont pas encore été clonés, de ce fait, leurs structures moléculaires, leurs ligands endogènes ou encore leurs rôles physiologiques sont inconnus, néanmoins, certaines

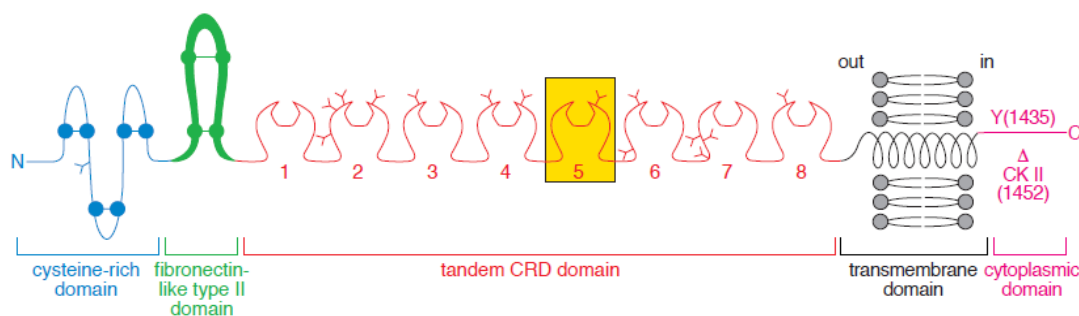


caractéristiques ont été mis en évidence. Par exemple, la liaison de l'enzyme au récepteur nécessite la présence de calcium mais en quantité plus faible que pour l'activité catalytique des sPLA<sub>2</sub>.<sup>51b</sup> De plus des mutations effectuées sur la sPLA<sub>2</sub> de venin d'abeille ont permis d'identifier trois zones intervenant lors de la liaison enzyme-récepteur : le domaine d'interaction entre l'enzyme et la surface lipidique, le canal hydrophobe et la boucle de calcium.<sup>53</sup>

Le deuxième type de récepteur a été identifié sur les cellules de muscle squelettique de lapin<sup>51c</sup> et a donc été nommé récepteur de type M. Néanmoins, ce récepteur est également exprimé dans d'autres tissus (poumon, foie, rein). Le récepteur de type M est très différents de celui de type N. En effet, il peut lier à la fois les sPLA<sub>2</sub> toxiques et non toxiques (telles que OS<sub>1</sub> ou encore la GIB du porc). De plus, la réaction de liaison entre la sPLA<sub>2</sub> et le récepteur M est indépendante du calcium.

Des mutations réalisées sur la sPLA<sub>2</sub> pancréatique du porc (GIB) ont montré que seules les modifications ayant eu lieu à proximité de la boucle de calcium diminuent de façon drastique l'affinité de la sPLA<sub>2</sub> pour le récepteur de type M. Ceci est à rapprocher des essais réalisés avec les récepteurs de type N.<sup>53</sup>

Le récepteur de type M est organisé en cinq domaines (**figure I.5**).



**Figure I.5** : Représentation structurelle schématique du récepteur de type M<sup>51a</sup>

En bleu, le domaine N-terminal, riche en cystéine et qui est formé de 140 acides aminés reliés par trois ponts disulfures. Son rôle dans le fonctionnement du récepteur n'est pas encore connu.

En vert, un domaine fibronectine dont la fonction pourrait être de lier le collagène.

En rouge, la région centrale qui contient huit domaine de liaison des sucres (carbohydrates (CRD) ou C-lectines (CTLD)) et distincts et dont le cinquième est responsable de la liaison entre la sPLA<sub>2</sub> et le récepteur.

En gris le domaine transmembranaire, et en rose le domaine cytoplasmique qui permet l'internalisation de la sPLA<sub>2</sub> qui est ensuite dégradée.<sup>54</sup>

Plusieurs hypothèses ont été émises concernant le ou les rôles des récepteurs de type M que ce soit d'un point de vue enzymatique ou cellulaire. Par exemple, ils pourraient induire les fonctions suivantes :

- régulation négative de l'effet biologique des sPLA<sub>2</sub> par internalisation et inhibition de ces dernières. En effet, la liaison de la sPLA<sub>2</sub> au récepteur M entraîne une diminution de l'activité enzymatique.
- augmentation du nombre de lyso-phospholipides par concentration des protéines à la surface de la membrane.
- émission de signaux cellulaires conduisant à différents effets biologiques.<sup>55</sup>

D'autres protéines appartenant au groupe des lectines de type C peuvent lier et inhiber les sPLA<sub>2</sub>. Nous pouvons citer les protéines SP-A<sup>56</sup> (exprimée dans le surfactant pulmonaire) ou bien la protéine PLI- $\alpha$ <sup>57</sup> (présente dans le venin de serpent). Ces deux protéines peuvent se lier aux sPLA<sub>2</sub> avec une concentration de l'ordre du nanomolaire et inhiber l'activité enzymatique de ces sPLA<sub>2</sub>.

## II. Les Inhibiteurs de sPLA<sub>2</sub>

Comme il a été décrit précédemment, les sPLA<sub>2</sub> sont impliquées dans un grand nombre de processus biologiques sans que leurs rôles ne soient bien définis. De plus, les sPLA<sub>2</sub> constituent une cible thérapeutique de par leur rôle central de production de médiateurs lipidiques. Le développement d'inhibiteurs de sPLA<sub>2</sub> doit permettre de clarifier le rôle de ces enzymes ainsi que d'aider à mieux comprendre le mécanisme d'hydrolyse des phospholipides. Enfin ces molécules pourraient devenir des molécules à visée thérapeutique.

Il existe plusieurs approches pour l'obtention d'inhibiteurs :

- analogie entre le substrat et l'inhibiteur, c'est-à-dire synthèse d'analogues de phospholipides en ce qui concerne les sPLA<sub>2</sub>.
- relation structure/activité permettant d'augmenter l'activité d'un inhibiteur peu actif par modification de la structure de ce dernier. Dans ce cas, la cristallographie est une aide précieuse.
- utilisation des techniques de screening à haut débit (virtuel ou non).
- étude de la pharmacopée traditionnelle permettant notamment la découverte de molécules actives d'origine naturelle.

Beaucoup d'inhibiteurs de sPLA<sub>2</sub> ont été synthétisés depuis 25 ans. Certains de ces inhibiteurs ont été testés en tests cliniques mais la plupart des inhibiteurs sont actifs sur plusieurs sPLA<sub>2</sub>. Donc le but des recherches menées dans le cadre des inhibiteurs de sPLA<sub>2</sub> est de trouver un inhibiteur spécifique à une sPLA<sub>2</sub>. De plus, pour l'instant, aucun n'inhibiteur des sPLA<sub>2</sub> GIII et GXIIA n'est connu.

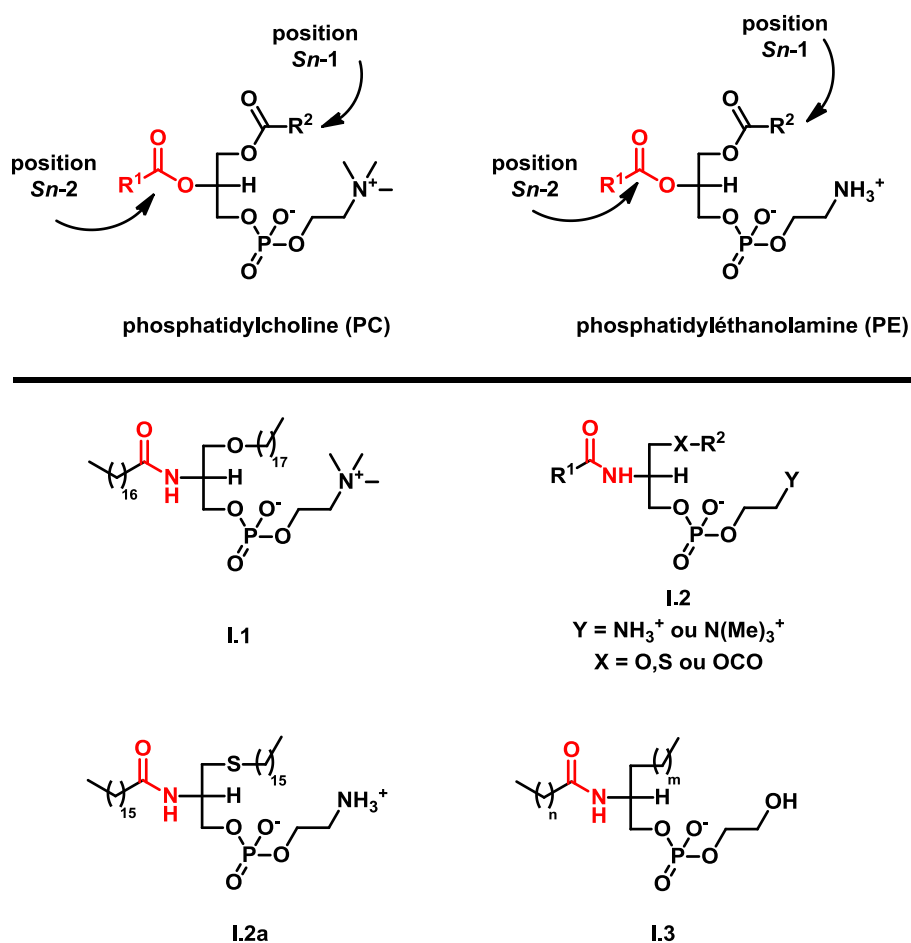
## II.1. Analogues de phospholipides

Les analogues de phospholipides ont été les premiers inhibiteurs synthétisés dans les années 1980.

Ces inhibiteurs peuvent être classés en trois catégories en fonction de leur mode d'action : ils peuvent être résistants à l'hydrolyse, bloquer le site actif grâce à un analogue de l'état de transition ou bien former une liaison covalente avec l'enzyme.

### II.1.a. Les inhibiteurs résistants à l'hydrolyse

Les inhibiteurs résistants à l'hydrolyse décrits dans la littérature sont ceux dont la fonction ester en position *Sn*-2 du phospholipide substrat (**figure I.6**, haut) a été remplacée par une fonction amide (**figure I.6**, bas). Non seulement cette dernière résiste à l'hydrolyse mais elle forme également une liaison hydrogène avec une molécule d'eau présente dans le site actif et liée à un noyau imidazole.<sup>58</sup> Les deux phospholipides ayant servi de base à l'élaboration de ces inhibiteurs sont la phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidyléthanolamine (PE) (**figure I.6**, haut).



**Figure I.6** : analogues de phospholipides présentant une liaison amide en position Sn-2

Le premier inhibiteur (composé **I.1**, **figure I.6**, bas) a été décrit par Dennis en 1986 et s'est avéré être un inhibiteur réversible de la sPLA<sub>2</sub> du venin de cobra (*Naja naja naja*).<sup>59</sup> En plus du remplacement de la liaison ester Sn-2 par une liaison amide, cet inhibiteur présente une modification au niveau de l'ester de la seconde chaîne Sn-1 (**figure I.6**) qui a été remplacé par un groupement alkoxy plus hydrophobe. Cet inhibiteur ne se lie pas de manière covalente à la protéine et il n'est pas très puissant (K<sub>i</sub> compris entre 16 et 40 μM). De plus il est peu probable qu'il soit spécifique d'une sPLA<sub>2</sub> en particulier.

Dennis *et coll.* ont également décrit les composés **I.2** (**figure I.6**) comme étant des inhibiteurs de la même sPLA<sub>2</sub> du venin de cobra.<sup>58, 60</sup> Ces composés sont les plus actifs d'une série de sept inhibiteurs qui sont tous des analogues des phospholipides naturels PC et PE.

Parmi les composés décrits, seul quatre ont permis la mesure d'une IC<sub>50</sub> (**tableau I.2**).

Composé	X	Y	IC <sub>50</sub> (μM)
<b>I.2a</b>	S	NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	0,45
<b>I.2b</b>	S	N(Me) <sub>3</sub> <sup>+</sup>	2
<b>I.2c</b>	O	N(Me) <sub>3</sub> <sup>+</sup>	38
<b>I.2d</b>	OCO	N(Me) <sub>3</sub> <sup>+</sup>	156

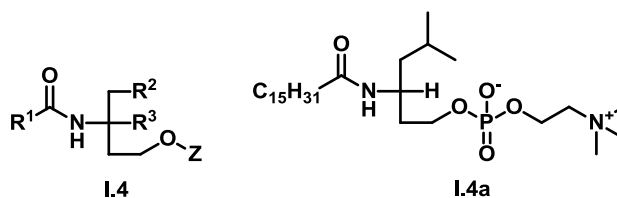
**Tableau I.2** : composés amides actifs

L'hydrophobicité de la chaîne *Sn*-1 est augmentée par le remplacement de la fonction ester par une liaison éther ou thioéther. Le site actif de la sPLA<sub>2</sub> possède une poche hydrophobe,<sup>61</sup> donc plus le groupe remplaçant l'ester *Sn*-1 est hydrophobe, plus l'interaction entre l'inhibiteur et le site actif sera forte. Cette hypothèse est vérifiée par la comparaison des IC<sub>50</sub> des composés **I.2c** et **I.2d** puis **I.2b** et **I.2c** (**tableau I.2**).

La deuxième modification notable se trouve au niveau de la tête polaire. L'inhibiteur possédant la tête NH<sub>3</sub><sup>+</sup> (composé **I.2a**, **tableau I.2**) est plus actif que celui possédant la tête N(Me)<sub>3</sub><sup>+</sup> (composé **I.2b**, **tableau I.2**). L'explication proposée par Dennis est à mettre en relation avec le modèle de mécanisme catalytique « dual phospholipids » soulignant la présence d'un site activant sur l'enzyme qui est différent du site actif.<sup>62</sup> Ce modèle est une alternative au modèle cinétique d'adsorption de l'enzyme à la surface des membranes. L'enzyme nécessite d'être activée par un phospholipide avant de réaliser l'hydrolyse d'un autre phospholipide, or il s'avère que seuls les phospholipides possédant une tête N(Me)<sub>3</sub><sup>+</sup> peuvent activer les sPLA<sub>2</sub>. De plus l'affinité des phospholipides N(Me)<sub>3</sub><sup>+</sup> est plus forte pour le site activant que pour le site actif. Donc une faible concentration d'analogues de phospholipides contenant une tête polaire N(Me)<sub>3</sub><sup>+</sup> aura pour effet une activation de la protéine et non son inhibition.<sup>58</sup> Le composé **I.2a** est donc le plus puissant des analogues de phospholipides, néanmoins, cet inhibiteur n'a été testé que sur la sPLA<sub>2</sub> du venin de cobra.

Le composé **I.3** (**figure I.6**) a été mis au point par l'équipe de De Haas comme inhibiteur de la sPLA<sub>2</sub> pancréatique du porc.<sup>63</sup> L'affinité de cet inhibiteur pour la sPLA<sub>2</sub> est quatre fois supérieure à celle du substrat original. Cependant, la comparaison avec les autres inhibiteurs n'est pas aisée car la mesure de l'inhibition enzymatique n'est pas identique. En se basant sur le travail effectué par De Haas et son équipe, le groupe de Bennion a également mis au point la synthèse de composés dérivés de phospholipides (composés de type **I.4**, **figure I.7**)

dont la fonction ester a été remplacée par un amide.<sup>64</sup> Les composés synthétisés par Bennion et *coll.* sont très similaires à ceux proposés par De Haas, la principale différence repose sur les chaînes alkyles latérales. En effet, De Haas a privilégié les longues chaînes sur la position *Sn*-1 ( $R^2$ ) alors que Bennion a testé différentes longueurs allant même jusqu'à supprimer la chaîne *Sn*-1 (**figure I.7**)

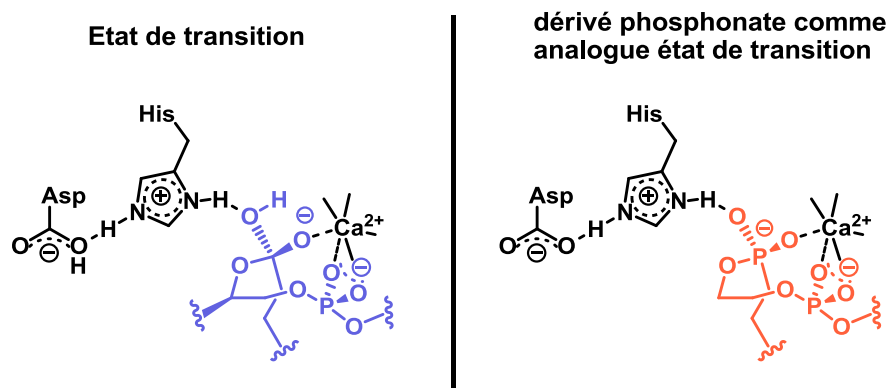


**Figure I.7** : composés proposés par Bennion et *coll.*<sup>64</sup>

Des différents composés étudiés, une relation structure/activité a pu être établie mettant en avant différents éléments : la longue chaîne en position *Sn*-1 ( $R^2$ ) n'est pas un élément déterminant de l'inhibition ( $IC_{50}$  (**I.4a**) = 0,23  $\mu$ M) et deux isomères d'un même composé n'ont pas la même activité. Ces quelques éléments mettent en avant l'interaction entre l'inhibiteur et le site actif. Cette interaction a été mise en évidence par des études RMN 2D. Un des oxygènes du groupement phosphonate interagit avec le calcium tandis que l'autre est impliqué dans une liaison hydrogène avec une tyrosine du site actif.<sup>64</sup>

### II.1.b Les inhibiteurs analogues de l'état de transition

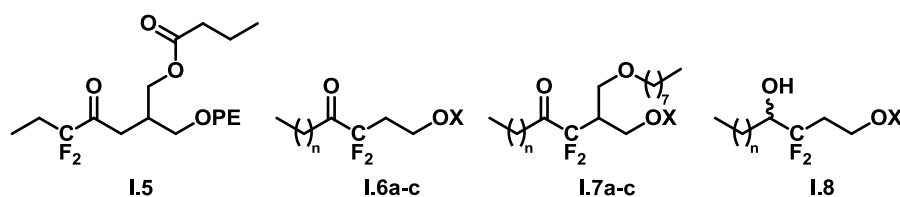
Les inhibiteurs de l'état de transition sont des composés possédant une géométrie semblable à l'état de transition qu'ils doivent mimer ainsi que les mêmes propriétés électroniques (**figure I.8**).<sup>65</sup>



**Figure I.8** : état de transition lors de l'hydrolyse (à gauche) et analogue de l'état de transition (à droite).<sup>12</sup>

L'état de transition lors de l'hydrolyse des phospholipides par une sPLA<sub>2</sub> étant un tétraèdre, les inhibiteurs devront posséder une fonction permettant de mimer ce tétraèdre comme par exemple une fluorocétone ou bien un phosphonate.

Il a été montré que les composés ayant une cétone polarisée étaient des inhibiteurs d'enzymes hydrolysantes.<sup>66</sup> C'est donc logiquement que les premiers exemples d'analogues d'état de transition des sPLA<sub>2</sub> sont des dérivés possédant une fluorocétone en remplacement de l'ester *Sn*-2. L'avantage des fluors ne se limite pas à la polarisation de la liaison C=O. En effet, la forme hydratée, très facilement obtenue, est un tétraèdre qui peut être considéré comme un analogue d'état de transition.<sup>67</sup> Le composé **I.5** (**figure I.8**) s'étant révélé être un inhibiteur de la sPLA<sub>2</sub> du venin de cobra (*Naja naja naja*), une étude plus poussée comprenant plus d'une dizaine de composés a été menée dont quelques-uns sont présentés (**figure I.9**).<sup>68</sup>



**Figure I.9** : composés possédant une fluorocétone et analogues

Les IC<sub>50</sub> ont été obtenues pour ces composés (**tableau I.3**) permettant donc de réaliser une étude de la relation structure/activité.

Composé	X	n	IC <sub>50</sub> (mM)
<b>I.6a</b>	PC	15	0,7
<b>I.6b</b>	PC	6	1,2
<b>I.6c</b>	PE	15	0,07
<b>I.7a</b>	PC	15	> 4
<b>I.7b</b>	PC	6	~ 4
<b>I.7c</b>	PE	6	> 2
<b>I.8</b>	PC	15	> 4

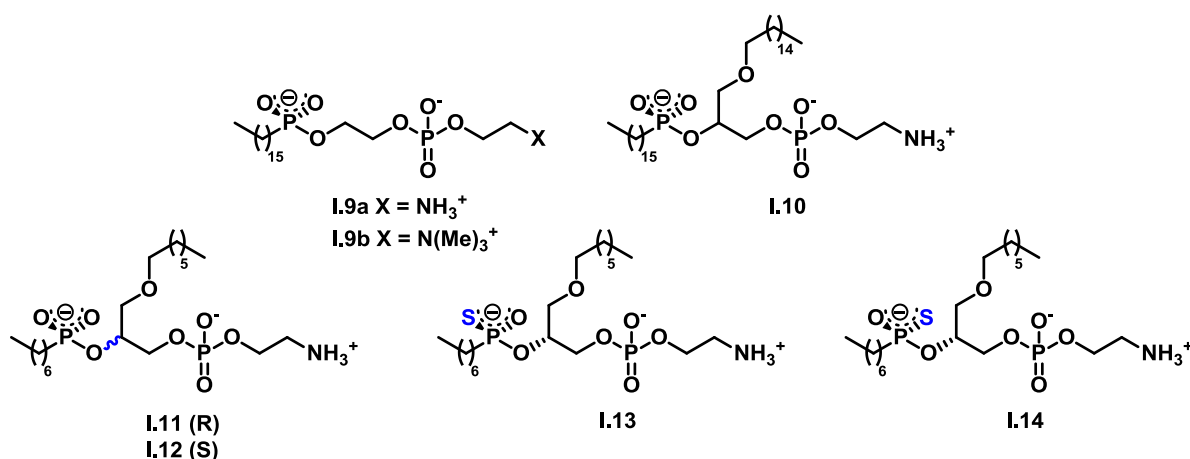
**Tableau I.3** : inhibiteurs analogues de l'état de transition possédant une fluorocétone

D'après les résultats du **tableau I.3**, il est évident que les composés ne possédant pas une chaîne alkyle supplémentaire sont plus actifs (**I.6a** comparé à **I.7a**). Des analyses RMN ont révélé que les cétones des composés possédant les deux chaînes ne sont pas hydratées. Une première hypothèse est que la seconde chaîne alkyle pourrait entraîner l'internalisation de la fluorocétone dans la micelle (formée de substrat et d'inhibiteur) c'est-à-dire dans sa partie hydrophobe, empêchant donc cette dernière de s'hydrater. La seconde hypothèse est que la deuxième chaîne favoriserait la géométrie trigonale de la cétone et donc défavoriserait le tétraèdre. A l'heure actuelle, aucune des deux hypothèses n'est privilégiée.

La longueur des différentes chaînes semble avoir une incidence limitée sur l'activité puisque les activités des composés possédant les mêmes groupements mais avec des longueurs de chaînes différentes sont du même ordre de grandeur (**I.6a, I.6b ; I.7a, I.7b...**).

La formation du tétraèdre grâce à une cétone polarisée nécessite l'hydratation de cette dernière or ce phénomène n'est pas systématique. Une autre possibilité pour la création d'un analogue d'état de transition est l'incorporation d'un groupement ayant déjà une géométrie tétraédrique tel qu'un groupement phosphonate (**figure I.10**).<sup>69</sup>





**Figure I.10** : premiers essais d'analogue de transition avec un groupement phosphonate

Composé	IC <sub>50</sub> (μM)	Composé	IC <sub>50</sub> (μM)
<b>I.9a</b>	750	<b>I.17</b>	25
<b>I.9b</b>	1200	<b>I.18</b>	0,5
<b>I.10</b>	5	<b>I.19</b>	8
<b>I.11</b>	0,5		

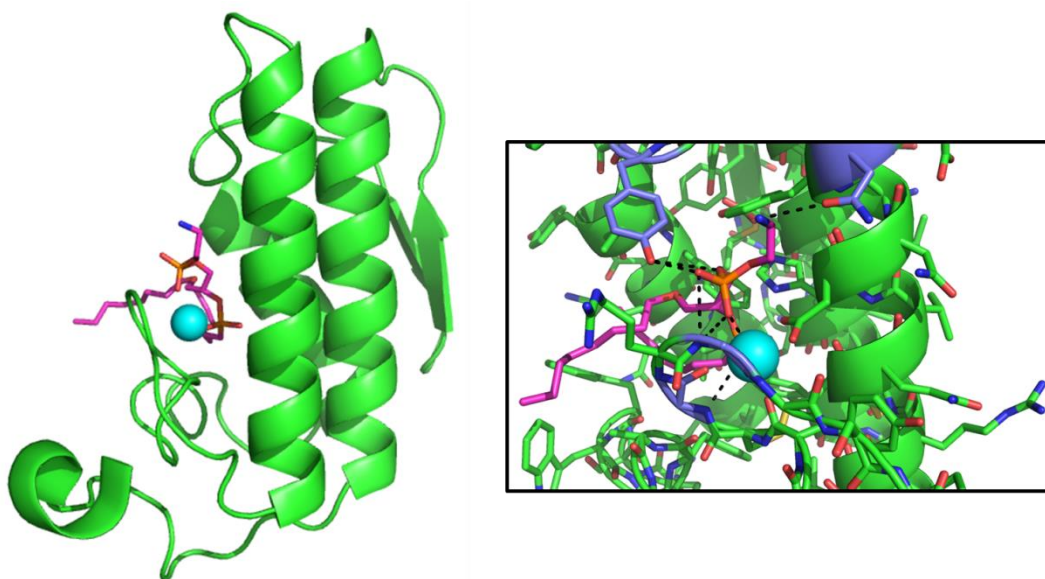
**Tableau I.4** : IC<sub>50</sub> des analogues de l'état de transition présentant un groupement phosphonate

L'influence de la tête polaire a de nouveau été étudiée grâce aux composés **I.9a** et **I.9b**. Comme pour les études précédentes, l'inhibiteur avec la tête polaire NH<sub>3</sub><sup>+</sup> possède une IC<sub>50</sub> plus basse (0,75 mM) que celui avec la tête polaire N(Me)<sub>3</sub><sup>+</sup> (1,2 mM). Mais l'influence la plus remarquable vient de la seconde chaîne alkyle du composé **I.10**, ce dernier a une IC<sub>50</sub> de 5 μM. Ce composé est donc cent fois plus actif que les composés ne possédant qu'une seule chaîne.

Devant cette découverte, les auteurs ont réalisé une étude de relation structure/activité basée sur quatre composés (Composés **I.11**, **I.12**, **I.13** et **I.14**, **figure I.10**).<sup>70</sup> Le composé **I.11** est très similaire au composé **I.10** sauf qu'il est énantiomériquement pur et possèdent des chaînes plus courtes. La longueur de chaîne et la stéréochimie ont un grand impact sur l'activité puisque son IC<sub>50</sub> est de 0,5 μM soit dix fois plus faible que celui du composé **I.10**. La diminution de la longueur de chaîne entraîne une diminution de l'hydrophobicité et donc une augmentation de la solubilité du produit en milieu aqueux, ceci peut éventuellement expliquer la différence d'activité. L'énantiomère **I.12** du produit **I.11** est beaucoup moins

actif ( $IC_{50} = 25 \mu\text{M}$ ) ce qui souligne l'importance de la stéréochimie de l'inhibiteur et donc ce qui implique une interaction spécifique de l'inhibiteur avec le site actif de l'enzyme. Les composés **I.13** et **I.14** sont des analogues de **I.11** pour lesquels un des oxygènes du phosphonate a été remplacé par un soufre, les  $IC_{50}$  de ces composés sont respectivement de  $0,5 \mu\text{M}$  et de  $8 \mu\text{M}$ . Néanmoins, la configuration absolue du phosphonate n'a pas été déterminée, ce qui serait intéressant à réaliser sachant qu'un des composés est vingt fois plus actif que l'autre.

Le composé **I.11** est l'un des composés les plus actifs sur la sPLA<sub>2</sub> du venin de cobra. Il a été co-cristallisé avec la sPLA<sub>2</sub> extraite du venin de cobra (code pdb : 1POB) (**figure I.11**).<sup>71</sup>



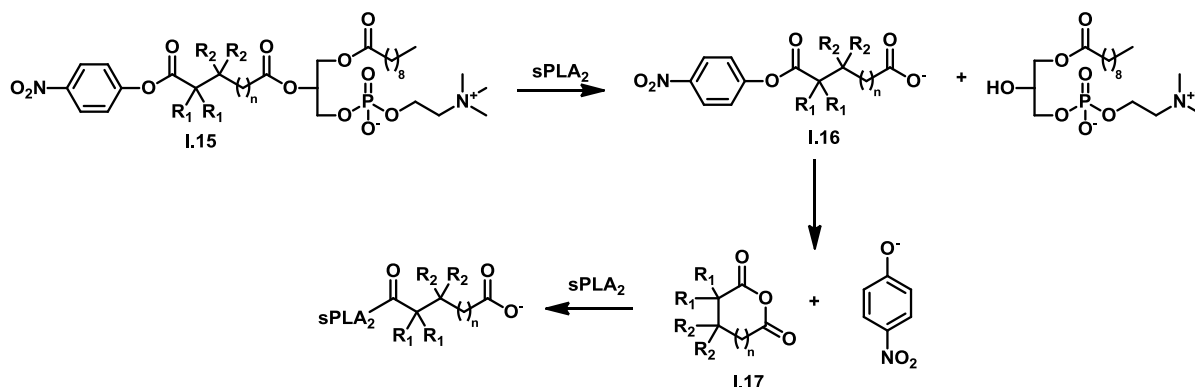
**Figure I.11** : structure cristallographique du composé **I.11** (en rose) à l'intérieur du site actif de la sPLA<sub>2</sub> du venin de cobra<sup>71</sup> (à gauche) et agrandissement du site actif avec les acides aminés liés à l'inhibiteur en bleu (à droite).

D'après la structure cristallographique, le calcium est complexé par les deux groupements phosphonates. De plus le phosphonate situé en *Sn-2* interagit avec l'histidine catalytique (H47), deux tyrosines (Y63 et Y27), un acide aspartique (D48) et deux glycines (G29 et G31), et enfin,  $\text{NH}_3^+$  interagit avec une asparagine (N52).

### II.1.c. Les inhibiteurs suicides

Les inhibiteurs analogues de phospholipides décrits jusqu'à présent étaient réversibles. Une nouvelle classe d'inhibiteurs non-réversibles a été mise au point par Dennis à la fin des

années 1980 et appelée SIBLINKS (Suicide-Inhibitory Bifunctionally LINKed Substrats).<sup>72</sup> Le principe de ces inhibiteurs est la formation d'une substance très réactive à l'intérieur même du site actif (**schéma I.1**).



**Schéma I.1** : inhibition de sPLA<sub>2</sub> par un inhibiteur suicide

A la grande différence des autres inhibiteurs analogues de phospholipides, les inhibiteurs suicides possèdent la fonction ester en position *Sn*-2. La première étape de l'inhibition est l'hydrolyse de l'inhibiteur **I.15** par la sPLA<sub>2</sub> (de venin de cobra). Le dérivé nitrophénol **I.16** issu de cette hydrolyse subit une cyclisation intramoléculaire donnant l'anhydride cyclique **I.17** qui réagit instantanément avec un acide aminé du site actif (tyrosine 52, 69 ou 73 puisque l'utilisation d'hydroxylamine permet de régénérer l'activité enzymatique<sup>73</sup>). Cette réaction n'est évidemment possible que si la vitesse de cyclisation du dérivé **I.16** est supérieure à la vitesse d'hydrolyse de l'analogue **I.15**. Or cette vitesse dépend des groupements R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub>. Plusieurs composés ont donc été synthétisés et testés.<sup>72</sup> Deux paramètres sont étudiés : la vitesse de formation du *p*-nitrophénoxide **I.16** (afin de connaître l'affinité de l'inhibiteur pour l'enzyme), et la vitesse de cyclisation de **I.16** (**tableau I.5**).

Composé	n	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	V <sub>hydrolyse</sub> <sup>a</sup>	t <sub>1/2</sub> (s)
<b>I.15a</b>	1	H	H	155	150
<b>I.15b</b>	1	H	Me	0,11	40
<b>I.15 c</b>	1	Me	H	0,002	15
<b>I.15d</b>	0	H	H	0,6	4
<b>I.15e</b>	0	H	Me	0,005	1

<sup>a</sup> vitesse d'hydrolyse exprimé en (μMol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>)

**Tableau I.5** : comparaison des cinétiques des inhibiteurs suicides

Dans ce tableau,  $V_{\text{hydrolyse}}$  représente la facilité avec laquelle le phospholipide **I.15** est hydrolysé, plus cette vitesse est élevée, meilleur est le substrat (**I.15d** meilleur substrat que **I.15c**). Il est d'ailleurs important de noter que **I.15a** n'inhibe pas la protéine. La vitesse de cyclisation des dérivés **I.16** est exprimée à l'aide du temps de demi-vie de ce composé  $t_{1/2}$ . Plus  $t_{1/2}$  est important, moins la vitesse de cyclisation est grande. Au vu des résultats du **tableau I.5**, il semblerait que le meilleur inhibiteur de cette série soit le composé **I.15d** puisqu'il possède la meilleure affinité pour l'enzyme (**I.15a** est exclu) et le dérivé nitrophénol **I.16d** correspondant possède un temps de demi-vie faible. Néanmoins, la comparaison des inhibiteurs serait plus aisée en présence d' $IC_{50}$ .

Dans cette partie, les inhibiteurs présentés dérivent tous des phospholipides mais ils ont des moyens différents d'inhiber la sPLA<sub>2</sub> de venin de cobra. Même s'ils ont tous été testés sur la même enzyme, la comparaison est difficile, cela est dû à la grande variété de tests possibles et à la façon d'exprimer l'activité de l'inhibiteur. Dans tous les cas, le composé **I.11** (**figure I.10**, page 21) peut être cité comme l'inhibiteur le plus actif de cette série.

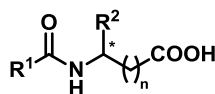
## II.2. Les dérivés amides

### II.2.a. FLP 67047XX et ses dérivés

Au début des années 1990, Bennion *et coll.* ont décrit la synthèse et l'activité d'analogues de phospholipides possédant une fonction amide en remplacement de la fonction ester Sn-2,<sup>64</sup> le composé **I.4a** (**figure I.7**, page 18) s'était révélé être un bon inhibiteur de la sPLA<sub>2</sub> pancréatique du porc (pGIB) ( $IC_{50} = 0,23 \mu\text{M}$ ). Néanmoins, son manque de stabilité l'empêche d'être développé en essai clinique. Une série de treize composés analogues de **I.4a** a été testée sur la sPLA<sub>2</sub> GIB du porc et sur la sPLA<sub>2</sub> hGIIA.

La première modification apportée au composé **I.4a** est le remplacement de la partie phosphocholine par un acide carboxylique (composé **I.18b**, **tableau I.6**) sans que cela perturbe l'activité inhibitrice.<sup>74</sup> Une étude de simulation moléculaire ainsi que des analyses RMN 2D ont révélé qu'un oxygène du carboxylate de **I.18b** interagit avec le calcium et que l'autre oxygène est impliqué dans une liaison hydrogène avec une tyrosine du site actif.<sup>74</sup>

Ces constatations sont à mettre en relation avec les observations effectuées précédemment sur le composé **I.4a**.



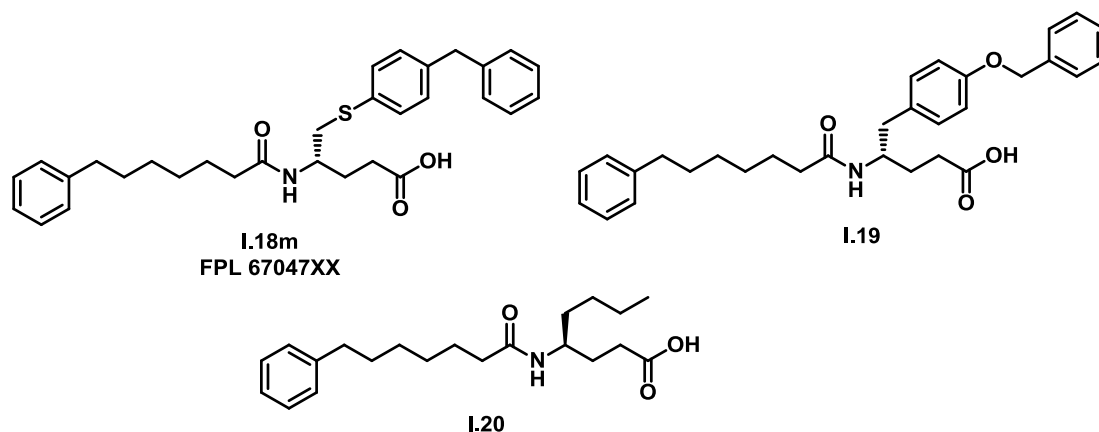
(R) **I.18a-i** et **I.18k-m**  
(S) **I.18j**

composé	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	n	IC <sub>50</sub> (μM) GIB porc	IC <sub>50</sub> (μM) hGIIA
<b>I.18a</b>	C <sub>15</sub> H <sub>31</sub> -	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> -	0	15	-
<b>I.18b</b>	C <sub>15</sub> H <sub>31</sub> -	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> -	1	0,19	-
<b>I.18c</b>	C <sub>15</sub> H <sub>31</sub> -	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> -	2	0,20	-
<b>I.18d</b>	C <sub>15</sub> H <sub>31</sub> -	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> -	3	1,3	-
<b>I.18e</b>	C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> -	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> -	1	1,4	-
<b>I.18f</b>	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> -	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> -	1	0,30	-
<b>I.18g</b>	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> -	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> SCH <sub>2</sub> -	1	0,093	-
<b>I.18h</b>	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> -	(2-naphtylthio)méthyl	1	0,023	-
<b>I.18i</b>	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> -	(2-naphtylthio)méthyl	2	0,016	1,85
<b>I.18j</b>	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> -	(2-naphtylthio)méthyl	1	>250	12
<b>I.18k</b>	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> -	(3-benzylphénylthio)méthyl	1	0,030	3,8
<b>I.18l</b>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -	(3-benzylphénylthio)méthyl	1	-	0,065
<b>I.18m</b>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -	(3-benzylphénylthio)méthyl	2	0,015	0,021

**Tableau I.6** : inhibiteurs de sPLA<sub>2</sub> présentant une fonction amide

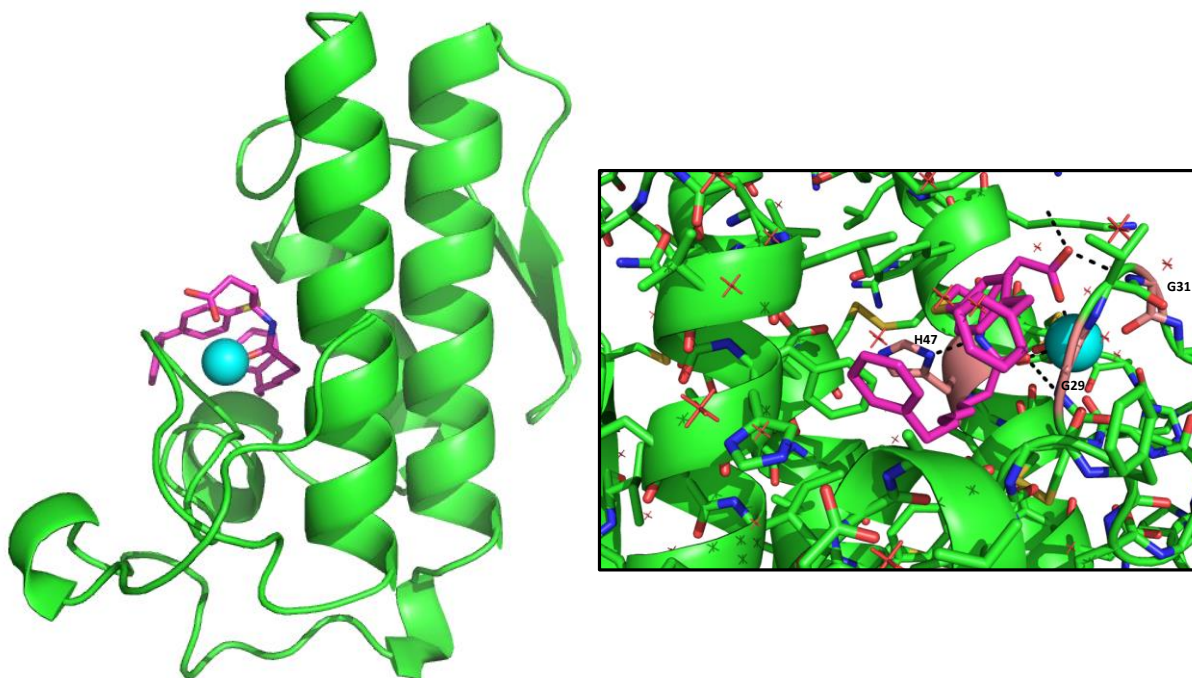
La diminution du caractère lipophile des inhibiteurs a entraîné une légère baisse de leur activité inhibitrice (composé **I.18e** par rapport à **I.18b**). L'étude de simulation moléculaire a permis de suggérer que le groupement R<sup>2</sup> se situe dans une poche hydrophobe or le groupe isobutyle (composés **I.18a** à **I.18f**) ne permet pas de remplir cette poche d'où l'utilisation de groupements aromatiques (composés **I.18g** à **I.18m**).

Le meilleur inhibiteur est le composé **I.18m** baptisé **FPL 67047XX** (figure **I.12**, à gauche), il est très actif (IC<sub>50</sub> = 21 nM) sur la sPLA<sub>2</sub> hGIIA mais également sur la sPLA<sub>2</sub> d'origine porcine (IC<sub>50</sub> = 15 nM).



**Figure I.12** : FPL 67047XX (à gauche) et inhibiteur de sPLA<sub>2</sub> hGIIA dérivés de FPL 67047XX

Ce composé a été utilisé lors de tests de co-cristallisation de la sPLA<sub>2</sub> humaine non-pancréatique (hGIIA) (code pdb : 1KVO) (**figure I.13**).<sup>75</sup>

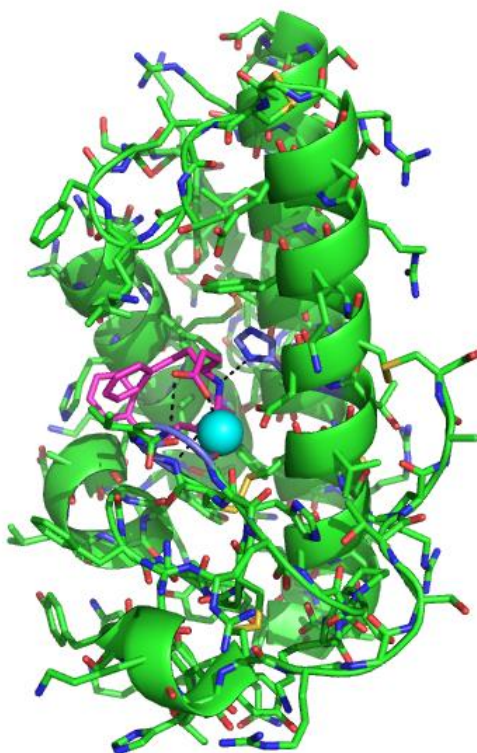


**Figure I.13** : structure cristallographique de sPLA<sub>2</sub> hGIIA inhibée par FPL 67047XX (rose)<sup>75</sup>, les acides aminés liés à l'inhibiteur sont en bleu

La structure obtenue par diffraction aux rayons X a mis en évidence une interaction entre un des oxygènes du carboxylate et le calcium. Le deuxième oxygène de ce carboxylate est quand-à-lui impliqué dans une liaison hydrogène avec une glycine (G29) ce qui est une différence notable avec les inhibiteurs possédant un groupement phosphonate.<sup>76</sup> En effet, dans ce cas, l'oxygène n'interagissant pas avec le calcium est lié par liaison hydrogène à une lysine. Il est également possible de noter que les poches hydrophobes du site actif sont

occupées par les groupements phényles, que l'oxygène de l'amide fait une interaction avec le calcium et que l'hydrogène de cet amide est impliqué dans une liaison hydrogène avec l'histidine catalytique (H47).

Un autre composé, très similaire à **FPL 67047XX**, a été développé par Fairlie *et coll.* au début des années 2000 (composé **I.19**, **figure I.12**).<sup>77</sup> Tout comme **FPL 67047XX**, ce composé résulte d'une relation structure/activité où 17 composés ont été synthétisés et testés sur la sPLA<sub>2</sub> hGIIA. La relation structure/activité a permis de déterminer le nombre adéquat de carbone entre l'amide et le phényle de la longue chaîne alkyle ainsi que les meilleurs substituants sur ce phényle et sur l'oxygène de la tyrosine. La meilleure IC<sub>50</sub> a été obtenue pour le composé **I.19** (IC<sub>50</sub> = 29 nM) bien que les autres dérivés de D-tyrosine sont également très actifs sur la sPLA<sub>2</sub> hGIIA avec des IC<sub>50</sub> inférieures à 2,5 µM. L'activité du composé **I.19** est du même ordre de grandeur que celle de **FPL 67047XX** (IC<sub>50</sub> = 0,021 µM). La structure de sPLA<sub>2</sub> hGIIA avec le composé **I.19** (code pdb : 1KQU) a mis en évidence les mêmes interactions que celles observées pour **FPL 67047XX** (**figure I.14**).<sup>77</sup>



**Figure I.14** : structure cristallographique de sPLA<sub>2</sub> hGIIA inhibée par le composé **I.19** .<sup>77</sup>

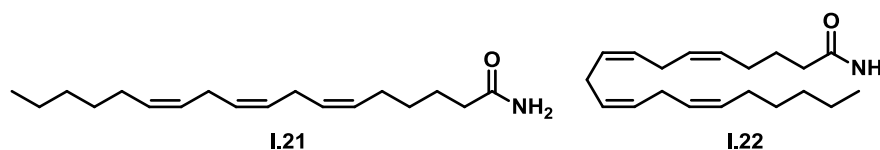
Comme **FPL 67047XX**, le composé **I.19** est lié à l'histidine catalytique (H47) et aux glycines G29 et G31.

Des tests *in-vivo* du composé **I.19** sur des rats ont montré que la molécule protégeait ces derniers d'une ischémie mésentérique (interruption brutale de la circulation du sang dans les artères).<sup>78</sup>

Un dernier composé (**I.20**, **figure I.12**) ressemblant également à **FPL 67047XX** mais dont une partie aromatique a été remplacé par une courte chaîne alkyle<sup>79</sup> s'est montré actif sur la sPLA<sub>2</sub> hGV ( $X_i(50) = 0,003 \pm 0,0004$ ) ( $X_i(50)$  = fractions molaires nécessaires à l'inhibition de 50 % de l'enzyme). Il est intéressant de noter que la configuration du carbone asymétrique est inversée par rapport à **FPL 67047XX** et au composé **I.19** et que l'isomère du composé **I.20** n'est pas actif. La comparaison de ce composé avec **FPL 67047XX** et **I.19** n'est pas évidente puisque **FPL 67047XX** et **I.19** n'ont pas été testés sur la sPLA<sub>2</sub> hGV et le composé **I.20** n'a pas été testé sur la sPLA<sub>2</sub> hGIIA. De même la spécificité de ce type de molécules sur les autres sPLA<sub>2</sub> ne peut pas être discutée.

### II.2.b. les amides primaires

Les analogues de phospholipides ont un inconvénient, leur caractère ionique les empêche de traverser la barrière lipidique et donc de pénétrer à l'intérieur des cellules. Or pour déterminer le rôle des phospholipases dans les processus cellulaires, les inhibiteurs doivent pénétrer dans les cellules. Au début des années 1990, des inhibiteurs possédant une longue chaîne alkyle et une fonction amide primaire ont été rapportés dans la littérature.<sup>80</sup> Sur les quatre molécules obtenues, deux ont montré une activité intéressante sur la sPLA<sub>2</sub> GIB du porc (pGIB) et la sPLA<sub>2</sub> hGIIA (**figure I.15**).



**Figure I.15** : inhibiteurs de type amides primaires

Composé	$X_i(50)$ sur pGIB	$X_i(50)$ sur hGIIA
<b>I.21</b>	0,0008	0,002
<b>I.22</b>	0,0003	0,004

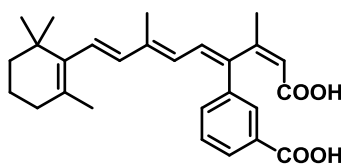
**Tableau I.7** : activité des composés amides primaires



Ces composés sont actifs mais ne semblent pas être spécifiques à un type de sPLA<sub>2</sub>. Les données sont incomplètes et donc il est difficile de se prononcer.

### II.3. Les acides carboxyliques

Au début des années 1990, à l'aide d'un programme de screening sur les phospholipases A<sub>2</sub> de faible poids moléculaire, l'équipe de Tramposch a identifié un composé possédant deux fonctions acides appelé **BMS-181162** (figure I.16).<sup>81</sup>



**BMS-181162**

**Figure I.16 : BMS-181162**

Ce composé est spécifique des phospholipases A<sub>2</sub> de faible poids moléculaire (il n'inhibe pas les phospholipases A<sub>1</sub>, C ou D) et il a été testé sur la sPLA<sub>2</sub> non-pancréatique identifiée ultérieurement comme étant la hGIIA. L'activité *in-vitro* de ce composé est moyenne (IC<sub>50</sub> = 40 μM) néanmoins des tests *in-vivo* ont été réalisés sur des souris. Cette étude a démontré que le **BMS-181162** pouvait réduire la taille d'un œdème présent sur les oreilles des souris avec ED<sub>50</sub> = 160 μg/oreille (ED<sub>50</sub> est la dose appliquée pour obtenir une réponse significative sur la moitié des sujets traités).

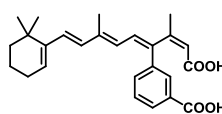
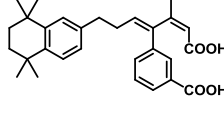
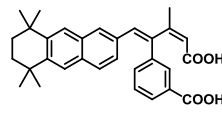
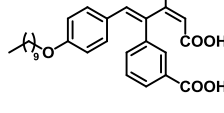
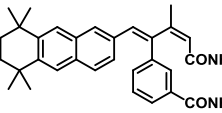
Le **BMS-181162** n'est pas un analogue du substrat de l'enzyme, il se peut donc qu'il inhibe l'enzyme sans pénétrer à l'intérieur du site actif. D'après Burke *et coll.*, le **BMS-181162** est un inhibiteur réversible qui appartient à l'une des catégories suivantes :<sup>82</sup>

- 1) les inhibiteurs aidant à la désorption l'enzyme de la surface en modifiant la nature physique de cette surface. Les inhibiteurs de ce type sont non-spécifiques aux sPLA<sub>2</sub>.
- 2) les inhibiteurs se fixant sur le site de reconnaissance de l'enzyme et donc empêchant l'étape d'adsorption de l'enzyme à la surface lipidique.
- 3) les inhibiteurs se fixant à l'intérieur du site actif de l'enzyme en milieu aqueux.
- 4) les inhibiteurs se fixant à l'intérieur du site actif de l'enzyme lorsque cette dernière est adsorbée à l'interface.

**BMS-181162** n'appartient pas à la catégorie 1) puisque lors des essais réalisés, les enzymes ne sont pas décrochées des vésicules.<sup>82</sup> Il n'appartient pas non plus à la catégorie 2) car la vitesse d'adsorption de l'enzyme sur des vésicules formées de phospholipides anioniques n'est pas modifiée par ajout de **BMS-181162**. De même si l'inhibiteur était de type 3), il y aurait une différence de vitesse d'adsorption de la phospholipase sur les vésicules. Il est donc fort probable que **BMS-181162** soit un inhibiteur de type 4). De plus tous les inhibiteurs qui ont montré une activité en mode "scooting" (l'enzyme est fixé de façon irréversible à la surface et donc hydrolyse seulement les phospholipides de ce vésicule contrairement au mode "hopping" où l'enzyme se désorbe du substrat entre deux hydrolyses)<sup>83</sup> sont des inhibiteurs de type 4.<sup>84</sup> Le composé **BMS-181162** se lie au site actif, il est donc possible d'envisager une complexation du calcium par les deux groupements acides, néanmoins aucune structure cristallographique de l'enzyme avec **BMS-181162** n'a été publiée.

La sélectivité relative de **BMS-181162** ainsi que son activité moyenne ont amené Tramposch et son équipe à synthétiser des analogues de ce composé pour faire une étude de relation structure/activité. Les premières modifications ont concerné la partie hydrophobe de l'inhibiteur.<sup>85</sup>

Dix inhibiteurs ont été synthétisés, dans un souci de clarté, seuls quelques résultats seront présentés.

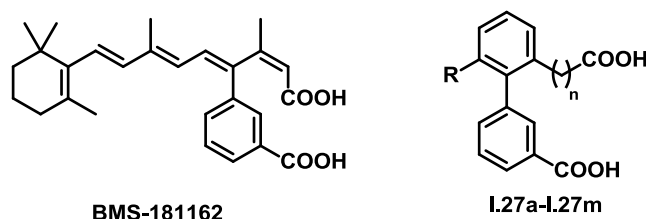
		IC <sub>50</sub> (μM)	ED <sub>50</sub> μg/oreille			IC <sub>50</sub> (μM)	ED <sub>50</sub> μg/oreille
<b>BMS-181162</b>		40	160	<b>I.25</b>		2	89
<b>I.23</b>		17	9,4	<b>I.26</b>		7	-
<b>I.24</b>		4	186				

**Tableau I.8** : premiers analogues de **BMS-181162** synthétisés

Il est fort probable que ces quatre composés se lient au site de la sPLA<sub>2</sub> tout comme **BMS-181162**. L'augmentation de taille et la rigidité de la partie hydrophobe de l'inhibiteur semblent être des éléments décisifs sur l'inhibition au regard des activités des composés **I.23**, **I.24** et **I.25** qui sont entre deux fois et vingt fois plus élevées que celle de **BMS-181162**. Il est possible que les groupements naphtyles remplissent d'avantage une poche hydrophobe et donc stabilisent l'inhibiteur à l'intérieur du site actif. Le composé **I.25** est huit fois plus actif que le composé **I.23**, en effet, l'ajout des deux carbones entre le groupement diacide et le groupement naphtyle peut contribuer à remplir d'avantage la poche hydrophobe. La différence est également nette entre le composé **I.23** et le composé **I.24**, leur seule différence vient du remplacement des fonctions acides par des fonctions amides. Ce changement diminue l'IC<sub>50</sub> de 17 µM à 4 µM, ce gain d'activité peut s'expliquer par la meilleure solubilité des amides. Pour finir, le composé **I.26** possède lui aussi une bonne activité (IC<sub>50</sub> = 7 µM) mais contrairement aux composés **I.23** à **I.25**, il ne possède pas un groupement naphtyle mais une longue chaîne carbonée. Ce résultat permet de poser la question du positionnement des inhibiteurs dans le site actif, il est possible que ce dernier change d'un composé à l'autre.

Ces composés ont été testés *in-vivo* dans les mêmes conditions que **BMS-181162**, le composé **I.23** ayant obtenu un ED<sub>50</sub> très supérieur à **BMS-181162**, il a été sélectionné pour une étude pharmacologique.

Devant ces résultats très encourageants, Tramposch et son équipe ont synthétisé d'autres analogues.<sup>86</sup> Par rapport à l'étude précédente, la partie de l'inhibiteur portant les fonctions acides est différente (**figure I.17**), un groupement phényle supplémentaire a été inséré.

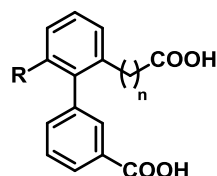


**Figure I.17** : **BMS-181162** et la structure générale de ses analogues

La présence du deuxième groupement phényle a deux avantages : augmenter la stabilité et faciliter la synthèse des analogues.

Sur les 24 analogues synthétisés et testés, seuls 14 seront présentés pour appuyer la relation structure/activité.

Les premiers composés analysés sont regroupés dans le **tableau I.9**:

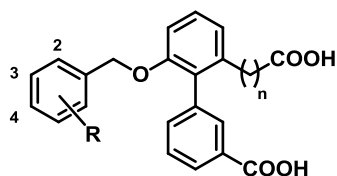


Composé	R	n	inhibition à 10 $\mu$ M (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	ED <sub>50</sub> ( $\mu$ g/dose)
I.27a		0	22	26	-
I.27b		1	46	10	116
I.27c		1	16	-	-
BMS-181162			12	45	180

**Tableau I.9** : dérivés de BMS-181162

L'analyse des résultats de ce tableau permet d'affirmer deux éléments. Premièrement, comme il a été énoncé pour les composés **I.23**, **I.24** et **I.25**, la taille du groupement hydrophobe a une importance sur l'activité. Le composé **I.27c** qui possède un petit groupement hydrophobe inhibe la protéine à hauteur de 16 % à une concentration de 10  $\mu$ M alors que le composé **I.27b** inhibe la protéine à hauteur de 46 % soit trois fois plus à la même concentration. Un autre élément a été mis en évidence, l'ajout d'un carbone entre le groupement phényle et la fonction acide permet de diviser l'IC<sub>50</sub> par 2,6 (**tableau I.9**, composés **I.27a** et **I.27b**). Il est possible que la pince formée par les deux acides autour du calcium dans le site actif soit favorisée par la présence de ce deuxième carbone.

Une autre série de composés dans lesquelles la structure générale a été légèrement modifiée (**tableau I.10**) a été publiée.



I.27d-m

composé	R	n	type	Inhibition à 10 $\mu$ M (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	ED <sub>50</sub> ( $\mu$ g/dose)
<b>I.27d</b>	3,4-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> C-	0	-	22	>100	147
<b>I.27e</b>	3,4-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> C-	1	-	32	24	-
<b>I.27f</b>	3,4-bis( <i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> -)	0	-	27	>100	-
<b>I.27g</b>	3,4-bis((CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> C=CHCH <sub>2</sub> O-)	0	-	7	-	-
<b>I.27h</b>	3,4-bis( <i>n</i> -C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> O-)	0	-	84	2	-
<b>I.27i</b>	4-( <i>n</i> -C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> O-)	1	-	77	4	73
<b>I.27j</b>	3,4-bis( <i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> -)	2	sat.	6	57	-
<b>I.27k</b>	3,4-bis((CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> C=CHCH <sub>2</sub> O-)	2	sat.	6	-	-
<b>I.27l</b>	3,4-bis( <i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> -)	2	unsat.	22	40	-
<b>I.27m</b>	3,4-bis((CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> C=CHCH <sub>2</sub> O-)	2	unsat.	16	-	-

**Tableau I.10** : autres analogues de **BMS-181162**

En comparant les résultats des **tableaux I.9** et **I.10**, il est évident que les composés **I.27a** et **I.27b** sont plus efficaces que leurs homologues possédant une fonction éther comme lien entre les deux parties aromatiques (composés **I.27d** et **I.27e**).

Le nombre de carbones entre la fonction acide et le phényle a une influence sur l'activité. Cela est confirmé dans le **tableau I.10**, par la différence d'activité entre le composé **I.27d** ( $n = 0$ ) et le composé **I.27e** ( $n = 1$ ) ou encore entre **I.27f** ( $n = 0$ ) et **I.27i** ( $n = 1$ ). Lorsque  $n = 2$ , il peut y avoir une chaîne saturée (**I.27j** et **I.27k**) ou insaturée (**I.27l** et **I.27m**), dans ce cas, la chaîne insaturée semble plus bénéfique mais en définitive, l'ajout d'un deuxième carbone ne modifie que légèrement l'activité : les activités des composés **I.27l** et **I.27m** sont similaires à celle de leurs analogues.

Pour finir, les composés possédant une longue chaîne alkyle sur la partie hydrophobe des inhibiteurs tels que les composés **I.27h** et **I.27i** montrent une activité bien supérieure à celle

de **BMS-181162**. Ces chaînes peuvent être vues comme des mimes des chaînes hydrophobes des substrats naturels de la sPLA<sub>2</sub> ce qui expliquerait la meilleure affinité de ces composés pour le site actif.

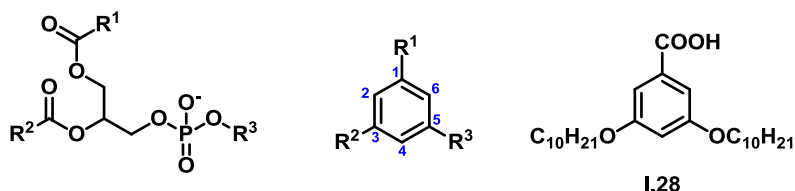
La relation structure/activité effectuée lors de ces travaux a mis en évidence deux éléments :

- il existe un nombre de carbones optimal entre l'acide et le phényle ( $n = 1$ )
- les groupements hydrophobes possédant une (ou deux) longues chaînes alkyles favorisent d'avantage l'inhibition.

Les composés **I.27b**, **I.27d** et **I.27i** ont été testés *in-vivo* pour la réduction de la taille d'un œdème de l'oreille chez les souris et il s'est avéré que tous ces composés sont plus actifs que **BMS-181162** (tableaux **I.9** et **I.10**).

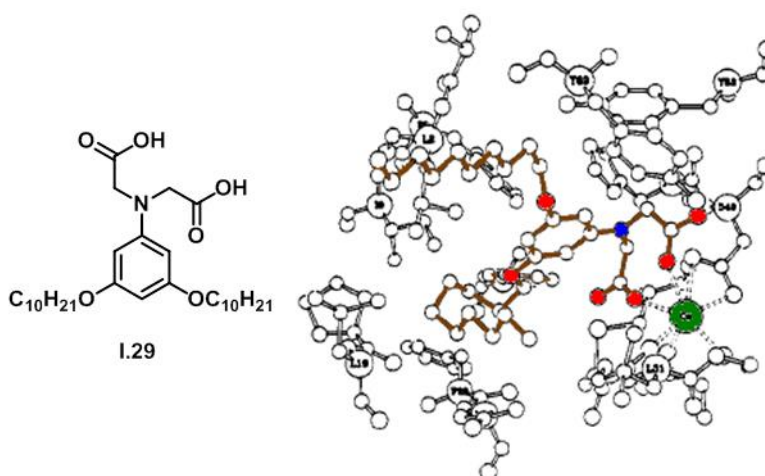
La découverte de l'activité inhibitrice des sPLA<sub>2</sub> par le **BMS-181162** est le résultat de l'utilisation d'un programme de docking. Cette technique a également été mise en place par les laboratoires Roche dans le but d'identifier un inhibiteur de sPLA<sub>2</sub> hGIIA.<sup>87</sup> Dans un premier temps, le programme a été utilisé pour docker un phospholipide à l'intérieur du site actif d'une sPLA<sub>2</sub> d'origine bovine. La modélisation de l'enzyme a pu être réalisée grâce à la structure cristallographique de cette sPLA<sub>2</sub>.<sup>88</sup> Le programme de docking (The Roche Interactive Molecular Graphics program<sup>89</sup>) a montré que l'oxygène de l'ester en position *Sn*-2 ainsi qu'un oxygène du phosphonate complexent le calcium du site actif, et que les deux chaînes alkyles du phospholipide sont placées dans une poche hydrophobe. Le but de cette étude était de valider le programme de docking.

Une fois le programme validé, les auteurs ont décidé de remplacer la partie glycérol du phospholipide par un cycle aromatique, les tests ont indiqué que les dérivés benzyliques substitués en position 1, 3 et 5 entraînent plus facilement à l'intérieur du site actif (**figure I.18**, au centre). Un composé **I.28** (**figure I.18** à droite) déjà présent dans la base de données s'est avéré être un inhibiteur de la sPLA<sub>2</sub> du fluide synoviale (sPLA<sub>2</sub> GIIA) avec une IC<sub>50</sub> de 3 μM.



**Figure I.18** : composés dockés dans le site actif de la sPLA<sub>2</sub> d'origine bovine

Pour augmenter l'activité des inhibiteurs, la fonction acide a été remplacée par des fonctions connues pour complexer le calcium. Le composé possédant le groupement acide diglycolamidique (**I.29**, **figure I.19**) est l'inhibiteur le plus puissant obtenu à l'issue du screening ( $IC_{50} = 0,087 \mu\text{M}$  sur la sPLA<sub>2</sub> humaine du placenta).



**Figure I.19** : composé **I.29** (à gauche) et modélisation de **I.29** dans le site actif de la sPLA<sub>2</sub> d'origine bovine (à droite),<sup>87</sup> les liaisons de l'inhibiteur est en marron, les atomes d'oxygène en rouge, l'atome d'azote en bleu et le calcium en vert.

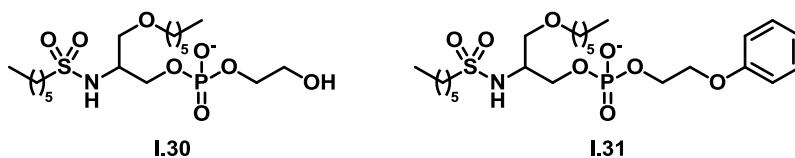
Le composé **I.29** est également actif sur les sPLA<sub>2</sub> présentes dans le fluide synovial ( $IC_{50} = 0,23 \mu\text{M}$ ) mais ce test a été réalisé sur une solution de sPLA<sub>2</sub> non-purifiée ce qui rend difficile l'interprétation du résultat. En revanche son action sur les phospholipases A<sub>2</sub> cytosoliques (cPLA<sub>2</sub>) peut être soit stimulante soit faiblement inhibitrice en fonction de la concentration de calcium utilisée lors des tests enzymatiques. Lorsque le test d'inhibition est réalisé avec une grande concentration de calcium (2 mM, concentration utilisée lors des tests sur les sPLA<sub>2</sub>), 50  $\mu\text{M}$  de composé **I.29** multiplie l'activité de l'enzyme par 1,5 alors qu'à faible concentration de calcium (0,8  $\mu\text{M}$ ) la molécule **I.29** inhibe faiblement la cPLA<sub>2</sub> ( $IC_{50} = 48 \mu\text{M}$ ). Pour finir, des rats souffrant d'arthrite à une patte ont été traités pendant une semaine avec une dose de 30 mg/kg/jour de composé **I.29**, ce qui a eu pour conséquence une diminution

de la taille de l'œdème des rats traités par rapport à celui des rats non traités. De même l'œdème provoqué par l'injection de venin de cobra est 40 % plus petit chez les rats ayant reçu une injection de composé **I.29** en prévention.

#### II.4. les sulfonamides et les oxoamides

Parmi les premiers inhibiteurs de sPLA<sub>2</sub> développés au cours des années 1980, se trouvent des analogues de l'état de transition dérivant des phospholipides tel que le composé **I.10** (**figure I.10**, page 21). La fonction ester en position *Sn*-2 du phospholipide a été remplacée par un phosphonate dans le but de mimer l'état de transition.<sup>70</sup>

D'après Yu et Dennis, le pKa de l'histidine du site catalytique de l'enzyme sPLA<sub>2</sub> extraite du fluide synovial (groupe IIA) est de 6,1<sup>90</sup> donc à pH physiologique, cette dernière est partiellement déprotonée permettant ainsi une liaison H avec un éventuel inhibiteur. Le groupement sulfonamide ayant un pKa aux alentours de 10 et étant plus flexible qu'un phosphonate, l'équipe de Pisabarro l'a incorporé dans un inhibiteur analogue du composé **I.10**. Cet inhibiteur présente une fonction sulfonamide à la place du groupement phosphonate (**figure I.20**).<sup>91</sup>



**Figure I.20** : composés dont le phosphonate en position *Sn*-2 a été remplacé par un sulfonamide

Le composé **I.30** est le premier à avoir été synthétisé et son activité inhibitrice est voisine de celle de l'inhibiteur **I.10**, les fractions molaires nécessaires à l'inhibition de 50 % de l'enzyme (Xi(50)) sont très proches pour les deux composés (Xi(50) (**I.30**) = 0,025 et Xi(50) (**I.10**) = 0,026). Devant ce résultat encourageant, les auteurs ont utilisé un programme de simulation moléculaire afin de choisir des substituants permettant d'augmenter l'activité. Après avoir vérifié que la position du ligand **I.30** obtenue par simulation moléculaire était similaire à la pose de **I.10** dans le site actif de la sPLA<sub>2</sub> (structure obtenue par diffraction aux rayons X<sup>76</sup>), les auteurs ont montré que la fonction hydroxyle de ce dernier se trouve à proximité d'une

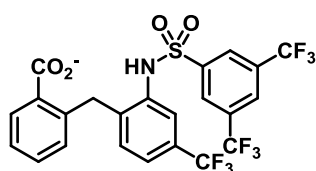


poche hydrophobe. Une possibilité d'augmenter l'activité du dérivé sulfonamide serait de remplacer cette fonction hydroxyle par une fonction éther possédant un groupement hydrophobe. Grâce à un programme de "docking" (LUDI), dix groupements hydrophobes ont été testés et le meilleur résultat a été obtenu pour le composé **I.31** (figure I.20). Cette molécule provoque 30 % d'inhibition de plus par rapport au composé **I.30**.

Les deux inhibiteurs **I.30** et **I.31** ont également été testés sur la sPLA<sub>2</sub> de type pancréatique (GIB) mais l'inhibition provoquée par **I.30** est réduite de 23 % et celle du composé **I.31** est réduite de 58 % ce qui tend à montrer une spécificité de la part des dérivés sulfonamides envers les sPLA<sub>2</sub> du groupe GII. Cette spécificité peut s'expliquer par la présence d'une poche hydrophobe dans le site actif de la sPLA<sub>2</sub> GIIA qui est absente dans le site actif de la sPLA<sub>2</sub> GIB.

L'absence d'IC<sub>50</sub> rend difficile la comparaison entre ces inhibiteurs de type sulfonamide et ceux décrit précédemment.

A la même période, l'équipe de Mayer a mis au point un inhibiteur de PLA<sub>2</sub> possédant également une fonction sulfonamide, le **SB 203347** (figure I.21).<sup>92</sup> En plus de la fonction sulfonamide qui peut établir une liaison hydrogène avec l'histidine du site actif, ce dernier possède un groupement carboxylate qui peut lier le calcium.



SB 203347

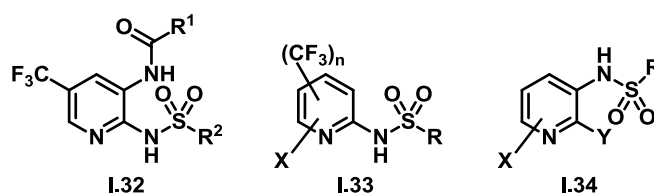
**Figure I.21** : composé publié par Mayer *et coll.*

Ce composé a été testé sur trois PLA<sub>2</sub> : une PLA<sub>2</sub> de 85 kDa (cPLA<sub>2</sub>), une sPLA<sub>2</sub> de type GII et une sPLA<sub>2</sub> de type GI mais d'origine bovine. Les IC<sub>50</sub> sont révélatrices de la spécificité de **SB 203347**, IC<sub>50</sub> = 0,5 μM sur la sPLA<sub>2</sub> GII, IC<sub>50</sub> = 20 μM sur la cPLA<sub>2</sub> et IC<sub>50</sub> = 1,2 μM sur la sPLA<sub>2</sub> GI d'origine bovine.

Des tests *in-vivo* sur des souris ayant reçu une dose de **SB 203347** en prévention d'une injection d'endotoxine ont montré l'efficacité de ce composé. Sur les 32 souris ayant reçu 30 mg/kg de **SB 203347** avant l'endotoxine, 12 ont survécu plus de 72h contre aucune parmi le

groupe de contrôle. La proportion de survivantes augmente à 6 sur 12 si la dose d'inhibiteur reçue est de 100 mg/kg. La spécificité de **SB 203347** envers les sPLA<sub>2</sub> du groupe GII met donc en évidence le rôle de cette enzyme lors des réponses inflammatoires.

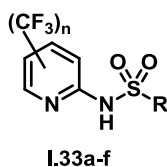
Le cycle pyridine substituée par un groupement trifluorométhyle est un élément que l'on retrouve dans plusieurs composés biologiquement actifs.<sup>93</sup> Une série de composés, possédant ce groupement, a été étudiée au milieu des années 1990 comme inhibiteurs de sPLA<sub>2</sub> (**figure I.22**, composé **I.32**).<sup>94</sup>



**Figure I.22** : dérivés de trifluorométhyle pyridine

Dix-huit composés dérivés du composé **I.32** ont été synthétisés avec des groupements alkyles cycliques ou linéaires en remplacement de R<sup>1</sup> et R<sup>2</sup>. Ils ont ensuite été testés sur la sPLA<sub>2</sub> pancréatique du porc (GIB), le composé le plus actif possède une IC<sub>50</sub> de 0,13 mM (R<sup>1</sup> = butyle, R<sup>2</sup> = cyclohexyle) mais avec une solubilité faible (<1 mg/ml). Malgré cette faible activité, un élément ressort de la relation structure/activité : les composés ayant un cyclohexyle en position R<sup>2</sup> ont une IC<sub>50</sub> est inférieure à 1 mM.

Uenishi *et coll.* ont entrepris d'augmenter l'activité des dérivés de trifluorométhyle<sup>95</sup> pyridine au début des années 2010. Dans un premier temps, les modifications apportées au composé **I.32** ont conduit à une série de vingt-cinq composés de type **I.33** (**figure I.22**). Les auteurs ont effectué plusieurs changements sur le composé **I.32** tels que le retrait du groupement amide, l'ajout d'un autre groupement sur le cycle mais à une position différente ou encore, le déplacement du groupement CF<sub>3</sub>. L'activité biologique de ces composés a été également évaluée sur la sPLA<sub>2</sub> pancréatique du porc (GIB). Sur les vingt-cinq composés, seuls six sont présentés dans le cadre d'une étude de relation structure/activité (**tableau I.11**).



composé	Position (CF <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	R	Inhibition à 0,5 mM (%)	IC <sub>50</sub> (mM)
I.33a	4,5-	n-Pr	4,3	-
I.33b	4,5-	4-CF <sub>3</sub> -Ph	36,1	0,58
I.33c	4,5-	2-naphtyl	34,6	0,68
I.33d	4,6-	4-Cl-Phe	26,7	0,66
I.33e	5-	Et	4,6	-
I.33f	4,6-	Et	23	-

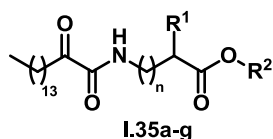
**Tableau I.11** : activités des composés de la série **I.33**

Il semble que les modifications apportées par l'équipe de Uenishi ne soient pas favorables à une augmentation de l'inhibition de la sPLA<sub>2</sub> GIB d'origine porcine étant donné que le meilleur inhibiteur du groupe de molécules **I.33** est moins performant que celui du groupe de molécules **I.32** (IC<sub>50</sub> (**I.32**) = 0,13 mM et IC<sub>50</sub> (**I.33b**) = 0,58 mM). Néanmoins, dans la série des composés **I.33**, la présence de deux groupements électroattracteurs sur le cycle pyridine permet d'augmenter l'activité (**tableau I.11**, composé **I.33b** par rapport aux composés **I.33e** et **I.33f**) et il semble que la position de ces groupements électroattracteurs ne soit pas un élément déterminant de l'activité des inhibiteurs (**tableau I.11**, composés **I.33c** et **I.33d**).

L'équipe de Uenishi a ensuite publié une nouvelle série d'inhibiteurs présentant le groupement sulfonamide en position *mé*ta par rapport à l'azote du cycle pyridine (composé **I.34**, **figure I.22**). Le meilleur inhibiteur de cette série a une IC<sub>50</sub> de 90 µM sur la sPLA<sub>2</sub> pancréatique du porc (X = 5-CF<sub>3</sub>, Y = OC<sub>6</sub>H<sub>3</sub>(2,4-F<sub>2</sub>) et R = 2-naphtyle), ce résultat est très encourageant seulement, la spécificité de cette nouvelle série d'inhibiteurs n'a pas été discutée.

Les dérivés oxoamides sont principalement connus pour être des inhibiteurs de phospholipases A<sub>2</sub> cytosoliques,<sup>96</sup> néanmoins certains dérivés oxoamides ont été testés sur des sPLA<sub>2</sub> et notamment sur hGV<sup>96b, 97</sup> sans montrer d'activité ni de spécificité. Récemment, une nouvelle étude axée sur les sPLA<sub>2</sub> hGIIA, hGV et hGX a montré des résultats intéressants. En effet, une dizaine de dérivés oxoamides basés sur des acides aminés ont été

synthétisés<sup>98</sup> et testés ce qui a permis d'effectuer une relation structure/activité (**tableau I.12**).



composé	n	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> (IIA) (μM)
<b>I.35a</b>	0	H	H	4,20
<b>I.35b</b>	1	H	H	5,60
<b>I.35c</b>	3	H	H	11,7
<b>I.35d</b>	0	H	Me	-
<b>I.35e</b>	0	(S)-iBu	H	0,30
<b>I.35f</b>	0	(R)-iBu	H	1,75
<b>I.35g</b>	0	(S)-Bn	H	-

**Tableau I.12** : activités des composés de type **I.35**

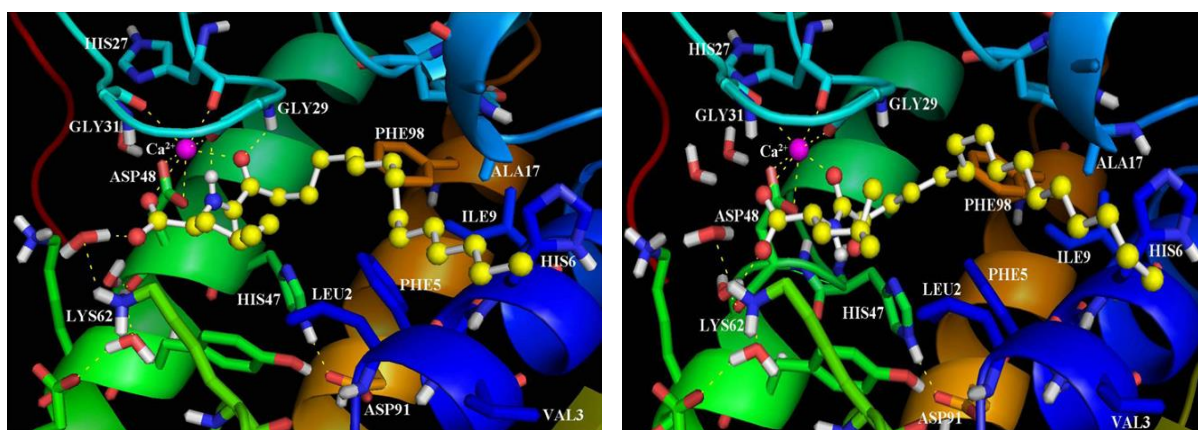
Les résultats concernant l'inhibition de hGV et hGX ne sont pas présents dans le tableau car les composés n'ont pas montré d'activité significative à une concentration de 16,6 μM qui est la concentration maximale lors de ces tests.

Plusieurs éléments concernant la relation structure/activité ont été retenus :

- Plus le groupement acide est éloigné du groupement oxoamide, moins l'inhibition est efficace (**tableau I.12**, composés **I.35a**, **I.35b** et **I.35c**) (un carbone semble être la distance la plus favorable),
- La présence d'un acide carboxylique est une condition nécessaire à l'inhibition (**tableau I.12**, composés **I.35a** et **I.35d**)
- L'ajout d'une chaîne latérale peut également augmenter l'activité si la stéréochimie du composé est (S) dans le cas contraire, l'inhibiteur est moins actif (**tableau I.12**, composés **I.35e** et **I.35f**).

A l'origine, le groupement 2-oxoamide avait été choisi pour inhiber la cPLA<sub>2</sub> hGIV en se liant au groupement hydroxyle de la sérine catalytique du site actif.<sup>99</sup> L'activité des dérivés 2-oxoamides sur la sPLA<sub>2</sub> hGIIA ne peut pas être expliquée par la même interaction puisque la cPLA<sub>2</sub> hGIV fait intervenir la sérine lors de l'hydrolyse alors que la sPLA<sub>2</sub> hGIIA fait intervenir la dyade acide aspartique/histidine. Pour comprendre l'inhibition des dérivés 2-oxoamides

sur la sPLA<sub>2</sub> hGIIA, une étude de simulation moléculaire utilisant le logiciel Gold a été menée sur quatre inhibiteurs (**I.35a**, **I.35e**, **I.35f** et **I.35g**). Le composé **I.35e** est le composé le plus actif de cette série, et d'après les données obtenues par la simulation moléculaire, la fonction acide de ce composé interagit avec l'amine d'une glycine (G29) du site actif au moyen d'une liaison hydrogène. Une deuxième liaison hydrogène existe entre le NH de la fonction 2-oxoamide de l'inhibiteur et le carbonyle de la même glycine. De plus, le carbonyle du composé **I.35e** interagit avec le calcium et il existe une interaction aliphatique/aliphatique entre une leucine (L2) du site actif et la chaîne latérale de l'inhibiteur et enfin la longue chaîne alkyle de l'inhibiteur se situe dans une poche hydrophobe (**figure I.23** à gauche).



**Figure I.23** : Image de simulation moléculaire du composé **I.35e** dans le site actif de la sPLA<sub>2</sub> hGIIA (à gauche) et du composé **I.35f** dans le site actif de la sPLA<sub>2</sub> hGIIA (à droite)<sup>98</sup>

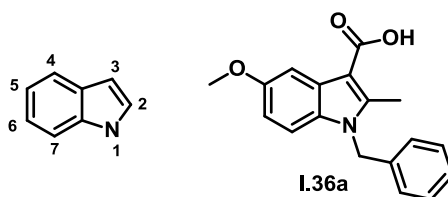
La différence d'activité entre **I.35e** et **I.35f** qui est son énantiomère peut être expliquée par le positionnement du composé **I.35f** dans le site actif. Même si les interactions entre le groupe oxoamide et le calcium sont conservées, les deux liaisons hydrogène entre l'inhibiteur et la glycine ont disparu (**figure I.23**, à droite).

Les dérivés sulfonamides et oxoamides ne sont pas les composés les plus actifs contre les sPLA<sub>2</sub>. Néanmoins, ils offrent une diversité intéressante et peuvent s'avérer très actifs et sélectifs (exemple le composé **I.35e**).

## II.5 Les dérivés de type indole et indolizine

### II.5.a Indoles

En 1995, grâce à une technique de screening à haut débit, les chercheurs du laboratoire Lilly ont identifié un inhibiteur très puissant de sPLA<sub>2</sub> basé sur un noyau indole.<sup>100</sup> Ce screening consistait en la mesure de l'activité de la sPLA<sub>2</sub> hGIIA sur des membranes marquées au <sup>14</sup>C d'*Escherichia coli* en présence d'un inhibiteur.<sup>101</sup> Ce test a permis de sélectionner les composés ayant une IC<sub>50</sub> inférieure à 50 µM mais un trop grand nombre de molécules ayant été sélectionnées, un second test s'est avéré nécessaire. Ce second test a pour but de réduire le nombre d'inhibiteur et de vérifier que l'activité détectée est due à l'inhibition de l'enzyme et non à la perturbation non-spécifique de cette dernière ou de la membrane. Ce test est réalisé sur des bandes de tissus extraits de la paroi des poumons de cochon d'Inde, l'action des sPLA<sub>2</sub> sur ces tissus entraîne une contraction musculaire qui peut être mesurée. Cette contraction dépend de la quantité d'acide arachidonique qui est produite par la sPLA<sub>2</sub>.<sup>102</sup> Lors de ce deuxième test, seul le composé **I.36a** (figure I.24) s'est avéré actif avec une IC<sub>50</sub> = 13,6 ± 4,2 µM. Des tests de co-cristallisation du composé **I.36a** et de la sPLA<sub>2</sub> hGIIA ont mis en évidence la présence de l'inhibiteur à l'intérieur du site actif mais sans interaction avec le calcium.



**Figure I.24** : numérotation des positions sur le cycle indole (à gauche) et composé **I.36a** (à droite)

En premier lieu, les auteurs ont cherché à modifier la fonction acide en position 3 du cycle indole. Plusieurs groupements ont été testés tels qu'un amide, un thioamide, un ester... Le meilleur résultat a été obtenu pour la fonction amide (composé **I.36b**, schéma I.2) avec une IC<sub>50</sub> de 0,84 ± 0,17 µM.<sup>100a</sup> D'après la structure cristallographique de la sPLA<sub>2</sub> hGIIA avec **I.36b**, le carbonyle de la fonction amide est lié au calcium, il existe également une liaison hydrogène entre le NH amidique et une histidine, de plus le méthyle de la position 2 se

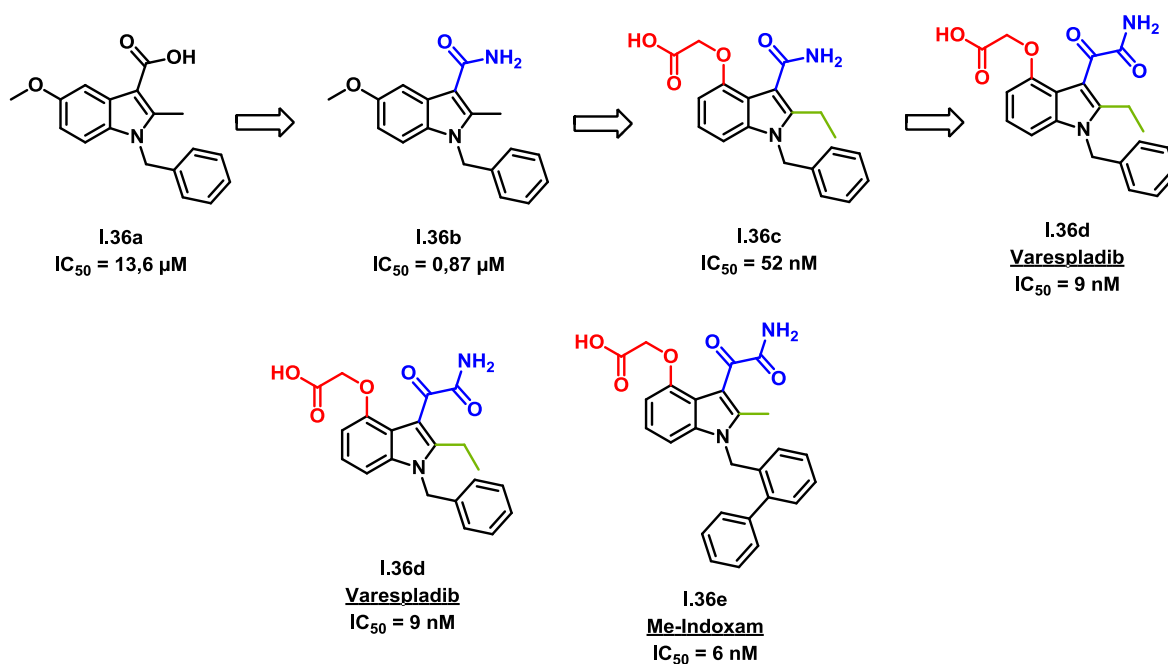
trouve à l'entrée d'une petite poche hydrophobe, ce qui explique que les groupements hydrophobes légèrement plus gros que le méthyle tels qu'un éthyle ou un dérivé halogéné augmentent l'activité mais seulement de façon modeste. Le remplacement du groupe méthoxy en position 5 par des groupements aryles, alkoxy ou alkyles ne produit pas de modification importante de l'activité tout comme le remplacement du groupe benzyle en position 1 par un groupe alkyle ou benzyle substitué.

La comparaison entre les structures cristallographiques de la sPLA<sub>2</sub> avec un analogue d'état de transition (TSA) ou un analogue de substrat amide (ASA) et avec le composé **I.36b** a mis en évidence la superposition du cycle indole de **I.36b** avec le squelette glycérol des analogues mais la fonction amide de **I.36b** ne fait qu'une seule interaction avec le calcium alors que les groupements phosphonates du TSA en font deux. L'ajout d'un groupement acide sur les positions 4 ou 5 du cycle indole aurait l'avantage de créer cette interaction manquante. Une nouvelle étude de relation structure/activité a permis l'obtention d'un nouveau composé **I.36c** (**schéma I.2**) qui possède une fonction acide en position 4 du cycle indole<sup>100b</sup> et une IC<sub>50</sub> de 52 nM. Cette relation structure/activité a révélé plusieurs éléments :

- un lien éther avec deux carbones entre l'oxygène et la fonction acide est préférable si le groupement se trouve sur la position 5 du cycle indole. En revanche, s'il est sur la position 4, un seul carbone est suffisant pour atteindre le calcium.
- il est possible de remplacer l'oxygène du lien éther par un soufre ou un carbone sans perdre d'activité mais l'azote est exclu.
- il est également possible de remplacer l'acide par un amide ou par un acide sulfonique.

Pour finir, une troisième étude a montré l'intérêt de remplacer l'amide par une fonction oxoamide<sup>100c</sup> donnant ainsi les composés **I.36d** et **I.36e** (**schéma I.2**) possédant une IC<sub>50</sub> de 9 nM et de 6 nM sur la sPLA<sub>2</sub> hGIIA respectivement connus sous le nom de **Varespladib** et **Me-Indoxam**. Au total, ce sont un peu moins de 200 composés qui ont été synthétisés et testés, parmi eux 115 composés ont une IC<sub>50</sub> < 1 µM.

Les différentes étapes de la découverte de la structure du **Varespladib** sont représentées dans le **schéma I.2**.



**Schéma I.2:** évolution des dérivés indoles jusqu'au **Varespladib**

D'après la structure cristallographique de sPLA<sub>2</sub> hGIIA en présence de **Varespladib**, les carbonyles de l'oxoamide et du carboxylate interagissent avec le calcium, et il existe une liaison hydrogène entre l'histidine 48 et un oxygène de l'oxoamide.

Quelques dérivés indoles ont également été testés sur la sPLA<sub>2</sub> hGIB et la sPLA<sub>2</sub> pGIB (sPLA<sub>2</sub> du groupe IB d'origine porcine) et les activités de ces composés sont toutes inférieures à 1 µM sur les deux enzymes par exemple pour le **Varespladib**  $IC_{50}$  (hGIB) = 228 nM et  $IC_{50}$  (pGIB) = 48 nM. Plus récemment, l'équipe de Gelb a montré que le **Varespladib** inhibait également les sPLA<sub>2</sub> hGV et hGX.<sup>103</sup> En revanche, le **Varespladib** n'est pas actif sur les cPLA<sub>2</sub> ainsi que sur les cyclooxygénases 1 et 2 (enzymes impliquées dans la synthèse d'icosanoïdes à partir d'acide arachidonique).<sup>104</sup> Il est donc rationnel de penser que l'activité anti-inflammatoire du **Varespladib**, observée *in-vivo* chez des souris et des cochons d'Inde est due, à l'inhibition des sPLA<sub>2</sub> mais pas uniquement à celle de la sPLA<sub>2</sub> hGIIA.

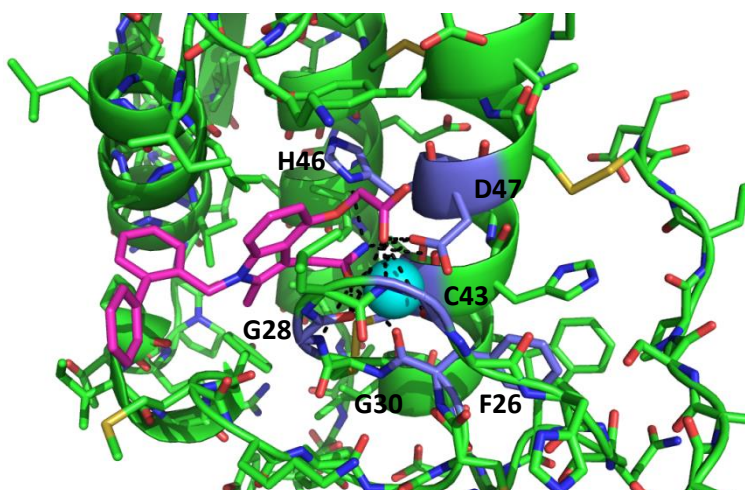
L'administration préventive de **Varespladib** permet de décroître la mortalité de rats souffrants de pancréatite aiguë (inflammation rapide du pancréas). Le **Varespladib** est très actif sur la hGIB qui est impliquée dans cette pathologie.<sup>105</sup>

En ce qui concerne les tests cliniques, le **Varespladib** a été sélectionné comme molécule thérapeutique contre le sepsis (maladie inflammatoire du sang), la phase I des essais cliniques (évaluation de la tolérance et de l'absence d'effets indésirables chez des sujets sains) a été



concluante mais lors de la phase II, un manque d'efficacité a été observé. Les essais cliniques ont donc été arrêtés.<sup>106</sup> Devant cet échec, les laboratoires Lilly ont synthétisé le médicament prodrogue correspondant : le **Méthyl-Varespladib** qui possède un ester méthylique à la place de l'acide et qui s'hydrolyse directement en **Varespladib** une fois dans l'organisme. Ce composé a été notamment utilisé pour connaître le rôle de la sPLA<sub>2</sub> hGIIA dans la colite (inflammation du côlon) chez des rats<sup>107</sup> ou encore pour déterminer si la sPLA<sub>2</sub> hGIIA a un rôle dans l'asthme.<sup>108</sup> Le **Méthyl-Varespladib** est également étudié sur différentes pathologies où la sPLA<sub>2</sub> hGIIA est impliquée telles que l'athérosclérose.<sup>109</sup> Actuellement ce composé est en phase II des essais cliniques contre l'athérosclérose<sup>110</sup> il a été jusqu'en phase III concernant le syndrome coronarien aigu mais a été arrêté pour manque d'efficacité.<sup>111</sup>

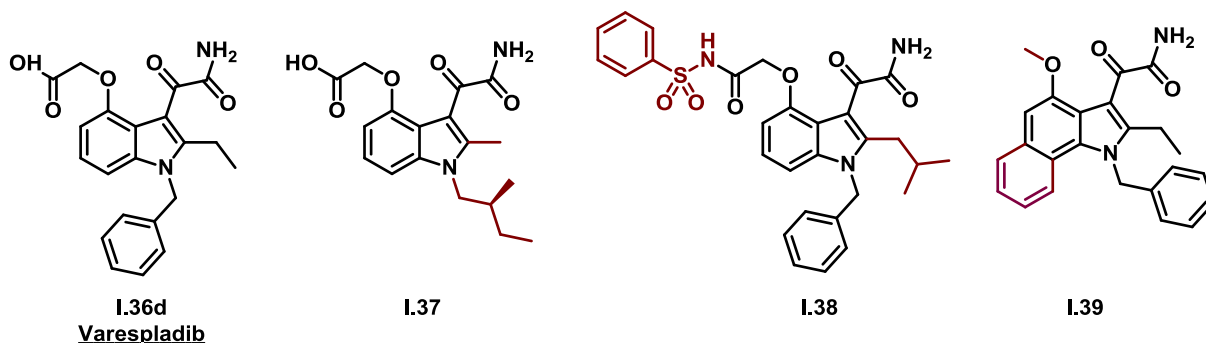
A la suite de ces travaux concernant les cycles indoles, d'autres groupes ont diversifié la structure indole notamment le groupe de Michael Gelb dans les années 2000. Le **Me-Indoxam** a été testé sur toutes les sPLA<sub>2</sub> humaines et murines sauf sur la mGIII et mGXIIA. Les enzymes peuvent être classées en trois catégories selon l'activité du **Me-Indoxam** : bonne activité sur mGIIA, hGIIA, mGIIC, mGIIE, hGIIE, mGV, et hGV (IC<sub>50</sub> ~ 0,01–0,02 µM), activité moyenne sur mGIB, hGIB, mGX, et hGX (IC<sub>50</sub> ~ 0,1–1 µM) activité faible sur mGIID, hGIID, mGIIF, hGIIF, et hGXIIA (IC<sub>50</sub> > 10 µM). En utilisant les données de co-cristallisation de la sPLA<sub>2</sub> hGX avec le **Me-Indoxam** (figure I.25), l'équipe de Gelb a cherché à synthétiser des dérivés indoles spécifiques des différentes sPLA<sub>2</sub>.



**Figure I.25** : sPLA<sub>2</sub> hGX co-cristallisé avec le **Me-Indoxam** (rose) (les acides aminés liés à l'inhibiteur sont en bleu)

Le **Me-Indoxam** interagit avec l'histidine catalytique (H46), l'acide aspartique (D47), deux glycines (G28 et G30), une phénylalanine (F26) et une cystéine (C43).

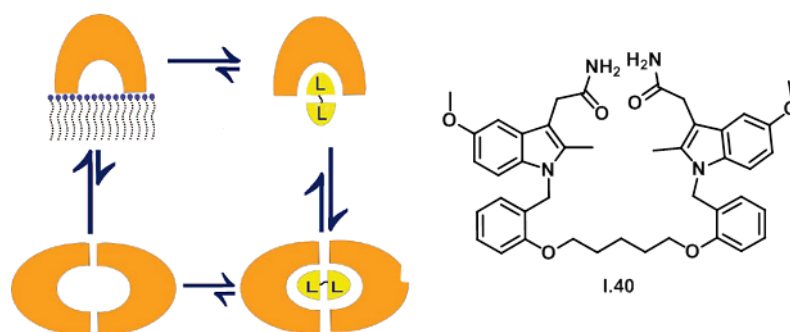
Sur la centaine de composés synthétisés et testés, trois ont fait preuve d'une spécificité notable (**figure I.26**).



**Figure I.26** : Varespladib et ses dérivés ayant montrés une spécificité dans l'inhibition

Le composé **I.37** inhibe 86 % de la sPLA<sub>2</sub> hGV à 0,33 µM et seulement 22 % de la hGIIA à la même concentration<sup>112</sup>. Le dérivé indole **I.38** a un IC<sub>50</sub> de 21 ± 7 nM sur la sPLA<sub>2</sub> hGX alors qu'il est supérieur à 1600 nM sur les autres sPLA<sub>2</sub> et le composé **I.39** est un peu moins sélectif puisqu'il est actif sur trois sPLA<sub>2</sub> : IC<sub>50</sub> (hGIIA) = 14 ± 2 nM ; IC<sub>50</sub> (mGIIA) = 34 ± 1 nM ; IC<sub>50</sub> (hGIIIE) = 20 ± 6 nM.<sup>113</sup>

Jusqu'à présent, l'inhibition des sPLA<sub>2</sub> consistait en l'introduction d'une molécule dans le site actif, un groupe de l'université de Pékin a modifié cette façon d'inhiber en synthétisant des dimères de dérivés indoles qu'ils ont testé sur la sPLA<sub>2</sub> hGIIA.<sup>114</sup> Le but de ce type de molécules est de favoriser la dimérisation des enzymes entraînant ainsi la non-adsorption de ces dernières à la surface lipidique (**figure I.27**).

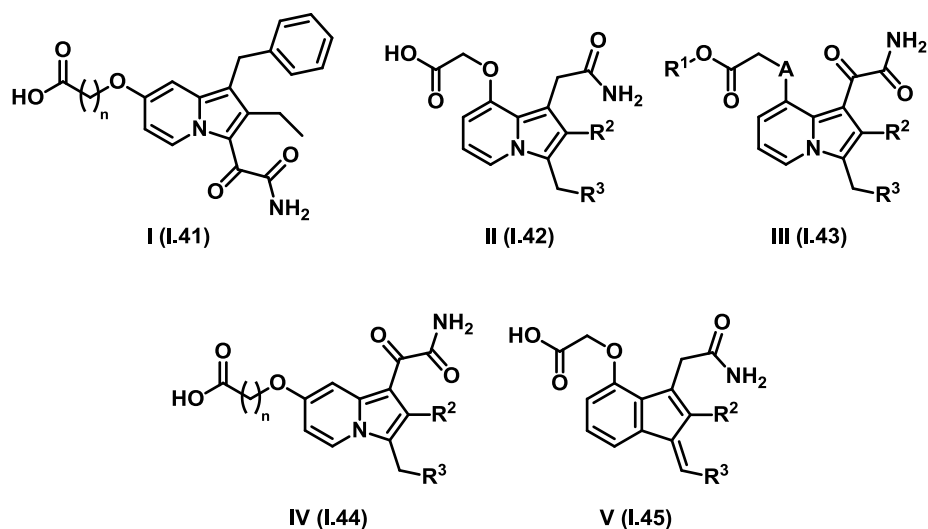


**Figure I.27** : principe de l'inhibition par dimérisation

Les auteurs ont fait le choix des dérivés indoles pour créer leurs dimères en raison de leur forte affinité pour le site actif des enzymes. Onze dimères ont été synthétisés avec des longueurs de chaînes entre les deux indoles différentes et des positions différentes pour le lien. Une chaîne courte permet d'obtenir un inhibiteur plus rigide et donc plus actif néanmoins si la chaîne est trop courte, la dimérisation des enzymes ne peut pas avoir lieu. La longueur optimale est de cinq carbones, le meilleur inhibiteur est le composé **I.40** (figure **I.27**) avec une  $IC_{50}$  de  $24 \pm 8$  nM, le dimère est donc un meilleur inhibiteur que le monomère ( $IC_{50} = 0,84 \pm 0,17$   $\mu$ M).

### II.5.b. Indolizines

A la même période que les laboratoires Lilly, les laboratoires Shionogi ont proposé un nouveau type d'inhibiteurs de sPLA<sub>2</sub> basé sur le cycle indolizine. Les auteurs ont synthétisés 65 composés regroupés en 5 catégories : I, II, III, IV et V (figure **I.28**).



**Figure I.28** : les dérivés indolizines et indènes synthétisés

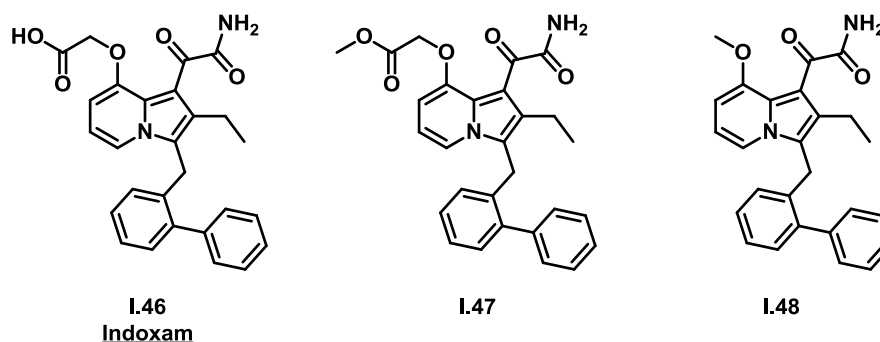
Les composés de type I ont les mêmes substituants que le **Varespladib** (schéma **I.2**) mais à des positions différentes sur le cycle indolizine. Ils n'ont aucune activité ce qui permet d'affirmer que les inhibiteurs de ce type ont une position préférentielle à l'intérieur du site actif.

Les composés de type II, possèdent des groupements similaires à I mais à des positions conformes au dérivés des laboratoires Lilly, ils ont une bonne activité ( $IC_{50}$  entre 13 et 30 nM) quelque soit les groupements  $R^2$  et  $R^3$  mais leur manque de stabilité a entraîné la synthèse des dérivés III avec le groupement oxoamide.

Les composés de la série III qui possèdent la plus grande activité sont ceux possédant un benzyle substitué en position *ortho* par des groupements électro-attracteurs en position 3. Il est intéressant de noter que lorsque A = NH (composé de type III, **figure I.28**) au lieu de O il y a une perte de l'activité ( $IC_{50} = 8$  nM pour X = O et  $IC_{50} > 50$   $\mu$ M pour X = NH). Cette grande différence d'activité peut être expliquée par la présence d'une liaison hydrogène entre l'amine et le carbonyle du carboxylate.

Les composés les plus actifs avaient jusqu'à présent  $R^1 = H$  mais il est possible de remplacer ce dernier par des fonctions complexant le calcium tels qu'un groupement tétrazole, une pyridine ou une quinoline. Les composés de type IV sont moins actifs que leurs analogues III ( $IC_{50}$  entre 13 et 30 nM pour les composés de type II et  $IC_{50}$  entre 140 et 3400 nM pour les composés de type IV), le même phénomène a été observé pour les dérivés indoles. Il en est de même pour les dérivés indènes V qui sont dix fois moins actifs que les dérivés indolizines correspondants. Il semble que le squelette de l'inhibiteur ait besoin d'être riche en électron pour favoriser l'inhibition des sPLA<sub>2</sub>.

Le plus connu de ces inhibiteurs de type indolizine est l'**Indoxam** (composé **I.46**, **figure I.29**), il possède une  $IC_{50} = 6$  nM sur la sPLA<sub>2</sub> hGIIA. Mais les dérivés indolizines étant sensibles à l'oxydation, ils ne peuvent pas être développés dans les tests cliniques.



**Figure I.29** : Indoxam et ses dérivés

Lors de son étude de diversification des inhibiteurs de type indole, Gelb et son équipe ont également synthétisé des dérivés indolizines. Le but étant de rendre ces inhibiteurs aussi actifs que l'**Indoxam** (activité sur sPLA<sub>2</sub> hGIIA (IC<sub>50</sub> = 60 ± 10 nM), mGIIA (IC<sub>50</sub> = 150 ± 40 nM), hGIIIE (IC<sub>50</sub> = 10 ± 2 nM), mGIIIE (IC<sub>50</sub> = 35 ± 15 nM), hGV (IC<sub>50</sub> = 100 ± 5 nM) et mGV (IC<sub>50</sub> = 170 ± 10 nM)<sup>113</sup> mais plus spécifiques. Deux composés correspondent aux critères d'activité et de sélectivité : le composé **I.47 (figure I.29)** qui est actif sur hGIIA (IC<sub>50</sub> = 30 ± 10 nM), hGIIIE (IC<sub>50</sub> = 90 ± 15 nM) mais un peu moins actif sur mGIIIE (IC<sub>50</sub> = 410 ± 20 nM) et le composé **I.48 (figure I.29)** qui est quant à lui actif sur hGIIA (IC<sub>50</sub> = 35 ± 2 nM), hGIIIE (IC<sub>50</sub> = 50 ± 10 nM) et moins sur mGIIIE (IC<sub>50</sub> = 230 ± 110 nM).

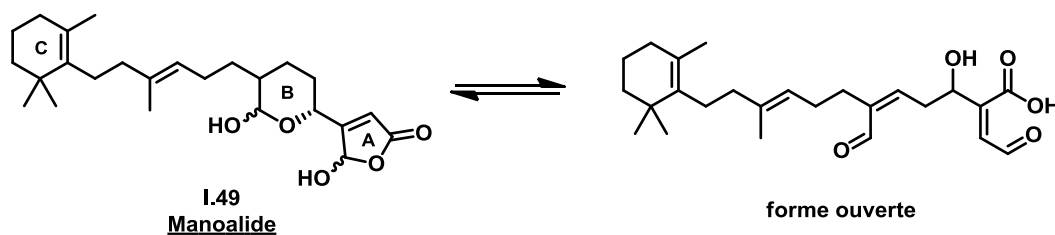
Les dérivés indoles et indolizines sont les inhibiteurs les plus puissants de sPLA<sub>2</sub>. Pour les meilleurs d'entre eux, leurs IC<sub>50</sub> sont à la limite de ce qui est détectable au cours des tests enzymatiques. Le principal inconvénient de ces cycles est le manque de spécificité mais en ce moment plusieurs groupes dont celui de Gelb travaillent à rendre ces molécules spécifiques de chaque sPLA<sub>2</sub>.

## II.6. Les inhibiteurs d'origine naturelle

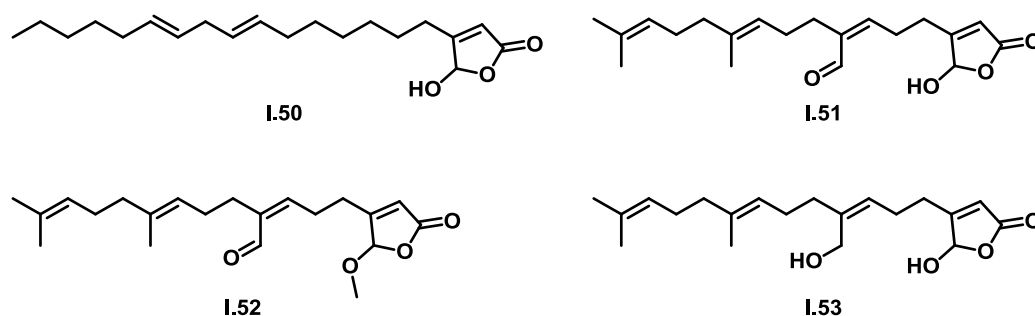
Il existe un grand nombre de molécules naturelles présentant une activité anti-inflammatoire que l'on peut attribuer à l'inhibition des sPLA<sub>2</sub>.<sup>115</sup>

### II.6.a. Les inhibiteurs se liant de façon covalente à une Lysine de l'enzyme

Le **manoalide (I.49, figure I.30)** est un sesterterpénoïde non-stéroïdien extrait d'une éponge : *Luffariella variabilis* que l'on trouve dans le bassin Indo-Pacifique. Cette molécule a été extraite et identifiée au début des années 1980.<sup>116</sup> Le **manoalide** possède une activité inhibitrice sur la sPLA<sub>2</sub> du venin de cobra,<sup>117</sup> la sPLA<sub>2</sub> extraite du venin d'abeille<sup>118</sup> et la sPLA<sub>2</sub> hGIIA.<sup>119</sup>

**Figure I.30 : Manoalide**

L'existence de la forme ouverte à des pH compris entre 4 et 9 a été mise en évidence par RMN. Des études menées dans le laboratoire de Dennis ont montré que le **manoalide** inhibait de façon irréversible et dépendante du temps la sPLA<sub>2</sub> issue du venin de cobra. Cette inactivation de l'enzyme est accompagnée d'une modification d'une ou plusieurs lysines. Une première étude réalisée sur le manoalide a mis en évidence le rôle du cycle  $\gamma$ -lactone (A), et de hémiacétale (B) ainsi que de la partie hydrophobe (C) (**figure I.30**). En effet, sur les quatre analogues du **manoalide** qui ont été synthétisés (**figure I.31**), aucun n'a fait preuve d'une inhibition comparable à celle du produit original sur la sPLA<sub>2</sub> du venin de cobra.

**Figure I.31 : analogues de manoalide**

Le composé **I.50** est capable d'inhiber l'enzyme mais de façon réversible et indépendante du temps ce qui suggère que la présence seule du cycle  $\gamma$ -lactone (A) n'est pas suffisante pour expliquer l'activité irréversible du **manoalide**. Les composés **I.52** et **I.53** ne provoquent pas de modification des lysines de l'enzyme. Or les modifications apportées sur ces composés empêchent l'ouverture du cycle  $\gamma$ -lactone (A), et donc la formation du complexe enzyme-inhibiteur. Ce qui met en évidence la nécessité du cycle B. Le composé **I.51** peut se fixer sur les lysines de la protéine et donc inhiber de façon irréversible la protéine. En revanche, l'inhibition est plus rapide avec le **manoalide** qu'avec le composé **I.51**. L'absence du groupement hydroxyle et du groupement hydrophobe sur le composé **I.51** peuvent

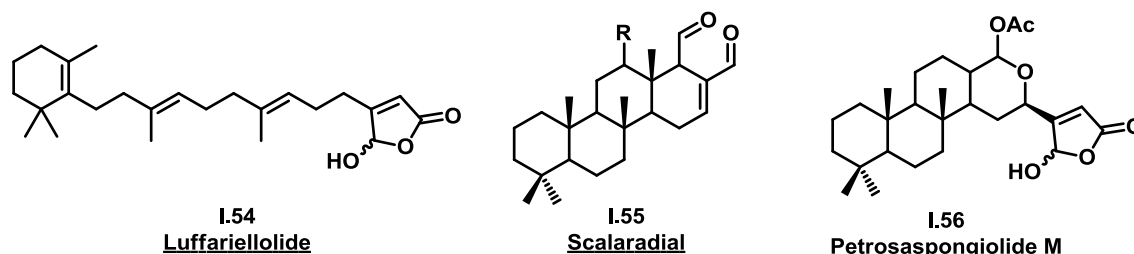
expliquer cette différence de réactivité. Ces deux éléments jouent donc un rôle lors de la désactivation de la sPLA<sub>2</sub> par le **manoalide**.

L'inhibition de l'enzyme par le **manoalide** se fait en plusieurs étapes.<sup>120</sup> La première est la formation d'une imine entre une lysine et un aldéhyde de l'inhibiteur. Cette étape dure moins de cinq minutes pendant lesquelles l'utilisation d'hydroxylamine permet de "réactiver" l'enzyme (l'hydroxylamine étant connue pour hydrolyser les imines). Une fois ces cinq minutes écoulées, l'action de l'hydroxylamine est moins efficace ce qui suggère une deuxième étape différente de la première. Pour l'instant, seules des hypothèses ont été émises telles que :

- la formation d'un deuxième adduit entre le deuxième aldéhyde du **manoalide** ouvert et un nucléophile qui ne serait pas une lysine.
- l'existence d'une liaison hydrogène entre le cycle B et un acide aminé.
- la modification conformationnelle de la protéine après la formation de l'adduit et qui empêcherait l'hydrolyse de l'imine par l'hydroxylamine.

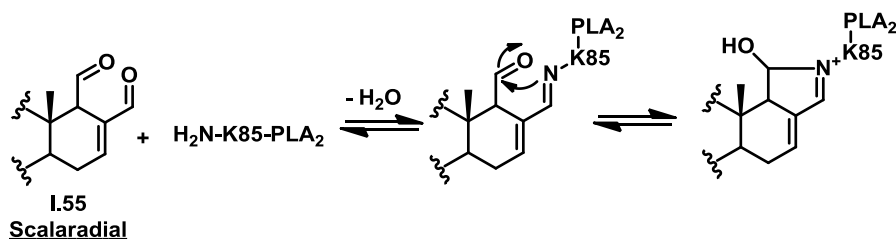
Les résidus lysines subissant l'action du **manoalide** ont été identifiés par remplacement des lysines de la sPLA<sub>2</sub> du venin de cobra par des arginines ou des méthionines.<sup>121</sup> Lorsque les lysines K6 ou K79 sont remplacées, l'inhibition de l'enzyme par le **manoalide** qui était de 95 % tombe à 40 % et si les deux lysines sont modifiées, le **manoalide** perd son activité inhibitrice.

D'autres composés tels que le **luffariellolide** (I.54, figure I.32 à gauche), les **scalaradiales** (I.55, figure I.32 au milieu) et le **petrosaspongiolide M** (I.56, figure I.32 à droite) qui sont également extraits d'éponges, ont montré des activités anti-inflammatoires<sup>122</sup> et possèdent un mécanisme d'inhibition des sPLA<sub>2</sub> proche de celui du **manoalide**.<sup>120</sup>



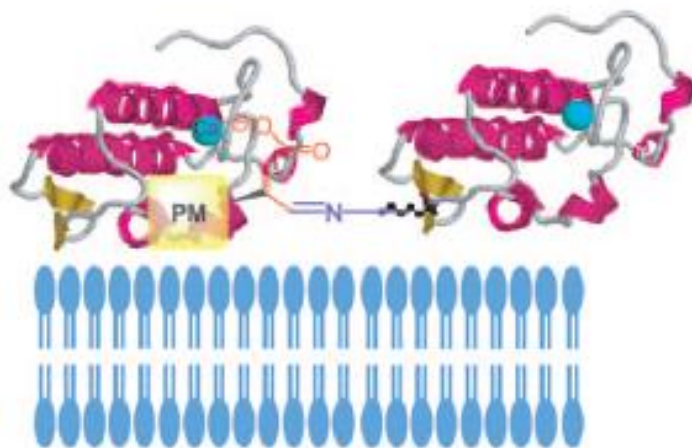
**Figure I.32** : autres molécules d'origine naturelle ayant recours à la formation d'une imine comme moyen d'inhibition des sPLA<sub>2</sub>

L'inhibition de la sPLA<sub>2</sub> issue du venin de cobra par le **luffariellolide (I.54)** est entièrement réversible par utilisation d'hydroxylamine ce qui suggère une inhibition seulement due à la formation d'une imine entre l'aldéhyde et une lysine. Concernant le **scalaradial (I.55)** (IC<sub>50</sub> = 70 nM sur la sPLA<sub>2</sub> du venin d'abeille), la première étape de l'inhibition est la formation de l'imine comme pour le **luffariellolide** et le **manoalide** mais ensuite, une cyclisation intramoléculaire peut avoir lieu pour donner un cycle pyrrolium (**schéma I.3**).<sup>123</sup>



**Schéma I.3:** mécanisme d'inhibition possible de la sPLA<sub>2</sub> de venin d'abeille par le **scalaradial**

Le **petrosaspongiolide M (I.56)** possède le cycle  $\gamma$ -lactone du **manoalide** qui peut donc s'ouvrir comme ce dernier pour libérer un aldéhyde qui peut se fixer sur l'enzyme par formation d'une imine avec une lysine. Mais comme dans le cas du **scalaradial**, l'hypothèse d'une inhibition entièrement due à la formation de l'imine n'est pas valide.<sup>124</sup> D'après des études de simulation moléculaire, le **petrosaspongiolide M** peut réaliser des interactions de Van der Waals ainsi que des liaisons hydrogènes à l'intérieur du site actif de la sPLA<sub>2</sub> hGIIA. De plus l'étude en résonance plasmonique de surface a montré un profil compatible avec des interactions protéine/protéine<sup>125</sup> suggérant que le composé **I.56** induit une interaction protéine/protéine (**figure I.33**). Cette hypothèse n'est pas encore vérifiée.<sup>125</sup>

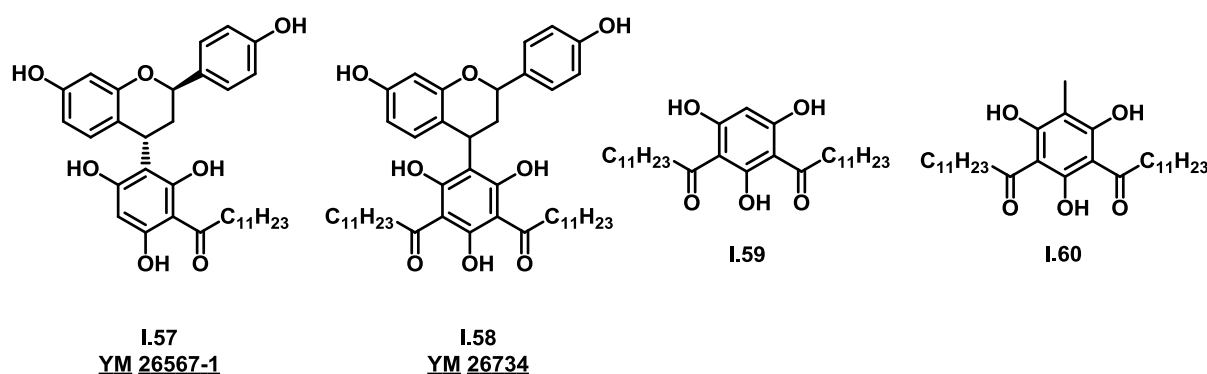


**Figure I.33 :** Le **Petrosaspongiolide M (PM)** favoriserait des interactions protéine/protéine



### II.6.b Autres types d'inhibiteurs naturels

Au début des années 1990, les laboratoires Yamanouchi ont publié la structure d'un composé extrait du fruit du *Horsfieldia amygladine* (bois exotique) (composé **I.57**, **figure I.34**). Ce composé, nommé **YM 26567-1**, s'est révélé actif sur la sPLA<sub>2</sub> GIIA du lapin avec une IC<sub>50</sub> de 6,7 µM, et il fait preuve de spécificité puisqu'il inhibe également la sPLA<sub>2</sub> IB du porc mais avec une activité dix fois plus faible.<sup>126</sup> Un screening de composés dérivés de **YM 26567-1** ayant pour but de trouver de nouveaux inhibiteurs spécifiques à une sPLA<sub>2</sub> a mis en évidence le **YM 26734** (composé **I.58**, **figure I.34**). Ce nouveau composé inhibe la sPLA<sub>2</sub> IIA du lapin avec un IC<sub>50</sub> de 85 nM et la sPLA<sub>2</sub> GIB du porc avec une IC<sub>50</sub> de 6,8 µM. En revanche, il n'est pas actif sur les cPLA<sub>2</sub>. Les tests *in-vivo* réalisés sur des souris ont montré une diminution de la taille d'un œdème à l'oreille avec une ED<sub>50</sub> = 11 mg/kg<sup>127</sup> (produit injecté par voie intraveineuse).



**Figure I.34** : YM 26567-1 et ses dérivés

Récemment Gelb et son équipe ont testé le composé **I.58 (YM 26734)** qui est un polyphénol flavonoïde, sur les sPLA<sub>2</sub> IIA, V et X de différentes espèces (**tableau I.13**).<sup>128</sup>

Enzyme	IC <sub>50</sub> (nM)	Enzyme	IC <sub>50</sub> (nM)	Enzyme	IC <sub>50</sub> (nM)
rGIIA	120 ± 5	hGV	110 ± 20	hGX	> 1600
mGIIA	30 ± 5	mGV	520 ± 140	mGX	> 1600
hGIIA	80 ± 20				

**Tableau I.13**: activité de **YM 26734** sur les sPLA<sub>2</sub> IIA, V et X

Grâce à un logiciel de simulation moléculaire le composé **I.58** est placé dans le site actif de la sPLA<sub>2</sub> hGIIA de façon à créer des interactions entre un carbonyle et le groupement hydroxyle en *para* et le calcium. Cette position fait apparaître une interaction supplémentaire entre une lysine du site actif et le carbonyle de la deuxième chaîne dodécanoyle, ce qui entraîne une stabilisation du complexe enzyme/ligand. De plus, le groupement flavonoïde apparaît comme rejeté à l'extérieur du site actif, ce qui amène à envisager de tester des composés qui ne possèdent pas cette partie flavonoïde tels que les composés **I.59** et **I.60** (figure I.34). Ces composés ont été testés dans les mêmes conditions que le composé **I.58** (tableaux I.14 et I.15).

Enzyme	IC <sub>50</sub> (nM)	Enzyme	IC <sub>50</sub> (nM)	Enzyme	IC <sub>50</sub> (nM)
rGIIA	90 ± 30	hGV	≈ 1600	hGX	> 1600
mGIIA	110 ± 40	mGV	≈ 1600	mGX	> 1600
hGIIA	≈ 1600				

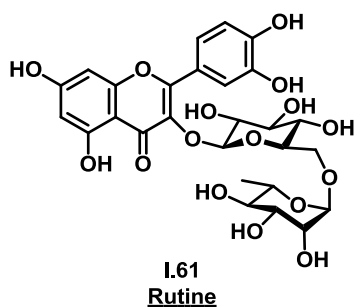
**Tableau I.14** : activité du composé **I.59**

Enzyme	IC <sub>50</sub> (nM)	Enzyme	IC <sub>50</sub> (nM)	Enzyme	IC <sub>50</sub> (nM)
rGIIA	90 ± 20	hGV	530 ± 100	hGX	> 1600
mGIIA	60 ± 10	mGV	≈ 1600	mGX	> 1600
hGIIA	690 ± 130				

**Tableau I.15** : activité du composé **I.60**

Les composés **I.59** et **I.60** qui n'ont pas la partie flavonoïde sont aussi actifs que le composé **I.58**. Ce résultat suggère que la pose imposée du composé **I.58** dans le site actif de la sPLA<sub>2</sub> hGIIA lors de l'étude de simulation moléculaire est proche de la pose réelle. On note également une amélioration de la sélectivité, les composés **I.59** et **I.60** n'inhibent plus la sPLA<sub>2</sub> GV.

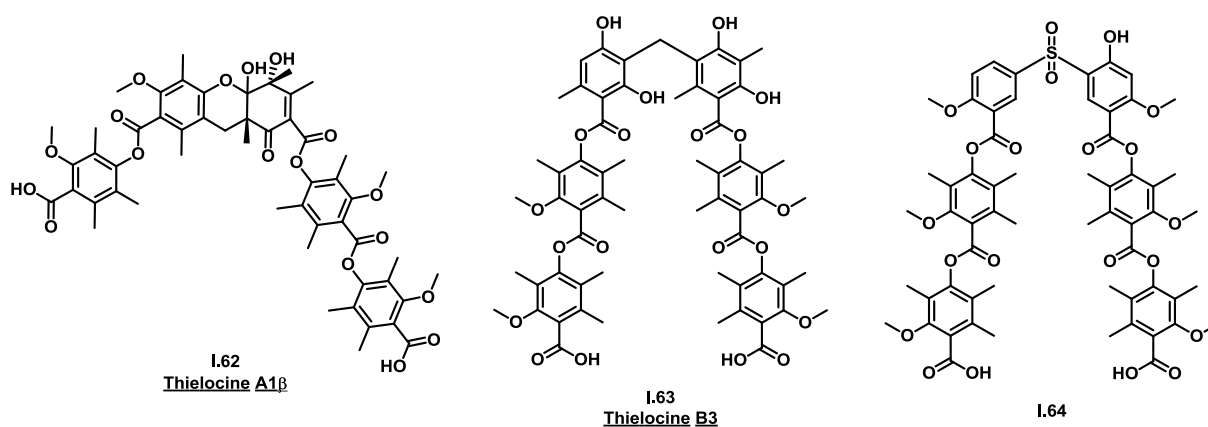
D'autres flavonoïdes ont montré une activité contre les sPLA<sub>2</sub> tel que la rutine (composé **I.61**, figure I.35) qui a été testé sur les sPLA<sub>2</sub> GII du *Crotalus atrox* et du *Vipera russelli* ainsi que sur les sPLA<sub>2</sub> GI du *Naja Naja* et GIB du porc.<sup>129</sup>



**Figure I.35** : structure de la rutine

L'activité rapportée est faible sur les sPLA<sub>2</sub> GII ( $IC_{50} \approx 250 \mu\text{M}$ ) et inexistante sur les sPLA<sub>2</sub> GI.<sup>129</sup>

Pour finir, les thielocines sont des molécules poly-aromatiques extraites de champignons (*thielavia terricola*) et contrairement aux inhibiteurs précédents, elles doivent leur activité inhibitrice à leurs cycles aromatiques. Sur les huit thielocines isolées, la thielocine A1 $\beta$  (composé **I.62**, **figure I.36** à gauche) est active sur la sPLA<sub>2</sub> hGIIA avec une  $IC_{50}$  de 12  $\mu\text{M}$  et sur la sPLA<sub>2</sub> GIIA du rat avec une  $IC_{50}$  de 0,033  $\mu\text{M}$ .<sup>130</sup> De même la thielocine B3 (composé **I.63**, **figure I.36** au milieu) est active sur la sPLA<sub>2</sub> hGIIA avec une  $IC_{50}$  de 0,076  $\mu\text{M}$ .



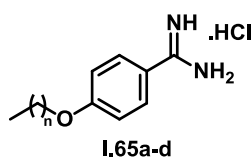
**Figure I.36** : thielocines (composés **I.62** et **I.63**) et un analogue (**I.64**)

L'activité de la thielocine B3 (composé **I.63**) est très intéressante mais son extraction à partir des champignons est un processus très lent et donc incompatible avec une éventuelle mise sur le marché. Pour pallier à ce problème, les laboratoires Shionogi ont mis au point une

synthèse d'analogues de thielocine B3 dont le composé **I.64** (figure I.36 à droite) qui s'est avéré aussi efficace que la molécule d'origine ( $IC_{50} = 69$  nM sur hGIIA).<sup>131</sup>

## II.7. Les dérivés oxadiazolones

Plusieurs dérivés 4-alkoxybenzimidamide synthétisés (composés **I.65a-d**) par l'équipe de Godfroid au milieu des années 1990, se sont révélés faiblement actifs sur la GIB du porc et la GIIA du lapin (tableau I.16).<sup>132</sup>

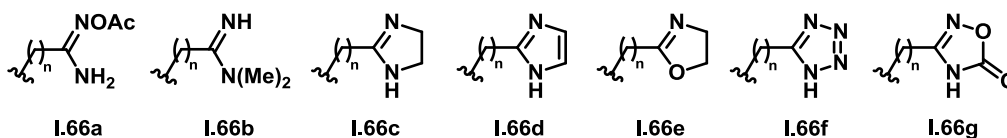


Composé	n	$IC_{50}$ (pGIB) ( $\mu$ M)	$IC_{50}$ (IGIIA) ( $\mu$ M)
<b>I.65a</b>	3	inactive	inactive
<b>I.65b</b>	9	7	20
<b>I.65c</b>	13	3	5
<b>I.65d</b>	15	150	155

**Tableau I.16:** activités des dérivés oxadiazolones

L'activité des 4-alkoxybenzimidamide est liée au nombre de carbones de la chaîne alkoxy, en effet une chaîne trop courte ( $n = 3$ , composé **I.65a**) ou trop longue ( $n = 15$ , composé **I.65d**) rend le composé inactif. Lorsque la chaîne présente quatorze carbones, le composé est actif mais non sélectif. Cette dépendance de l'activité par rapport à la longueur de la chaîne alkoxy suggère que l'inhibiteur se trouve à l'intérieur du site actif de l'enzyme avec la chaîne alkyle dans une poche hydrophobe. De plus, la présence du groupement phényle permet des interactions  $\pi$ - $\pi$  ou cation- $\pi$  entre le cycle aromatique et des acides aminés du site actif.

Pour augmenter l'activité et la sélectivité de ces molécules, les auteurs ont modifié la partie imidamide du composé **I.65c**, appelé **PMS 815**, en réalisant une alkylation par exemple ou en la remplaçant par un imidazole, une imidazoline, une oxazolidine, un tétrazole ou une oxadiazolone<sup>133</sup> (figure I.37).


**Figure I.37** : modifications apportées au composé **I.65c**

Composé	n	IC <sub>50</sub> (pGIB) (μM)	IC <sub>50</sub> (IGIIA) (μM)
<b>I.65c</b>	0	3	5
<b>I.66a</b>	0	> 100	> 100
<b>I.66b</b>	1	0,9 ± 0,3	1,3 ± 0,2
<b>I.66c</b>	1	1,3 ± 0,5	1,5 ± 0,3
<b>I.66d</b>	1	> 100	> 100
<b>I.66e</b>	0	> 100	> 100
<b>I.66f</b>	1	70 ± 2	34 ± 1
<b>I.66g</b>	1	> 100	4 ± 0,9

**Tableau I.17** : Activité des analogues de **PMS 815**

Le remplacement d'un hydrogène de l'imine par un groupe acétoxy (**I.66a**, **tableau I.17**) entraîne une perte totale de l'activité que l'on peut imputer à la disparition d'une liaison hydrogène entre NH et un acide aminé du site actif, de même si l'imidamide est remplacé par un imidazole (**I.66d**, **tableau I.17**) ou une oxazoline (**I.66e**, **tableau I.17**). Si la fonction amine de l'imidamide est dialkylée (**I.66b**, **tableau I.17**) ou si ce dernier est remplacé par sa forme cyclisée (**I.66c**, **tableau I.17**) il n'y a pas de modification importante de l'activité ou de la spécificité. La présence du groupement tétrazole (**I.66f**, **tableau I.16**) a pour effet de diminuer l'activité mais augmente la spécificité de l'inhibition sur la sPLA<sub>2</sub> GIIA du lapin. Pour finir, le groupement oxadiazolone (**I.66g**, appelé **PMS 1062**, **tableau I.17**) permet d'inhiber de façon sélective la sPLA<sub>2</sub> GIIA du lapin avec une IC<sub>50</sub> = 4 ± 0,9 μM.

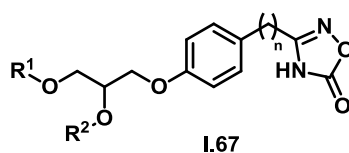
Le groupement oxadiazolone est connu pour son implication dans le processus d'inhibition de plusieurs enzymes telles que les cyclooxygénases<sup>134</sup> d'où sa présence parmi les groupements testés.

La présence d'un carbone entre le groupement phényle et l'hétérocycle semble favorable à l'inhibition. Ces inhibiteurs ressemblent aux analogues de phospholipides : le cycle

oxadiazolone mimant la tête hydrophile et la chaîne alkoxy mimant la chaîne ester du phospholipide.

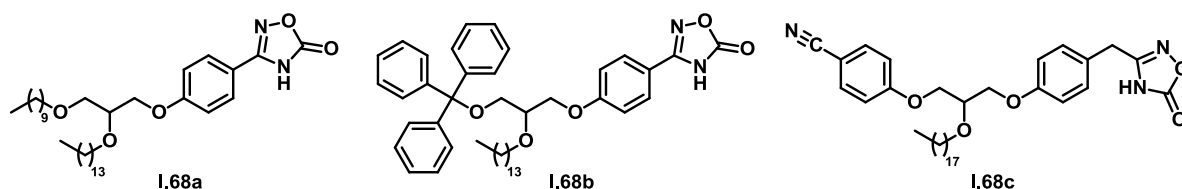
Dans le but de comprendre le rôle de la chaîne alkoxy, de nombreuses modifications ont eu lieu. Par exemple la liaison éther a été remplacée par une liaison thioéther ou une amine sans que cela modifie l'activité et la sélectivité des inhibiteurs. Il est également possible d'agrandir la chaîne alkoxy jusqu'à dix-huit carbones en conservant l'activité.<sup>135</sup>

De nouveaux motifs ont été introduits dans cette chaîne alkoxy comme un groupement glycérol qui permet de mimer d'avantage le phospholipide substrat des sPLA<sub>2</sub>,<sup>136</sup> les composés synthétisés (**figure I.38**) ont été testés sur les sPLA<sub>2</sub> hGIB et hGIIA puis les plus actifs ont été testés sur les sPLA<sub>2</sub> hGV et hGX.



**Figure I.38** : inhibiteurs de sPLA<sub>2</sub> possédant une tête oxadiazolone et des chaînes de type glycérol

Les groupements de la chaîne R<sup>2</sup> sont principalement de longues chaînes alkyles. L'étude de relation structure/activité a mis en évidence plusieurs éléments : (i) la chaîne R<sup>1</sup> doit avoir une longueur suffisante pour stabiliser l'inhibiteur dans le site actif grâce à des interactions de Van der Waals, (ii) la présence de groupements benzyles sur la chaîne R<sup>1</sup> n'est pas incompatible avec une activité biologique, (iii) en revanche, un groupement trop important en R<sup>1</sup> ou bien en R<sup>2</sup> limite l'efficacité des inhibiteurs. Sur les 21 molécules synthétisées, trois se sont montrées très intéressantes puisqu'elles sont actives à moins de 1 μM (**tableau I.18**).

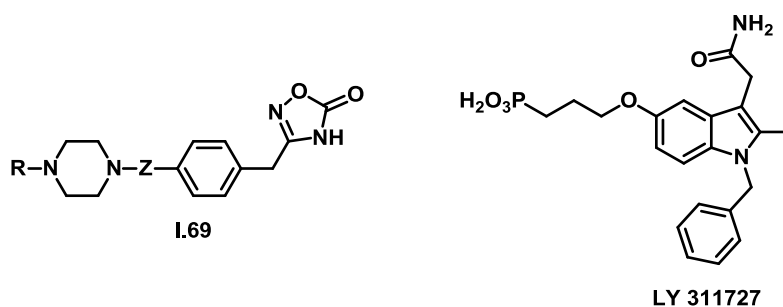


Composé	IC <sub>50</sub> (hGIB) ( $\mu\text{M}$ )	IC <sub>50</sub> (hGIIA) ( $\mu\text{M}$ )	IC <sub>50</sub> (hGV) ( $\mu\text{M}$ )	IC <sub>50</sub> (hGX) ( $\mu\text{M}$ )
I.68a	10	1	0,55	1
I.68b	5,75	1	0,66	1,25
I.68c	8,7	1,15	1	0,9
Me-indoxam	3,3	0,18	0,27	4,57

**Tableau I.18:** activités des composés de type I.68

Les trois composés **I.68a**, **I.68b** et **I.68c** sont tous actifs sur les quatre enzymes testées mais ils sont beaucoup plus actifs sur les sPLA<sub>2</sub> hGIIA, hGV et hGX que sur la hGIB. De plus, ils sont plus actifs que le **Me-indoxam** sur la sPLA<sub>2</sub> hGX.

Le deuxième motif à avoir été introduit comme chaîne des dérivés oxadiazolones est la pipérazine (**figure I.39**) afin de rigidifier la chaîne.<sup>137</sup> De plus, la protonation de la pipérazine entraîne une diminution de la lipophilie et donc une augmentation de la biodisponibilité.



**Figure I.39 :** oxadiazolone fonctionnalisée avec une pipérazine

Sur les quarante-huit composés synthétisés et testés sur les sPLA<sub>2</sub> GIB du porc et GIIA humaine, sept permettent de résumer la relation structure/activité (**tableau I.19**).

Composé	R	Z	IC <sub>50</sub> (hGIB) ( $\mu$ M)	IC <sub>50</sub> (hGIIA) ( $\mu$ M)
<b>I.69a</b>	<i>n</i> -C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> -	-CH <sub>2</sub> -	> 100	10
<b>I.69b</b>	<i>n</i> -C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> -	-CO-	> 100	4
<b>I.69c</b>	<i>n</i> -C <sub>22</sub> H <sub>45</sub> -	-CO-	> 100	0,1
<b>I.69d</b>	<i>n</i> -C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> -	Pas de Z	> 100	3,5
<b>I.69e</b>	<i>n</i> -C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> -O-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -	-CH <sub>2</sub> -	7,41	0,03
<b>I.69f</b>	<i>n</i> -C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> -	-CO-NH-	7,3	0,05
<b>I.69g</b>	<i>n</i> -C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> -NH-CO-	-CO-NH-	3,58	0,29
<b>LY 311727</b>			8	0,47

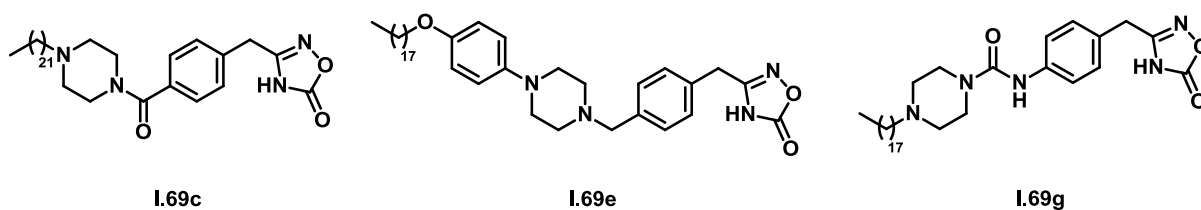
**Tableau I.19:** influence des substituants Z et R sur les composés de type **I.73**

Les inhibiteurs sont actifs seulement sur la sPLA<sub>2</sub> hGIIA, ils sont plus sélectifs que le dérivé indole **LY 311727** (IC<sub>50</sub>(GIIA) = 0,47  $\mu$ M). De plus le composé **I.69c** (IC<sub>50</sub>(GIIA) = 0,1  $\mu$ M) est plus actif que ce dernier. L'influence de la longueur de chaîne est visible dans le **tableau I.19** en comparant l'activité du composé **I.69b** (IC<sub>50</sub>(GIIA) = 4  $\mu$ M) et celle du composé **I.69c** (IC<sub>50</sub>(GIIA) = 0, 1  $\mu$ M). Comme il a déjà été souligné, plus la chaîne est longue, plus l'inhibiteur est efficace.

De façon intéressante, il est préférable que Z n'existe pas plutôt qu'il soit un méthyle (**I.69d** et **I.69a**), mais la meilleure activité est obtenue avec Z = CO ou Z = CO-NH qui peut s'expliquer par la création d'une liaison hydrogène entre une histidine du site catalytique et l'oxygène du carbonyle (**I.69b**, **I.69c**, **I.69f** et **I.69g**). La présence du méthyle peut être compensée par l'augmentation de la rigidité de R (**I.69a** et **I.69e**) néanmoins, cela entraîne une légère perte de spécificité. La présence d'un amide dans le groupement R fait chuter l'activité et la spécificité des inhibiteurs (**I.69f** et **I.69g**). Pour finir, les auteurs ont également remplacé la pipérazine par une pipérazinone ou une pipérazidinone mais ce changement a eu pour effet de diminuer l'activité et la spécificité.

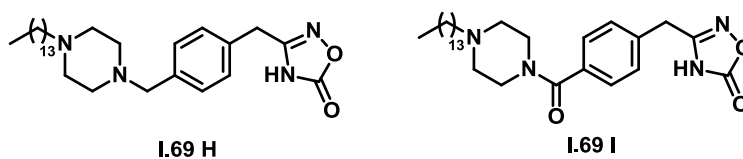
Les composés les plus actifs de la série oxadiazolone sont regroupés dans la **figure I.40**.





**Figure I.40** : composés les plus actifs de la série oxadiazolone

L'activité *in-vivo* de deux composés a été mesurée sur des rats qui ont soit un œdème induit par une injection de carraghénane (polysaccharide extrait d'algues rouges) dans une patte, soit un œdème résultant de l'application cutanée d'une huile de croton (plante riche en alcaloïdes et terpénoïdes) sur une oreille. Les deux composés choisis pour cette étude sont les composés **I.69h** et **I.69i** (**figure I.41**), ils ont tous les deux une lipophilie faible et ils possèdent la pipérazine qui est un élément jouant un rôle important en matière de biodisponibilité.



**Figure I.41** : composés choisis pour des tests *in-vivo*

Composé	IC <sub>50</sub> (hGIB) (μM)	IC <sub>50</sub> (hGIIA) (μM)	Dose (mg/oreille)	Inhibition œdème
<b>I.69 H</b>	> 100	> 10	1	51 %
<b>I.69 I</b>	> 100	9	1	48 %
<b>indométacine</b>	-	-	0,5	43 %

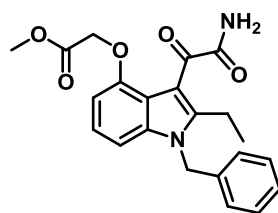
**Tableau I.20** : activité des dérivés oxadiazolones sur l'œdème de l'oreille

Les deux composés ont été comparés à l'indométacine qui est un anti-inflammatoire mis sur le marché par Merck. Il semble que les dérivés oxadiazolones soient moins efficaces que le produit commercial mais les doses administrées étant différentes, la comparaison n'est pas possible.

### III. Conclusion

Les inhibiteurs de sPLA<sub>2</sub> peuvent être classés en sept familles : les analogues de phospholipides, les amides, les acides carboxyliques, les sulfonamides et oxoamides, les dérivés de types indole et indolizine, les inhibiteurs d'origine naturelle et les oxadiazolones.

Les inhibiteurs les plus actifs possèdent des IC<sub>50</sub> de l'ordre du nanomolaire parmi lesquels se trouvent deux dérivés indoles (**Varespladib** et **Me-Indoxam**, schéma I.2), un dérivé indolizine (**Indoxam**, figure I.29) mais également deux dérivés amides (**FPL 67047XX** et **I.19**, figure I.12). Toutefois un seul a été développé comme molécule thérapeutique. Il s'agit de la **Méthyl-Varespladib** (figure I.42) qui a été jusqu'en phase III des essais cliniques contre le syndrome coronarien aigu mais c'est révélé inefficace.



Méthyl-Varespladib

**Figure I.42** : prodrogue de **Varespladib**

Le **Méthyl-Varespladib** était un composé très prometteur pour le traitement du syndrome coronarien aigu puisqu'il est un inhibiteur de sPLA<sub>2</sub> très puissant. Plusieurs pistes peuvent être citées pour expliquer son manque d'efficacité lors des essais cliniques :

- problème lié à la pharmacocinétique et/ou à la biodisponibilité.
- rôle non essentiel des sPLA<sub>2</sub> ciblées par le **Varespladib** dans la maladie.
- manque de sélectivité pour les différentes sPLA<sub>2</sub> (certaines ont peut-être un rôle bénéfique dans la maladie).

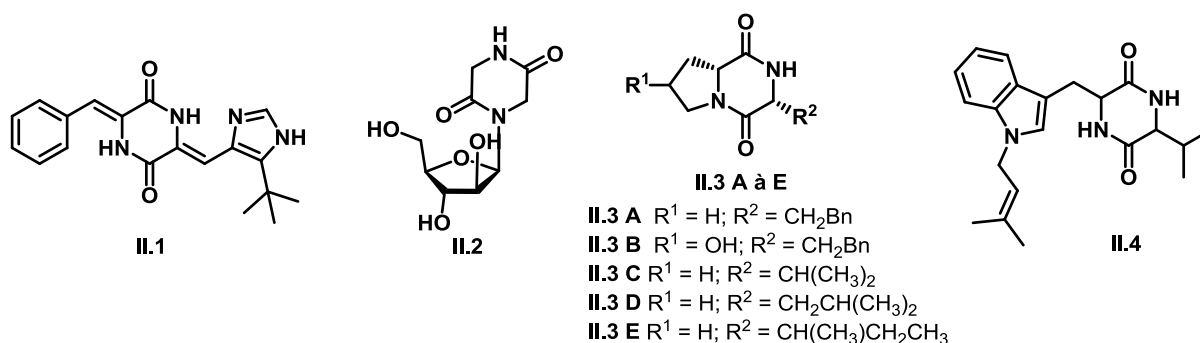
## **Chapitre II : Objectifs de la thèse**

## I. Contexte de la thèse

Les molécules qui possèdent un cycle de petite ou moyenne taille (moins de 8 chaînons) constituent un réservoir très vaste de composés à visée thérapeutique de part la capacité des cycles à distribuer des pharmacophores dans l'espace.

Parmi ces cycles, ceux dérivés de peptides possèdent l'avantage d'une synthèse simple et d'une grande diversité d'un point de vue chimique et stéréochimique.

Le squelette 2,5-dicétopipérazine représente l'archétype du cycle dérivé de peptide, ce dernier étant formé par cyclisation d'un simple dipeptide, et il est présent dans un grand nombre de composés biologiquement actifs.<sup>138</sup> Par exemple, des 2,5-dicétopipérazines ont montré une activité anti-tumorale,<sup>139</sup> antivirale,<sup>140</sup> antibactérienne<sup>141</sup> ou bien encore antifongique<sup>142</sup> (**figure II.1**).

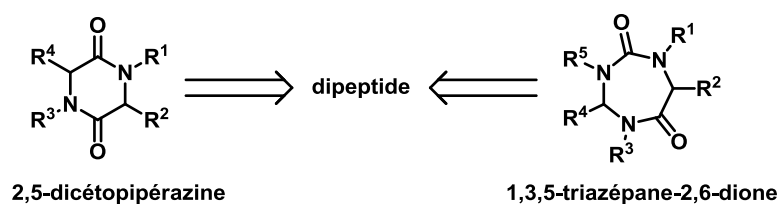


**Figure II.1** : exemples de 2,5-dicétopipérazines possédant une activité biologique

Le composé **II.1** est un composé synthétique présentant une activité contre les cellules des cancers de la prostate, du sein, des poumons, du colon, ou encore contre la leucémie avec des  $IC_{50}$  comprises entre 4,3 et 18 nM.<sup>139a</sup> Le composé **II.2** est également d'origine synthétique et possède une activité antivirale marquée<sup>140</sup> ( $IC_{50}$  de l'ordre de  $100 \mu g \cdot mL^{-1}$ ) à l'encontre des virus tels que le virus respiratoire syncytial (responsable de rhinite ou de syndrome pseudo grippal) ou VIH-1 (protéine entrant dans le processus de reproduction du virus VIH). Les molécules de type **II.3** sont toutes d'origine naturelle, extraites de bactéries présentes dans les élevages de coquilles Saint-Jacques et elles ont montré une activité antibactérienne à l'encontre de *Vibrio anguillarum*<sup>141</sup> (agent pathogène pour les poissons et

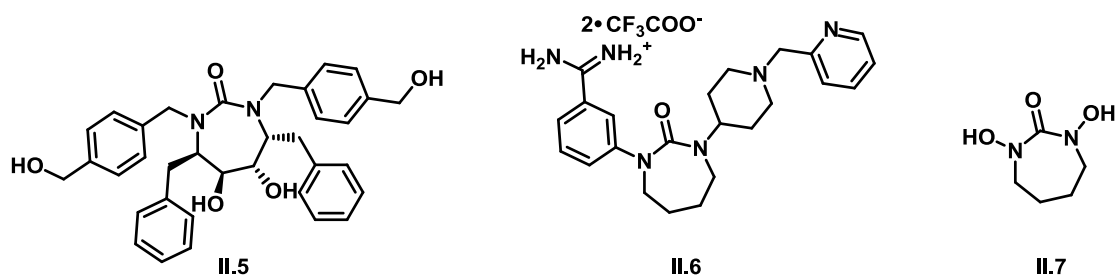
de la même famille que la bactérie responsable du choléra). Le composé **II.3 A** inhibe le développement du parasite à une concentration minimale (MIC) de  $0,03 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , le composé **II.3 B** nécessite une MIC de  $0,07 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , le composé **II.3 C** nécessite quant à lui une MIC de  $0,05 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de même que le composé **II.3 E** et enfin le composé **II.3 D** présente une MIC de  $0,04 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . L'activité antibactérienne des 2,5-dicétopipérazines de type **II.3** semble montrer une dépendance à la stéréochimie des inhibiteurs puisque les diastéréoisomères D,L ou bien L,D des molécules actives possèdent des MIC de l'ordre de  $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Le composé **II.4** est extrait d'algues japonaises (*Porphyra yezoensis*) et s'est révélé être actif contre *Pyricularia oryzae* (parasite responsable de la nécrose de la tige de la plante de riz) avec une constante d'inhibition ( $K_i$ ) de  $0,36 \mu\text{M}$ .<sup>142</sup>

Les 1,3,5-triazépane-2,6-diones sont des hétérocycles à sept chaîons dérivant également de dipeptides comme les 2,5-dicétopipérazines mais possédant une seule fonction amide et une fonction urée (**figure II.2**).



**Figure II.2** : 2,5-dicétopipérazine et 1,3,5-triazépane-2,6-dione

Les urées possèdent un moment dipolaire (urée = 4,56 D et acétamide = 3,7 D) et se sont de très bons accepteurs/donneurs de liaisons hydrogène d'où leur présence dans de nombreuses molécules biologiquement actives. Il existe plusieurs exemples dans la littérature de cycles à sept chaîons possédant une urée et étant biologiquement actifs (**figure II.3**).



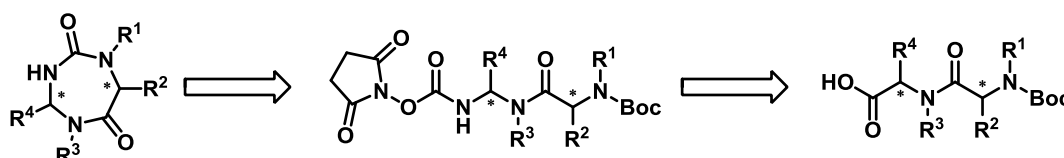
**Figure II.3** : exemples d'urées cycliques à sept chaîons

Le composé **II.5** est un inhibiteur de la protéase VIH-1 développé par le laboratoire DuPont Merck au milieu des années 1990.<sup>143</sup> Cette molécule inhibe la protéine avec une IC<sub>50</sub> de 36 nM. Le composé **II.6** est un anticoagulant puisque qu'il inhibe la protéine Facteur Xa qui est une protéine faisant partie de la cascade de coagulation sanguine.<sup>144</sup> Le K<sub>i</sub> de ce composé est de 12 nM. Pour finir, le composé **II.7** a été décrit dans la littérature comme inhibiteur de phospholipase C avec un K<sub>i</sub> = 71 μM à pH = 9,5 mais sans activité inhibitrice si le pH est de 7,3<sup>145</sup>.

## II. 1,3,5-triazépane-2,6-diones

### I.1. Synthèse

La synthèse en solution du squelette 1,3,5-triazépane-2,6-dione a fait l'objet de précédentes publications et du travail de thèse de M<sup>elle</sup> Gersande Léna et de M<sup>r</sup> Joël Boeglin.<sup>146</sup> Le cycle est obtenu en quatre étapes à partir d'un dipeptide dont la fonction amine est protégée par un groupement Boc (**schéma II.1**).



**Schéma II.1** : Rétrosynthèse en solution des 1,3,5-triazépane-2,6-diones

Depuis le début des années 2000, une quarantaine de 1,3,5-triazépane-2,6-diones a été synthétisée par cette méthodologie néanmoins la synthèse en solution n'est pas adaptée à la synthèse d'un très grand nombre d'hétérocycles. La diversité importante des acides aminés pourrait être exploitée pour enrichir significativement cette collection si une méthodologie de synthèse adaptée était à disposition.

La synthèse en parallèle sur support solide est un outil très intéressant qui permettrait l'obtention de cette chimiothèque. Dans un premier temps, M<sup>elle</sup> Léna a mis au point une synthèse supportée ayant des dipeptides acides comme produit de départ mais sans

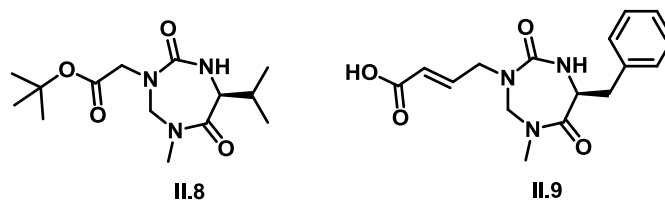
parvenir à optimiser les conditions pour permettre la synthèse parallèle d'un grand nombre de composés. M<sup>r</sup> Boeglin a également mis au point une synthèse assistée par un polymère<sup>146b</sup> à partir de l'acide aminé *N*-Méthyl-Glycine, et ayant permis la création d'une chimiothèque de 35 hétérocycles. Le principal inconvénient de cette synthèse est la limitation à la *N*-Méthyl-Glycine comme acide aminé de départ. Ces deux synthèses seront présentées et discutées au début du chapitre III.

L'un des objectifs de ma thèse est donc la mise en place d'une méthode de synthèse en parallèle sur support solide permettant la création d'une chimiothèque diversifiée de triazépanediones. En parallèle à cette chimiothèque, nous nous sommes également intéressés à la synthèse de cycles apparentés aux 1,3,5-triazépane-2,6-diones tels que des composés possédant des fonctions thiocarbonyles ou bien des hétérocycles de tailles plus importantes. Ces synthèses de cycles apparentés ont pour but d'augmenter d'avantage la diversité de notre chimiothèque.

## II.2. Evaluation biologique des 1,3,5-triazépane-2,6-diones

L'analogie des 1,3,5-triazépane-2,6-diones avec les 2,5-dicétopipérazines a amené les membres de notre laboratoire à rechercher des cibles biologiques pour les 1,3,5-triazépane-2,6-diones. Grâce à une technique de criblage virtuel inverse,<sup>147</sup> quelques triazépanediones ont été dockées dans les sites actifs des protéines de la base de donnée des protéines (Protéin Data Bank, PDB).

Plusieurs cibles potentielles ont ainsi été identifiées : thymidine kinase, estrone sulfotransferase, phospholipases A<sub>2</sub>, methionine amino peptidase, purine nucleoside, et phosphorylase. Des tests *in-vitro* ont permis de valider l'activité des 1,3,5-triazépane-2,6-diones sur les phospholipases A<sub>2</sub> secrétées hGV et hGX<sup>148</sup> et d'identifier **II.8** et **II.9** (**figure II.4**) comme des inhibiteurs potentiels.



**Figure II.4** : composés de type 1,3,5-triazépane-2,6-diones identifiés comme étant des inhibiteurs potentiels de sPLA<sub>2</sub> hGV et hGX

Les composés **II.8** et **II.9** sont spécifiques aux sPLA<sub>2</sub> hGV et hGX mais ce sont des inhibiteurs de faible activité ( $IC_{50} > 10 \mu M$ ) comparées aux inhibiteurs de type indoles décrits dans la littérature. Au cours de ces travaux de thèse, plusieurs approches ont été utilisées pour tenter d'optimiser ces premières touches et identifier de nouveaux inhibiteurs de sPLA<sub>2</sub> plus efficaces basés sur le squelette 1,3,5-triazépane-2,6-dione.



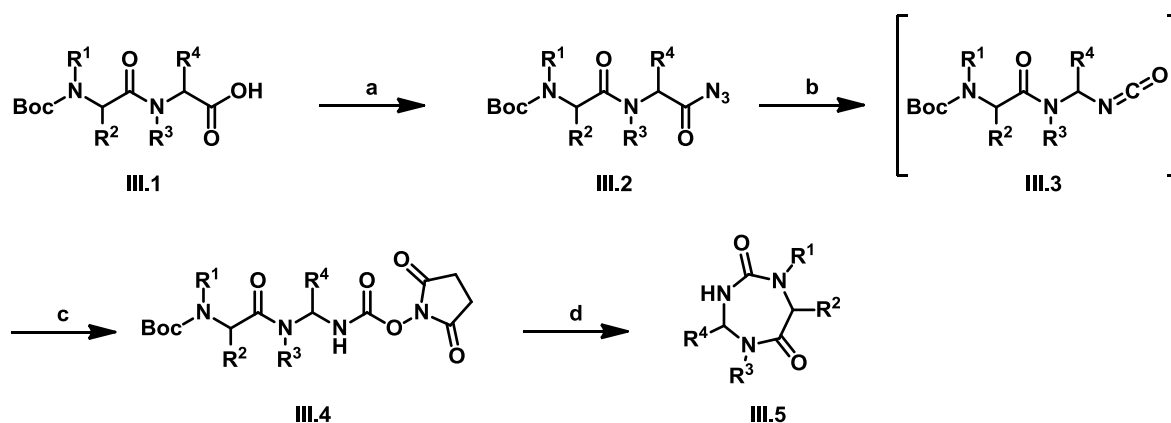
**Chapitre III : Création d'une chimiothèque de 1,3,5-  
triazépane-2,6-diones**

**Mise au point de la synthèse en parallèle sur support solide**

## I. Travaux précédents

### I.1. Synthèse en solution du squelette 1,3,5-triazépane-2,6-dione

Comme il a déjà été cité, en solution, le squelette 1,3,5-triazépane-2,6-dione est obtenu en quatre étapes à partir du dipeptide acide (**schéma III.1**).<sup>146b</sup>

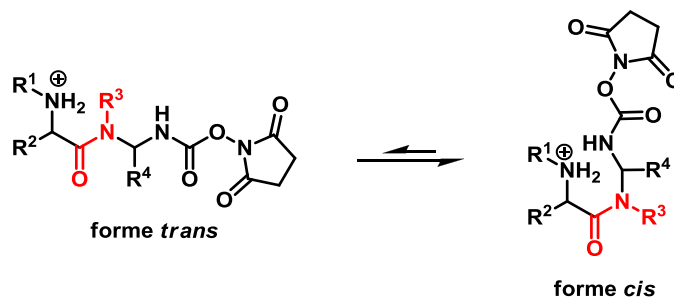


a) (i) *i*BuOCOCl (1,2 éq.), NMM (1,2 éq.), THF, -15°C, 30 min, (ii) NaN<sub>3</sub> (2,5 éq.), H<sub>2</sub>O, TA, 30 min ; b) toluène, 70°C, 40 min ; c) HOSu (1 éq.), pyridine (0,7 éq.), toluène, 70°C, 2h ; d) (i) TFA, 0°C, 30 min, (ii) DIEA (2 éq.), CH<sub>3</sub>CN, TA, 3h.

#### Schéma III.1 : synthèse des 1,3,5-triazépane-2,6-diones en solution

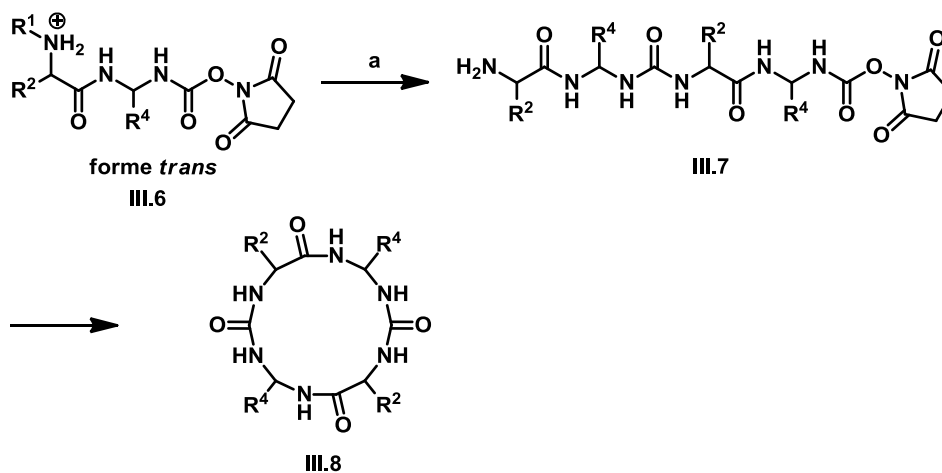
L'acide carboxylique du dipeptide **III.1** est activé sous forme d'anhydride mixte par le chloroformiate d'isobutyle (IBCF) en présence de *N*-Méthyl-Morpholine (NMM) à -15°C. Cet anhydride réagit ensuite avec l'azoture de sodium pour former l'azoture d'acyle **III.2**. Le chauffage à 70°C de cet azoture d'acyle provoque la formation de l'isocyanate **III.3** par *réarrangement de Curtius*. Une fois le dégagement gazeux accompagnant le *réarrangement de Curtius* terminé, l'ajout de *N*-hydroxysuccinimide (HOSu) permet la formation du carbamate activé **III.4**. Le groupement Boc est éliminé par l'acide trifluoroacétique (TFA) puis la cyclisation a lieu en milieu dilué après neutralisation du sel de TFA pour donner la 1,3,5-triazépane-2,6-dione **III.5** correspondante.

La formation du squelette 1,3,5-triazépane-2,6-dione nécessite la présence d'un groupement  $R^3 \neq H$  qui favorise la formation du monomère cyclique par déplacement de l'équilibre *cis/trans* autour de la liaison amide vers la forme *cis* (**figure III.1**).<sup>149</sup>



**Figure III.1** : Isomérisation *cis/trans* de la liaison amide du carbamate **III.4** lorsque  $R^3 \neq H$

En revanche lorsque  $R^3 = H$  la forme *trans* est prédominante, et donc dans les mêmes conditions de cyclisation le carbamate peut s'oligomériser (notamment pour donner le dimère **III.7**). La formation d'oligomères cycliques (comme par exemple le dimère **III.8**) (**schéma III.2**) est alors observé.<sup>150</sup>



a) DIEA (1,2 éq.),  $CH_3CN$

**Schéma III.2** : synthèse de macrocycles

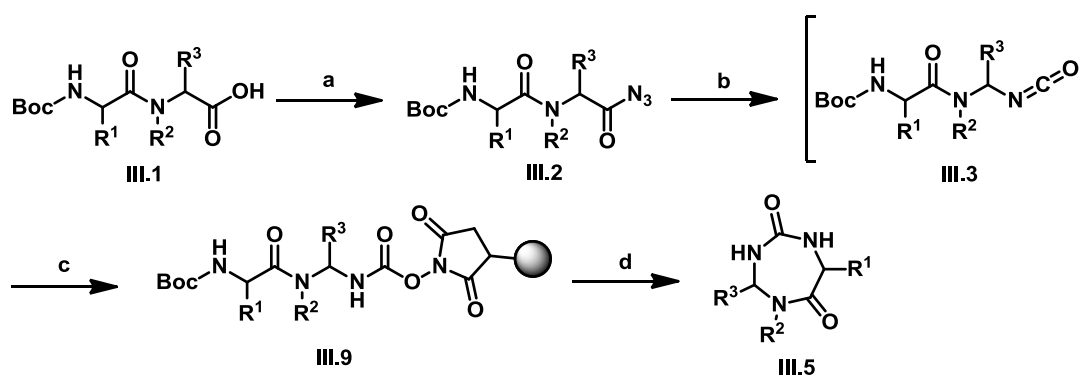
La synthèse en solution des 1,3,5-triazépane-2,6-diones est robuste et parfaitement validée en revanche, elle n'est pas adaptée à la synthèse parallèle et à la création d'une chimiothèque de plusieurs dizaines de composés.

## I.2. Premiers essais de synthèse en parallèle du squelette 1,3,5-triazépane-2,6-dione

### I.2.a. Synthèse sur support solide du squelette 1,3,5-triazépane-2,6-dione par réarrangement de Curtius d'un dipeptide

La synthèse assistée par des polymères est une technique adaptée à la création d'une chimiothèque. Cette approche regroupe plusieurs avantages : (i) la simplicité (les synthèses nécessitent peu de savoir-faire) : addition de réactifs, filtrations et lavages; (ii) l'absence de purification au cours de la synthèse hormis une simple filtration, seul le produit final pourra nécessiter une purification; (iii) l'utilisation de la quantité nécessaire de réactifs pour aboutir à la conversion totale du produit de départ, élimination des excès de réactif par filtration et (iv) la possibilité de synthèse en parallèle ou d'automatisation d'où un gain de temps important.

Concernant la synthèse des 1,3,5-triazépane-2,6-diones, Gersande Léna a mis au point une synthèse sur support solide basée sur les principes de "catch and release" et de cycloclivage<sup>151</sup> (**schéma III.3**). Cette synthèse est très proche de la synthèse en solution avec comme étape clé la formation du carbamate activé supporté **III.9**.



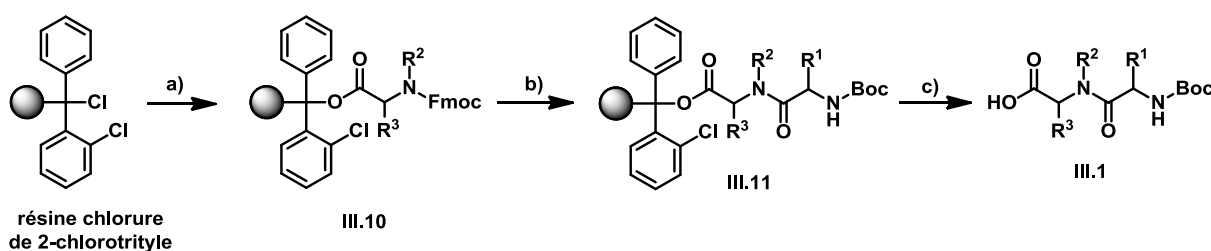
a) DPPA (1,1 éq.), TEA (1,1 éq.), TA, DMF, 15min; b) 70°C, 1h30min; c) PS-SuOH (0,2 éq.), 70°C, 2h; d) (i) TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1), TA, 2 x 5 min, (ii) DIEA (1,1 éq.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 40°C, 1h

**Schéma III.3** : synthèse sur support solide mise au point par Gersande Léna

Le dipeptide de départ **III.1** est traité avec de l'azoture de diphenylphosphoryle (DPPA) en présence de triéthylamine (TEA) donnant l'azoture d'acyle **III.2**. Ce dernier est chauffé à 70°C

permettant le *réarrangement de Curtius* pour donner l'isocyanate **III.3** qui est ensuite piégé par une résine *N*-hydroxysuccinimide (PS-SuOH) formant ainsi le carbamate activé supporté **III.9**. Après avoir déprotégé l'amine grâce au TFA, le cyclo-clivage a lieu en présence de DIEA dans le dichlorométhane à 40°C. La pureté des composés **III.5** obtenus par cette synthèse est comprise entre 84 et 90 %.

Au début des années 1990, Houghten a défini le concept de "libraries from libraries" qui consiste en la transformation chimique d'une chimiothèque de composés pour obtenir une autre chimiothèque de composés différents.<sup>152</sup> Dans le cas de la synthèse de 1,3,5-triazépane-2,6-diones sur support solide, la chimiothèque d'hétérocycles devrait découler d'une chimiothèque de dipeptide acides, elle-même réalisée sur support solide. La résine chlorure de 2-chlorotrytyle utilisée pour la synthèse des dipeptides acides est une résine couramment utilisée pour obtenir des peptides acides dont l'extrémité N-terminale est protégée par un groupement Boc (**schéma III.4**).



a) *N*-Fmoc-*N*(alkyl)-aminoacide (2 éq.), DIEA (6 éq.),  $CH_2Cl_2$ , 4h, b) (i) pipéridine/DMF (1:4), 2 x 20 min, (ii) *N*-Boc-aminoacide (2eq.), DIC (5 éq.), HOBT (5 éq.), DMF, 2h, c) HFIP/ $CH_2Cl_2$  (3:2), 2h

#### **Schéma III.4** : synthèse de la chimiothèque de dipeptides acides *N*-Boc protégés

Un premier acide aminé dont l'amine en  $\alpha$  est protégée par un groupement Fmoc est couplé sur la résine chlorure de 2-chlorotrytyle en présence de DIEA. Puis après libération de l'amine de **III.10** par une solution de pipéridine dans le DMF, un deuxième acide aminé dont l'amine est protégée par un groupement Boc est couplé grâce au carbodiimide DIC en présence d'HOBT.

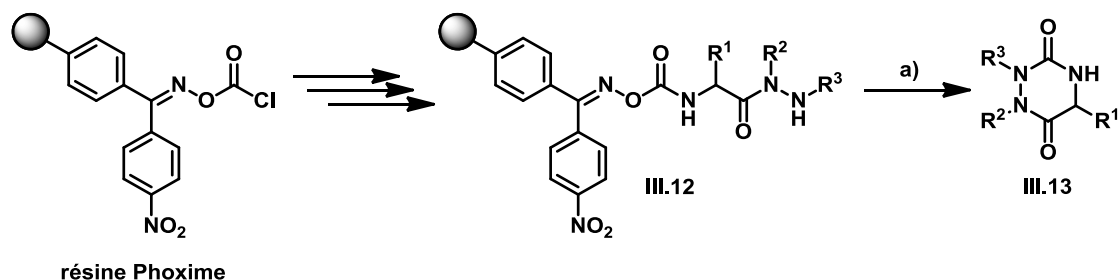
L'inconvénient de cette approche est l'utilisation de l'héxafluoroisopropanol (HFIP) pour le clivage du dipeptide Boc-protégé, en effet l'HFIP bien que volatile ( $T^\circ$  ébullition de 57,9°C) reste parfois piégé et peut réagir avec l'azoture d'acyle pour former un ester ou bien avec

l'isocyanate pour former un carbamate. Les efforts effectués pour améliorer l'élimination de l'HFIP ou pour le remplacer se sont montrés infructueux.

### I.2.b Création d'une chimiothèque de 1,3,5-triazépane-2,6-diones faisant appel au réarrangement de Curtius d'un acide $\alpha$ -aminé

Au cours de ses travaux de thèse, Joël Boeglin a mis au point une voie de synthèse alternative permettant d'accéder au squelette 1,3,5-triazépane-2,6-dione sur support solide. Cette synthèse utilise une résine différente pour la construction du carbamate activé : la résine oxime.<sup>153</sup>

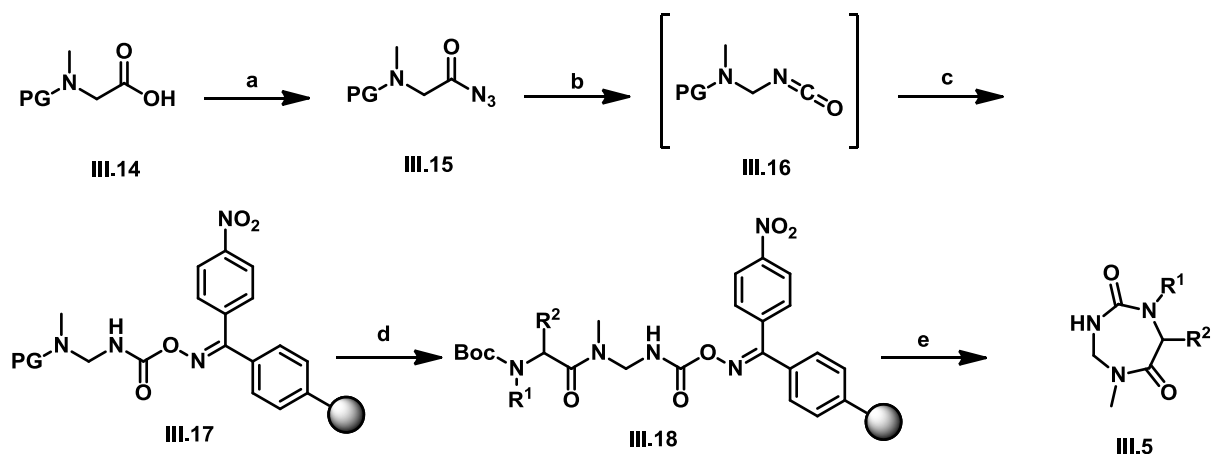
La résine oxime a été développée au début des années 1980 par Degrado et Kaiser. Elle permet la synthèse de peptides en conservant leurs groupements protecteurs puisqu'un nucléophile (l'hydrazine par exemple) est nécessaire pour libérer le peptide. A la fin des années 1990, Hamuro *et coll.* ont utilisé la résine oxime pour la synthèse de 1,2,4-triazine-3,6-dione par cyclisation intramoléculaire de dérivés hydrazides (**schéma III.5**).<sup>154</sup>



a) DIEA (10 éq.), DMF, 80°C, 24h

**Schéma III.5** : étape de cycloclivage permettant la formation de 1,2,4-triazine-3,6-dione à partir de la résine oxime

Une fois le carbamate d'oxime supporté **III.12** synthétisé, la simple utilisation de base (DIEA) et le chauffage à 80°C permettent l'obtention de la 1,2,4-triazine-3,6-dione **III.13** avec un rendement de 50 % par cycloclivage. Joël Boeglin a appliqué cette méthodologie à la synthèse en parallèle des 1,3,5-triazépane-2,6-diones (**schéma III.6**). Cette approche diffère de la précédente puisqu'il n'y a pas de préparation préalable d'une chimiothèque de dipeptides, de plus, le carbamate activé est directement construit sur la résine.

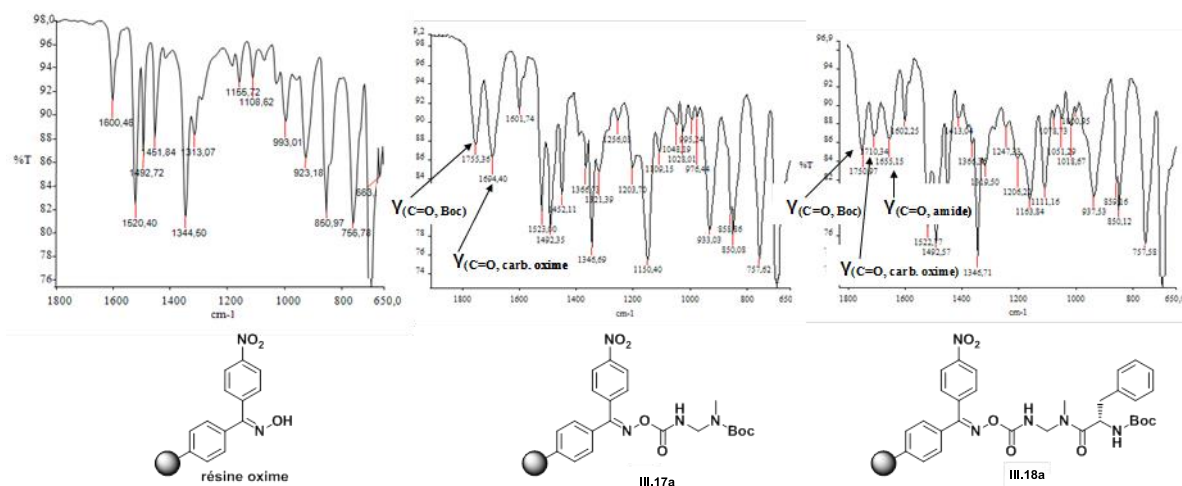


a) DPPA (1 éq.), TEA (1,1 éq.), DMF, TA, 30 min, b) 70°C, DMF, 1h30min, c) PS-oxime (0,2 éq.), 70°C, DMF, 2h, d) (i) TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:4), TA, 30 min ou (ii) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0,04 éq.), PhSiH<sub>3</sub> (4 éq.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 15 min, (ii) BocXaaOH (1 éq.), DIC (1 éq.), HOBT (1 éq.), DMF, TA, 1h, e) (i) TFA, 30 min, (ii) DIEA (5 éq.), toluène, 80°C, 48h.

**Schéma III.6** : synthèse de 1,3,5-triazépane-2,6-diones sur support solide en faisant appel au réarrangement de Curtius

Le dérivé de *N*-Méthyl-Glycine **III.14**, dont la fonction amine est protégée par un groupement Boc ou Alloc, réagit avec le DPPA en présence de TEA pour donner l'azoture d'acyle **III.15**. Le réarrangement de Curtius de cet azoture conduit à l'isocyanate **III.16** qui est ensuite piégé par la résine oxime pour donner le composé supporté **III.17**. Après avoir éliminé le groupement protecteur de l'amine (soit par traitement au TFA s'il s'agit d'un Boc, soit par une quantité catalytique de Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> en présence de PhSiH<sub>3</sub> s'il s'agit d'un Alloc), un acide aminé, possédant un groupement Boc sur l'amine, est couplé sur la résine grâce au DIC et à HOBT. Une fois le couplage terminé, le groupement Boc est éliminé par une solution de TFA dans le dichlorométhane puis le cycloclivage permettant la formation des 1,3,5-triazépane-2,6-diones **III.5** a lieu à 80°C dans le toluène en présence de DIEA.

L'efficacité de chaque étape sur phase solide est suivie par spectrométrie IR (**figure III.2**). Dans un premier temps, l'apparition de bandes caractéristiques des carbonyles à 1755 cm<sup>-1</sup> (groupement Boc) et 1694 cm<sup>-1</sup> (carbamate d'oxime) permet d'affirmer que l'étape de piégeage de l'isocyanate par la résine oxime a bien eu lieu. Ensuite l'apparition des bandes à 1750 cm<sup>-1</sup> (groupement Boc), 1710 cm<sup>-1</sup> (carbamate d'oxime) et 1655 cm<sup>-1</sup> (amide) est un moyen de vérifier le bon déroulement de l'étape de couplage.



**Figure III.2 :** Evaluation de l'efficacité de la synthèse du carbamate supporté **III.18a**

Cette synthèse est intéressante puisqu'elle a permis l'obtention d'une petite chimiothèque de vingt-six hétérocycles d'une pureté HPLC supérieure à 80 %. Néanmoins, des inconvénients subsistent : (i) la diversité des hétérocycles est limitée par le faible nombre d'acides aminés protégés *N*-alkylés ( $R^3 \neq H$ ) commerciaux, et surtout (ii) l'introduction d'une chaîne latérale alkyle ( $R^4 \neq H$ ) augmente la sensibilité de la *gem*-diamine et les risques de décomposition de cette dernière lors de la déprotection du groupement protecteur du composé **III.17** (schéma **III.6**) et donc limite cette approche à des cycles de formule générale cyclo(Xaa-*g*Sar)CO.<sup>155</sup>

Ces deux limitations nous ont conduit à développer une voie de synthèse alternative des 1,2,3-triazépane-2,6-diones sur support solide.

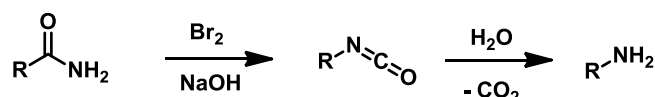
## II. Synthèse en parallèle sur support solide de 1,3,5-triazépane-2,6-diones : utilisation du réarrangement d'Hofmann

Les deux voies de synthèse sur support solide développées par Gersande Léna et Joël Boeglin ont montré des limites. Dans le cas de la méthode de M<sup>elle</sup> Léna, les difficultés résidaient dans le manque de robustesse des conditions expérimentales (utilisation du



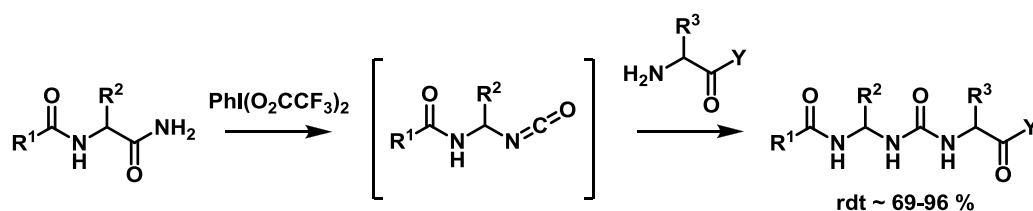
DPPA) conduisant aux dipeptididyl isocyanates à partir des dipeptides acides *N*-Boc protégés non purifiés issus d'une synthèse sur phase solide.

Parmi les autres réactions conduisant à la formation d'isocyanates (réaction de Schmidt, réarrangement de Lossen, réarrangement d'Hofmann), le *réarrangement d'Hofmann* oxydatif qui permet de convertir un groupe carboxamide en amine primaire via la formation d'un isocyanate (**schéma III.7**) représente potentiellement une alternative intéressante que nous avons cherché à développer dans ce travail.



**Schéma III.7** : synthèse d'amines primaires à partir de dérivés carboxamides par *réarrangement d'Hofmann* <sup>156</sup>

Le *réarrangement d'Hofmann* oxydatif historiquement décrit avec du dibrome comme agent oxydant, <sup>156</sup> peut être réalisé en conditions relativement douces avec le bis(trifluoroacétoxy)-iodobenzène (PIFA) selon la méthode développée par Loudon <sup>157</sup> au début des années 1980. Cette méthode a été appliquée en série peptidique par Pallai et Goodman en 1982. <sup>158</sup> Plus récemment, la *réarrangement d'Hofmann* oxydatif en absence d'eau dans le milieu a été utilisé pour la synthèse de dérivés urées par le groupe de Lipton (**schéma III.8**). <sup>159</sup>



**Schéma III.8** : synthèse de dérivés amides ou urées via un intermédiaire isocyanate obtenu par *réarrangement d'Hofmann* oxydatif <sup>159</sup>

La synthèse d'une chimiothèque de 1,3,5-triazépane-2,6-diones en utilisant le *réarrangement d'Hofmann* nécessite au préalable la préparation d'une chimiothèque de dipeptides carboxamides *N*-Boc protégés. La synthèse de cette chimiothèque peut être réalisée en parallèle sur support solide grâce à la résine *Sieber* (résine amino-xanthen-3-yloxy-*Merrifield*) <sup>160</sup> qui a l'avantage d'être clivée dans des conditions douces (1-2 % de TFA).

Grâce à la résine *Sieber* et au *réarrangement d'Hofmann*, le concept "libraries from libraries" décrit précédemment peut de nouveau être envisagé.

Pour réaliser la chimiothèque nous avons eu recours au synthétiseur parallèle MiniBlock™ (Metler Toledo) qui est bien adapté à la synthèse parallèle puisqu'il est possible de réaliser jusqu'à 2 x 48 réactions en parallèle.

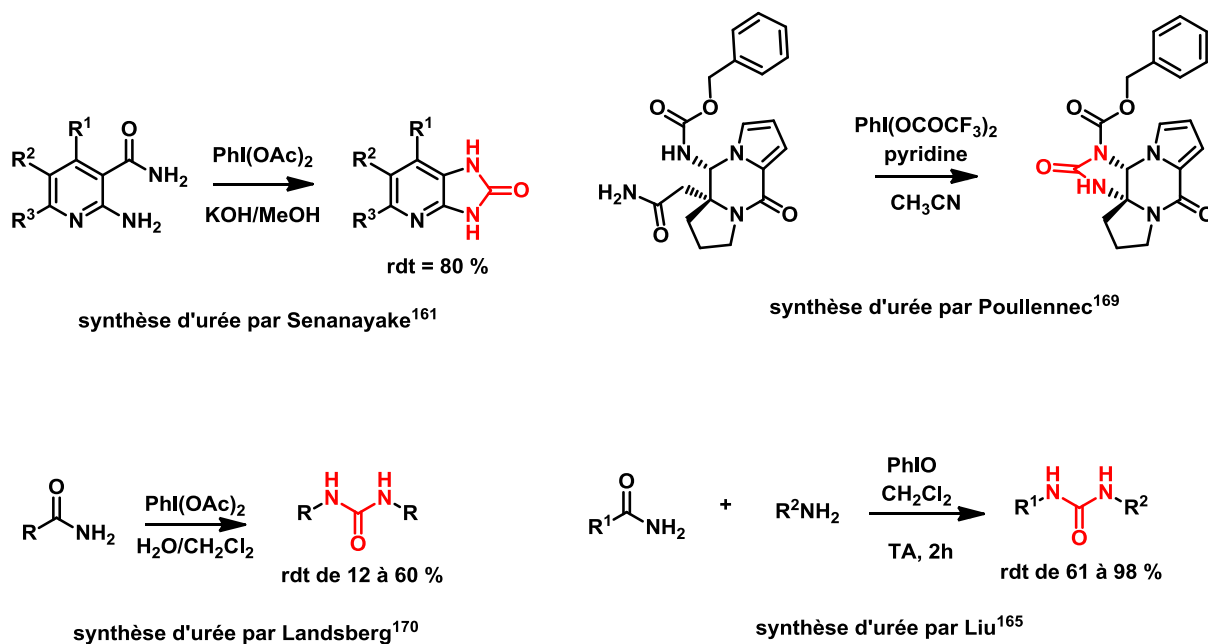
Notre cahier des charges concernant la chimie développée présentait plusieurs contraintes :

- utilisation du synthétiseur parallèle MiniBlock™ pour la synthèse de la chimiothèque de dipeptides carboxamides ainsi que pour la synthèse des hétérocycles,
- représentation de la diversité moléculaire du squelette 1,3,5-triazépane-2,6-dione (utilisation d'acides aminés naturels et non naturels, et large choix d'amines),
- obtention de 10 à 20 mg d'hétérocycles ce qui implique environ 0,45 mmol de dipeptides (500 à 700 mg),
- pureté HPLC du cycle brut supérieure à 80 %.

## II.1. Obtention d'urées par *réarrangement d'Hofmann*

A l'origine, le *réarrangement d'Hofmann* a été décrit comme permettant la synthèse d'amines à partir d'amides en présence de dibrome et d'hydroxyde de sodium (**schéma III.7**). Néanmoins, d'autres composés peuvent provoquer ce réarrangement tels que les dérivés d'iode hypervalent ( $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ <sup>161</sup>,  $\text{PhI}(\text{OCOCF}_3)_2$  (PIFA)<sup>157, 162</sup>,  $\text{PhI}(\text{OTf})\text{OH}$ <sup>163</sup>,  $\text{PhIO-HCO}_2\text{H}$ <sup>164</sup> ou encore  $\text{PhIO}$ <sup>165</sup> mais aussi des dérivés de plomb, de mercure ou d'argent ( $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ <sup>166</sup> ( $\text{Hg}(\text{OAc})_2$  ou bien  $\text{HgOAc}$  dans le  $\text{DMF}$ <sup>167</sup>, le tribromure de benzyltriméthylammonium<sup>168</sup>, et enfin  $(\text{NBS})\text{-Hg}(\text{OAc})_2$  et  $(\text{NBS})\text{-AgOAc}$ <sup>167</sup>. A l'heure actuelle, les dérivés d'iodes hypervalents (aryl- $\lambda^3$ -iodanes) et notamment le PIFA sont les réactifs les plus utilisés puisque les moins toxiques.

Lipton n'est pas le premier à avoir utilisé le *réarrangement d'Hofmann* lors de la synthèse d'urées disubstituées. En 1994, Senanayake *et coll.* ont décrit l'utilisation de  $\text{PhI}(\text{OAc})_2$  pour la formation d'une urée intramoléculaire (**schéma III.9**).<sup>161</sup>



**Schéma III.9** : exemples de synthèses d'urée grâce au réarrangement d'Hofmann

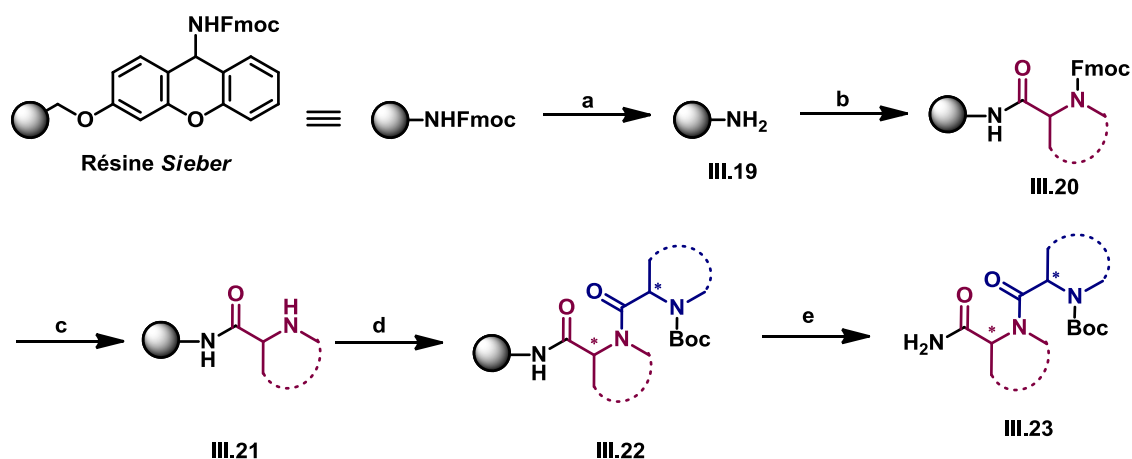
De même, les équipes de Poullennec,<sup>169</sup> de Landsberg<sup>170</sup> et de Liu<sup>165</sup> (schéma III.9) ont utilisé des dérivés d'iode hypervalent pour la formation d'urées.

## II.2. Préparation d'une chimiothèque de dipeptide carboxamide *N*-protégés

Comme il a déjà été mentionné, la synthèse de dipeptides carboxamides a lieu sur la résine Sieber.<sup>160</sup> Deux chimiothèques de dipeptides carboxamides ont été créés : l'une à partir d'acides aminés commerciaux (voie A) et l'autre en reprenant la synthèse des dérivés de *N*-alkyle-glycine développée par Zuckermann (voie B).<sup>171</sup>

### II.2.a. Voie A : acides aminés commerciaux

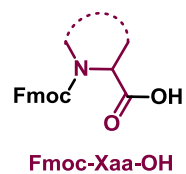
Comme cela a été mentionné précédemment, la première étape consiste en la préparation d'une chimiothèque de dipeptides amides par synthèse supportée en utilisant la résine Sieber (schéma III.10).<sup>160</sup>



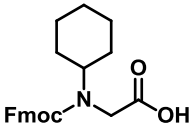
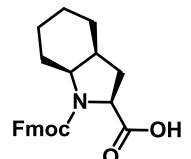
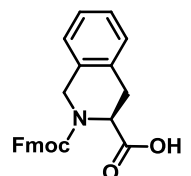
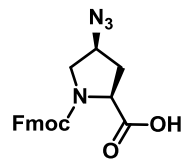
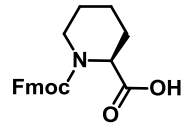
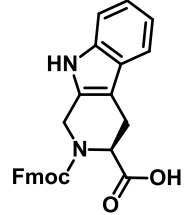
a) pipéridine/DMF (1:4), 2 x 20 min; b) *N*-Fmoc-aminoacide (2 éq.), DIC (2 éq.), HOBt (2 éq.), DMF, 2h; c) pipéridine/DMF (1:4), 2 x 20 min; d) *N*-Boc-aminoacide (2éq.), DIC (2 éq.), HOBt (2 éq.), DMF, 2h; e) TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 : 98), 10 x 2 min.

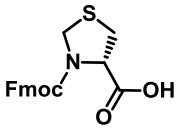
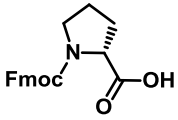
**Schéma III.10** : synthèse des dipeptides à partir d'acides aminés commerciaux

Après avoir déprotégée la fonction amine de la résine *Sieber* (loading = 0,67 mmol.g<sup>-1</sup>) grâce à la pipéridine, un *N*-Fmoc-*N*-alkyl-aminoacide est couplé sur la résine en présence de DIC et de HOBt dans le DMF pour donner le composé **III.20**. Après s'être assuré que le couplage était complet par un test colorimétrique Kaiser, le groupement protecteur Fmoc est éliminé par une solution de pipéridine dans le DMF puis un deuxième acide aminé, dont la fonction amine est protégée par un groupement Boc, est couplé dans les mêmes conditions que pour le composé **III.20**. Les dipeptides amides **III.23** sont libérés de la résine par action du TFA dilué (2 %) dans le dichlorométhane puis le TFA est neutralisé par de la pyridine avant la concentration des dipeptides carboxamides. Cette séquence réactionnelle a été utilisée pour préparer une série de 80 dipeptides à partir d'un pool de 13 acides aminés *N*-alkylés Fmoc protégés (**bloc A**) et de 36 acides aminés *N*-Boc protégés (**bloc B**) (**tableaux III.1** et **III.2**). Parmi ces 80 dipeptides, six ont des séquences hétérochirales.

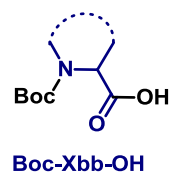


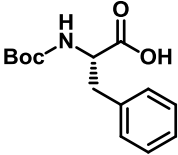
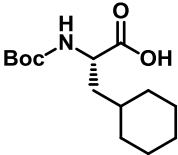
A	Fmoc-Xaa-OH	
1	Fmoc-NMe-Gly-OH	
2	Fmoc-L-Pro-OH	
3	Fmoc-L-NMe-Phe-OH	
4	Acide (2S,4S)-Fmoc-4-cyclohexyle-pyrrolidine-2-carboxylique	
5	Acide (2S,4S)-Fmoc-4-fluoro-pyrrolidine-2-carboxylique	

6	Fmoc-NChg-OH	
7	Fmoc-Oic-OH	
8	Fmoc-Tic-OH	
9	Fmoc-(2S,4S)-(4-N <sub>3</sub> )-Pro-OH	
10	Fmoc-L-Pip-OH	
11	Acide Fmoc-L-1,2,3,4-tétrahydronorharman-3-carboxylique	

12	Acide Fmoc-L-thiazolidine-4-carboxylique	
13	Fmoc-D-Pro-OH	

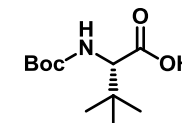
**Tableau III.1** : acides aminés *N*-alkylés *N*-Fmoc protégés utilisés pour la création de la chimiothèque de dipeptides carboxamides



B	Boc-Xbb-OH	
1	Boc-L-Phe-OH	
2	Boc-L-Cha-OH	

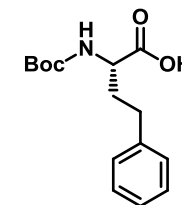
3

Boc-L- $\alpha$ -tBu-Gly-OH



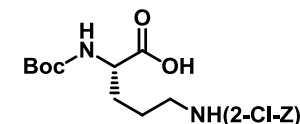
4

Boc-L-HomoPhe-OH



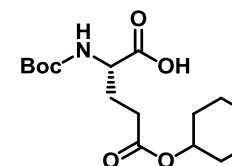
5

Boc-L-Orn(2-Cl-Z)-OH



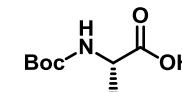
6

Boc-L-Glu(OCHx)-OH



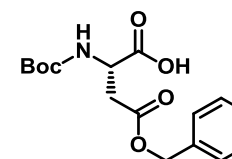
7

Boc-L-Ala-OH

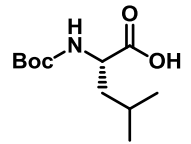
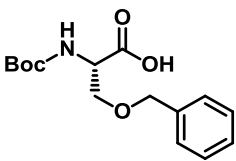
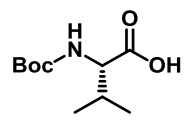
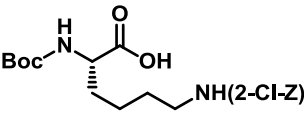


8

Boc-L-Asp(OBn)-OH

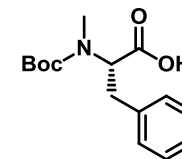




9	Boc-L-Cys(4MeBn)-OH	
10	Boc-L-Glu(OBn)-OH	
11	Boc-L-Leu-OH	
12	Boc-L-Ser(OBn)-OH	
13	Boc-L-Val-OH	
14	Boc-L-Lys(2-Cl-Z)-OH	
15	Boc-L-Pro-OH	

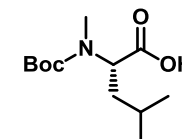
16

Boc-L-NMe-Phe-OH



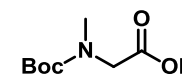
17

Boc-L-NMe-Leu-OH



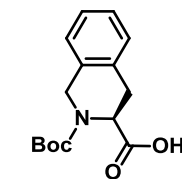
18

Boc-NMe-Gly-OH



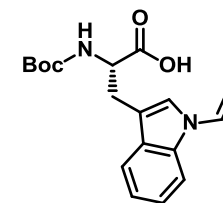
19

Boc-L-Tic-OH



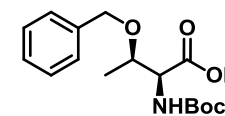
20

Boc-Trp(formyl)-OH



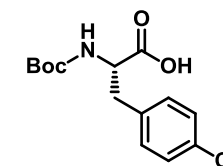
21

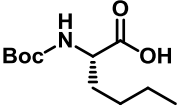
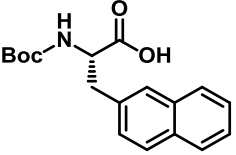
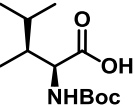
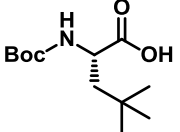
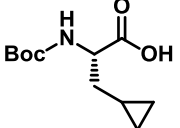
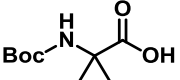
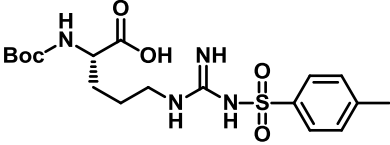
Boc-L-Thr(OBn)-OH



22

Boc-L-(4-Cl)-Phe-OH

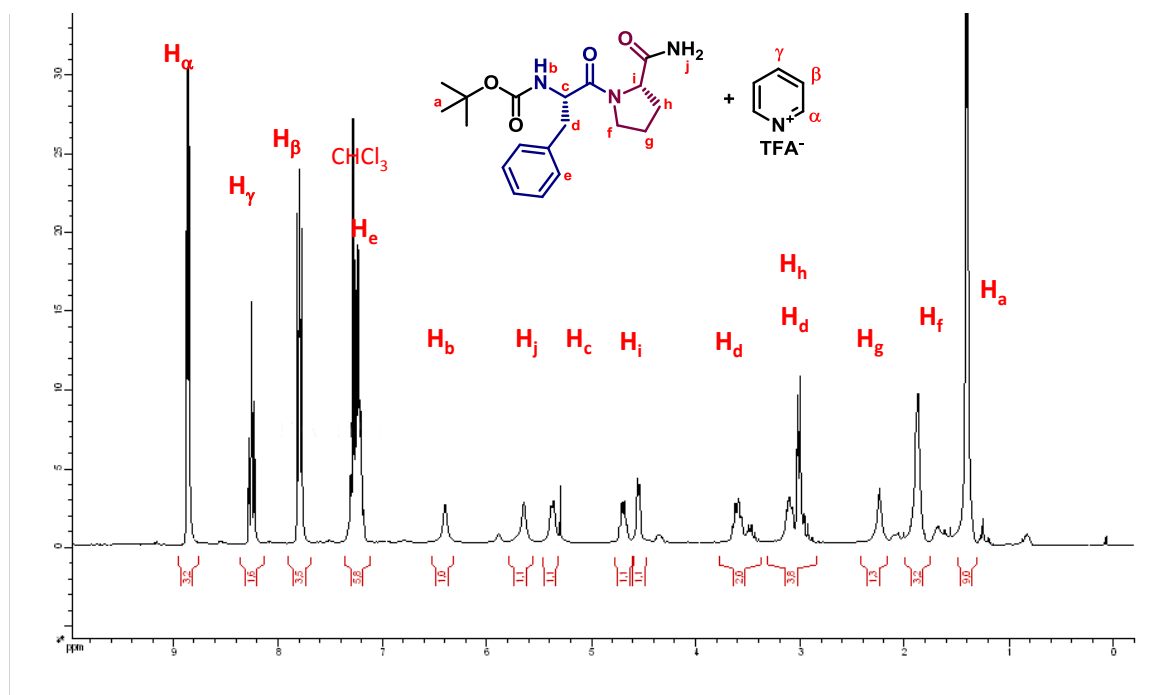


23	Boc-NLeu-OH	
24	Boc-L-3-(2-naphtyl)-Ala-OH	
25	Boc-L-Ile-OH	
26	Boc-L-β-tBu-Ala-OH	
27	Boc-L-β-cyclopropyl-Ala-OH	
28	Boc-Aib-OH	
29	Boc-L-Arg(Tos)-OH	

30	Boc-L-Trp-OH	
31	Boc-L-hydroxyproline-OH	
32	Boc-D-Ala-OH	
33	Boc-D-Leu-OH	
34	Boc-D-Val-OH	
35	Boc-D-Phe-OH	
36	Boc-D-Pro-OH	

**Tableau III.2** : acides aminés *N*-Boc protégés utilisés pour la création de la chimiothèque de dipeptides carboxamides

Il est difficile d'évaluer avec précision les rendements de cette synthèse à cause de la présence des sels de TFA/pyridine. Mais en analysant le spectre RMN, le rendement est estimé à 80 %. Par exemple, sur le spectre RMN du dipeptide Boc-Phe-Pro-NH<sub>2</sub> est présenté **figure III.3**, d'après les intégrations, il y a 1,6 mol de pyridine (ou sel de pyridine/TFA) pour une mole de dipeptide.



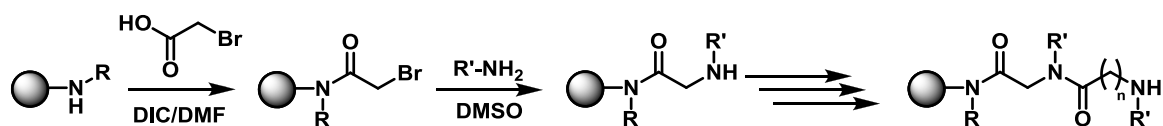
**Figure III.3** : spectre RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, 298 K, 5 mg.ml<sup>-1</sup>) du dipeptide Boc-Phe-Pro-NH<sub>2</sub>

Un calcul de la quantité de matière de dipeptide carboxamide à partir de la masse récupérée après clivage de la résine *Sieber* est possible en prenant en compte la quantité de sel de pyridine/TFA et la quantité de pyridine "libre". Pour l'exemple ci-dessus, le rendement calculé est de 79 %.

### II.2.b. Voie B : voie peptidique

La voie A est très intéressante mais elle est limitée par le nombre d'acides aminés *N*-alkylés Fmoc commerciaux. En 1992, Zuckermann a publié la synthèse sur support solide d'oligomères de *N*-alkyl-glycines<sup>171</sup> aussi appelés "peptoïdes" (**schéma III.11**). Cette synthèse dite « submonomer » fait intervenir une réaction de déplacement nucléophile du brome de

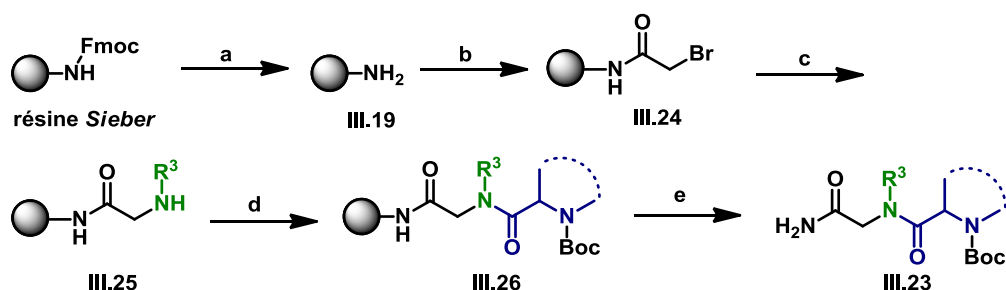
la chaîne en croissance par une amine primaire ce qui permet d'introduire une grande diversité chimique dans les séquences.



**Schéma III.11** : synthèse de peptoides sur support solide

Cette synthèse n'était pas adaptée aux chaînes latérales contenant un hétérocycle non protégé tel qu'un cycle pyridine ou un imidazole. En effet, lors des tentatives d'utilisation de tels substituants, un mélange complexe de sous-produits était obtenu après clivage.<sup>172</sup> L'incorporation de ces hétérocycles non protégés pose problème puisque l'acide bromoacétique est en mesure de faire une réaction d'alkylation avec les azotes des cycles au lieu de faire une réaction d'acylation sur l'amine de la résine. Le remplacement de l'acide bromoacétique par l'acide chloroacétique permet la synthèse des peptoides avec des hétérocycles non protégés sur les chaînes latérales. Le chlore étant un plus mauvais groupe partant, la réaction d'acylation prédomine sur la réaction d'alkylation.<sup>172</sup>

Appliquée à la synthèse de dipeptides carboxamides sur la résine *Sieber*, cette méthodologie « submonomer » présente l'intérêt d'augmenter considérablement la diversité des séquences de 1,3,5-triazépane-2,6-diones accessibles et de palier à la faible diversité des acides aminés *N*-alkylés commerciaux. La séquence réactionnelle mise au point dans ce cadre est détaillée sur le **schéma III.12**.



a) pipéridine/DMF (1:4), 2 x 20 min; b) acide bromoacétique (2 équ.), DIC (2 équ.), HOBT (2 équ.), DMF, 2h; c)  $R^3-NH_2$  (2 équ.), TEA (2 équ.), TA, DMF, 4h ; d) *N*-Boc-aminoacide (2 équ.), DIC (2 équ.), HOBT (2 équ.), DMF; e) TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 : 98), 10 x 2 min

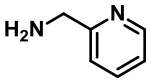
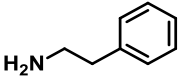
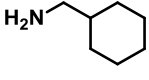
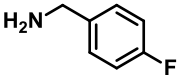
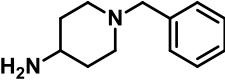
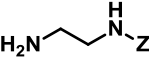
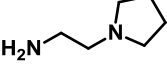
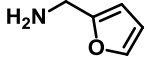
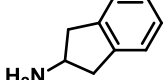
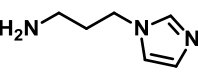
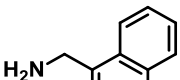
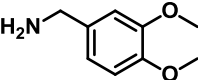
**Schéma III.12** : synthèse de dipeptides amides une approche « submonomer »

Après avoir éliminé le groupement Fmoc par traitement avec la pipéridine, l'acide bromoacétique est couplé sur la résine dans les conditions classiques de couplage peptidique c'est-à-dire en présence de DIC et de HOBt. Ensuite, une amine primaire est utilisée pour réaliser la substitution nucléophile du brome en présence de triéthylamine. Le composé **III.25** obtenu est équivalent au composé **III.21** du **schéma III.10**. La suite de la synthèse est la même que celle décrite au **schéma III.10**. Cette séquence réactionnelle a permis de préparer une série de 57 dipeptides carboxamides originaux à partir d'un pool de 30 amines primaires (**bloc C**) (**tableau III.3**) et de 5 acides aminés *N*-Boc protégés différents (**Bloc B**, Boc-L-Phe-OH, Boc-L-Tic-OH, Boc-L-Leu-OH, Boc-L-Ser(OBn)-OH et Boc-L-Val-OH) (voir **tableau III.2**).



C	Amine	
1	<i>N</i> -(2-Aminoéthyl)acétamide	
2	<i>N,N</i> -diméthyléthylamine	
3	héxylamine	
4	benzylamine	
5	<i>(S)</i> - $\alpha$ -méthylbenzylamine	
6	<i>(R)</i> -1-(2-naphtyl)éthylamine	
7	propargylamine	
8	<i>O</i> - <i>t</i> Bu-L-thréonine- <i>t</i> Bu ester	
9	4-chlorobenzylamine	



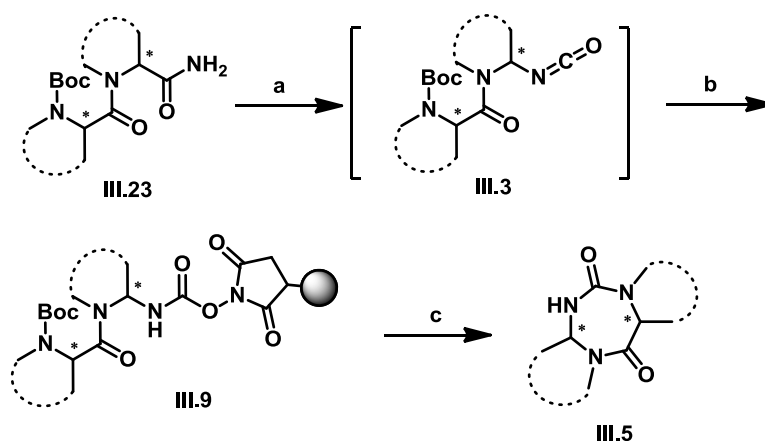
10	2-picolylamine	
11	phénéthylamine	
12	cyclohexaneméthylamine	
13	4-fluorobenzylamine	
14	4-amino-1-benzylpipéridine	
15	<i>N</i> -Z-éthylènediamine	
16	1-(2-aminoéthyl)pyrrolidine	
17	furfurylamine	
18	2-aminoindane	
19	1-(3-aminopropyl)imidazole	
20	naphtylméthylamine	
21	3,4-diméthoxybenzylamine	

22	allylamine	
23	cyclohexylamine	
24	éthylamine	
25	3-morpholinepropylamine	
26	3-diméthylaminopropylamine	
27	isopropylamine	
28	propylamine	
29	3-méthoxypropylamine	
30	isobutylamine	

**Tableau III.3** : amines primaires utilisées pour la synthèse des dipeptides carboxamide par la voie B

### II.3. Validation de la séquence réactionnelle

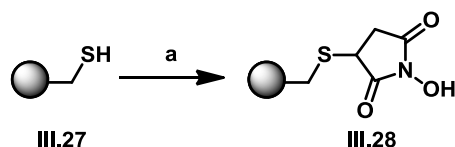
Les dipeptides carboxamides sont obtenus après clivage de la résine *Sieber*. Le TFA qui a servi au clivage est neutralisé par de la pyridine puis le brut est concentré sous pression réduite. Ils sont ensuite directement engagés dans les étapes suivantes de la synthèse à savoir le *réarrangement d'Hofmann*, le piégeage de l'isocyanate formé par une résine *N*-hydroxysuccinimide et le cyclo-clivage (**schéma III.13**)



a) PIFA (0,8 éq.), pyridine (1,6 éq.), THF, TA, 1h; b) PS-SuOH (0,2 éq.), TA, THF, 4h; c) (i) TFA/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:2, v/v), TA, 2 x 25 min, (ii) DIEA (5 éq.), THF, 35°C, 4h

**Schéma III.13** : réarrangement de Hofmann et cyclo-clivage

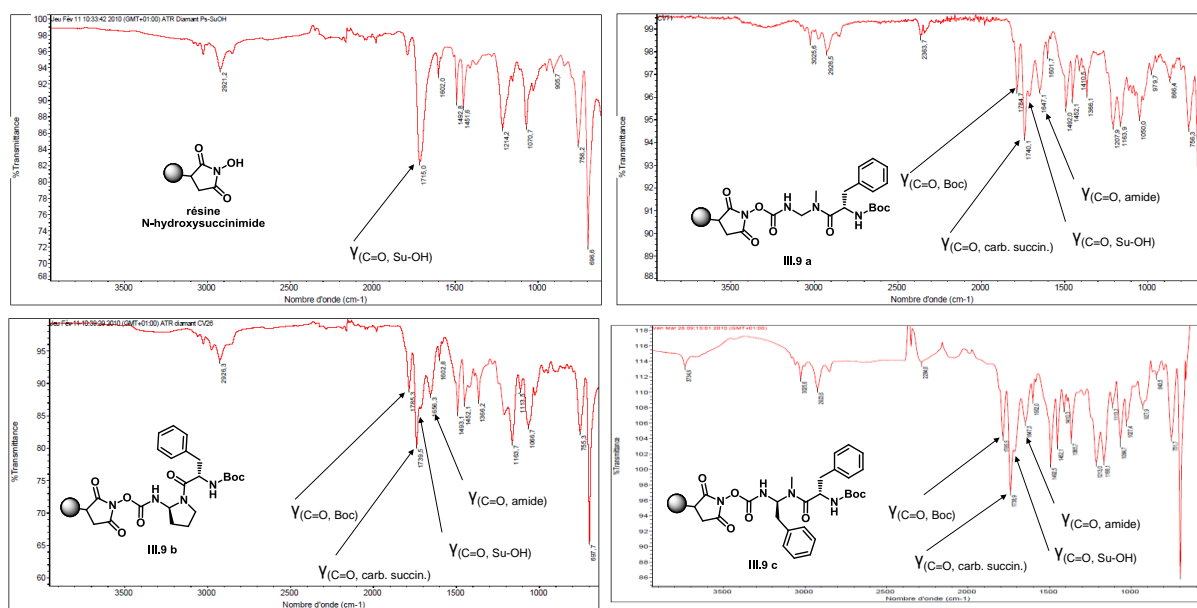
Le traitement des dipeptides carboxamides **III.23** par le PIFA (bis((trifluoroacétoxy)iodo)benzène) en présence de pyridine conduit à la formation des isocyanates **III.3**. Après une heure de réaction, la résine polystyrène fonctionnalisée par un groupe *N*-hydroxysuccinimide (PS-SuOH, loading = 1,56 mmol.g<sup>-1</sup>) est ajoutée pour piéger l'isocyanate sous forme de carbamate de succinimidyle supporté **III.9**. Seul 0,2 équivalent de résine *N*-hydroxysuccinimide est utilisé pour s'assurer de la complète substitution de la résine. Cette résine *N*-hydroxysuccinimide n'est pas commerciale mais elle est obtenue en une étape à partir de la résine mercaptométhyl-polystyrène **III.27** (**schéma III.14**). Cette dernière est traitée avec du *N*-hydroxymaléimide en présence de DIEA dans le THF.<sup>173</sup>



a) N-hydroxymaléimide (2 éq.), DIEA (0,4 éq.), THF

**Schéma III.14** : synthèse de la résine N-hydroxysuccinimide

Comme dans le cas de la synthèse sur la résine oxime, l'efficacité du piégeage de l'isocyanate par la résine N-hydroxysuccinimide peut être évaluée par spectroscopie FT-IR. La **figure III.4** présente la validation FT-IR de cette séquence réactionnelle pour les carbamates supportés dérivés des dipeptides Boc-L-Phe-Sar-NH<sub>2</sub> (**III.23 a**), Boc-L-Phe-L-Pro-NH<sub>2</sub> (**III.23 b**) et Boc-L-Phe-L-NMe-Phe-NH<sub>2</sub> (**III.23 c**)

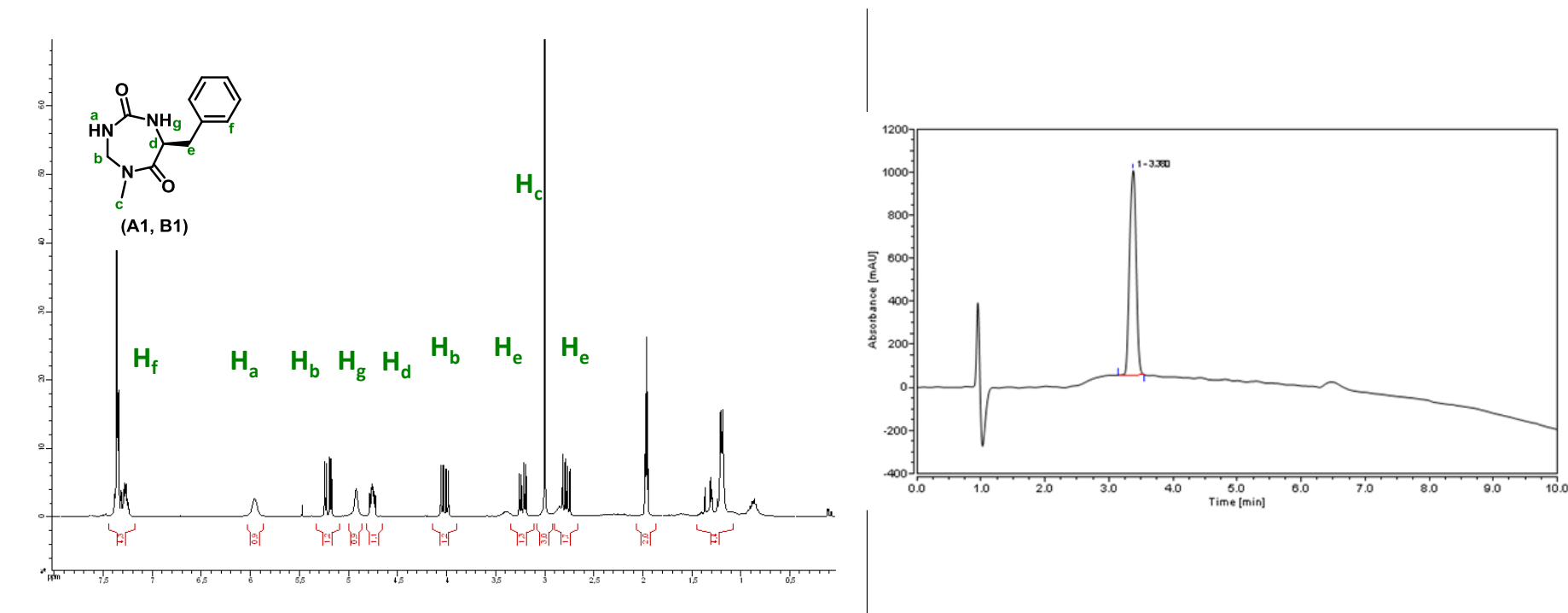


**Figure III.4** : Evaluation de l'efficacité de la synthèse des carbamates supportés **III.9 a**, **III.9 b** et **III.9 c**

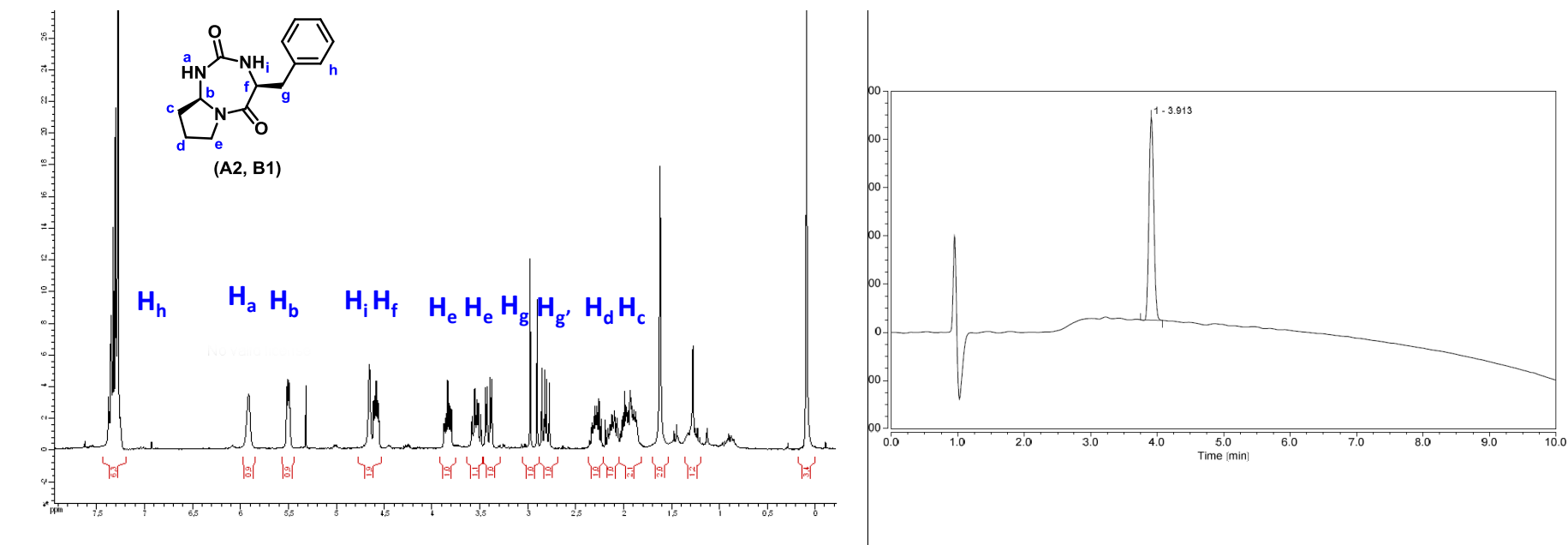
L'apparition des bandes à  $1785\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu(\text{C=O, Boc})$ ),  $1740\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu(\text{C=O, carb. succin.})$ ),  $1709\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu(\text{C=O, Su-OH.})$ ) et  $1648\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu(\text{C=O, amide.})$ ) indicatrices de la formation des carbamates supportés **III.9 a**, **III.9 b** et **III.9 c**. permet de valider l'étape de piégeage de l'isocyanate.

L'amine des carbamates supportés **III.9** est déprotégée par du TFA en solution dans le dichlorométhane puis la cyclisation est réalisée dans le THF à 35°C en présence de base.

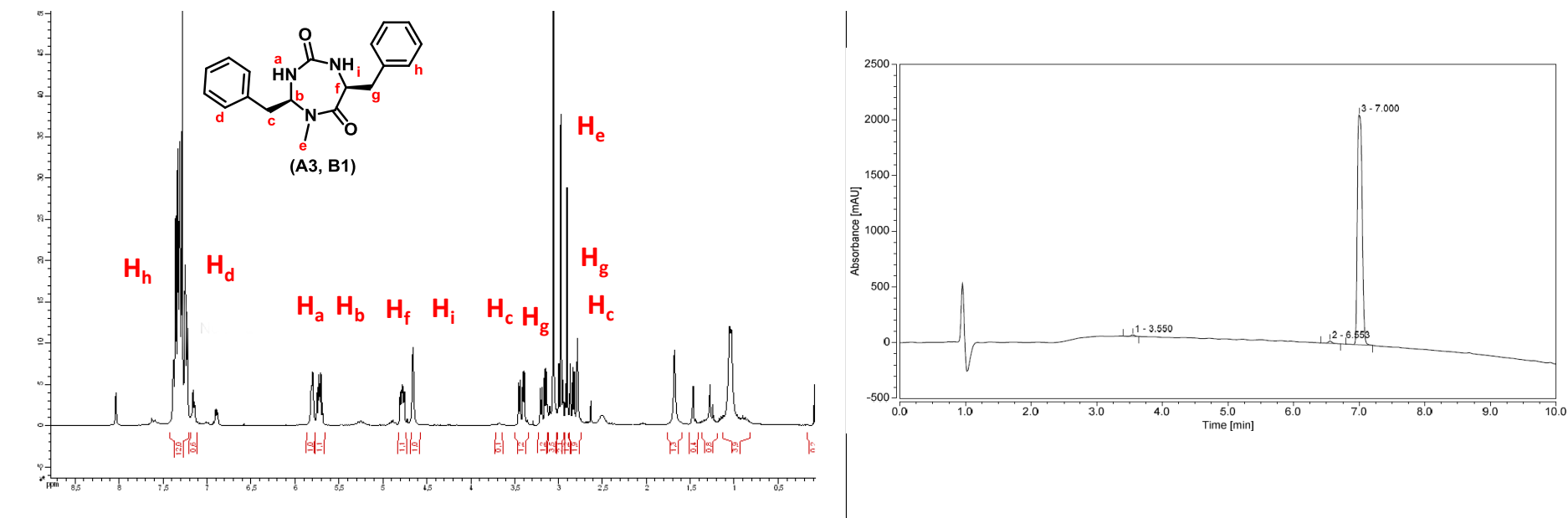
Après l'étape de cycloclivage et de filtration de la résine, le milieu réactionnel ne devrait comprendre que l'hétérocycle **III.5**, de la DIEA et un sel de TFA/DIEA. L'utilisation d'une résine bicarbonate de triméthylammonium permet de piéger le TFA, la base étant ensuite éliminée par concentration sous vide. Dans les trois cas ayant servi à la validation, la pureté basée sur l'analyse HPLC des composés obtenus est bien supérieure à 80 %. Le composé *cyclo*(Phe-*g*Sar-CO) (**A1**, **B1**) (**figure III.5**) est obtenu avec une pureté de 93 %, le composé *cyclo*((L)-Phe-*g*((L)-Pro)-CO) (**A2**, **B1**) (**figure III.6**) est obtenu avec une pureté de 98 % et le composé *cyclo*((L)-Phe-*g*((L)-NMe-Phe)-CO) (**A3**, **B1**) (**figure III.7**) est obtenu avec une pureté de 93 %.



**Figure III.5** : spectre RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>CN, 300 MHz, 298 K, 10 mg.ml<sup>-1</sup>) et chromatogramme HPLC (C<sub>18</sub>-HPLC (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 20-80% B, 1 mL/min, 10 min)) de (A1, B1) obtenu sans purification par cyclo-clivage à partir de Boc-Phe-Sar-NH<sub>2</sub>



**Figure III.6** : spectre RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{Cl}$ , 300 MHz, 298 K,  $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) et chromatogramme HPLC ( $\text{C}_{18}$ -HPLC (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 20-80% B, 1 mL/min, 10 min)) de (A2, B1) obtenu sans purification par cyclo-clivage à partir de Boc-Phe-Pro- $\text{NH}_2$



**Figure III.7** : spectre RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>Cl, 300 MHz, 298 K, 10 mg.ml<sup>-1</sup>) et chromatogramme HPLC (C<sub>18</sub>-HPLC (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 20-80% B, 1 mL/min, 10 min)) de (A3, B1) obtenu sans purification par cyclo-clivage à partir de Boc-Phe-NMe-Phe-NH<sub>2</sub>



D'après ces trois exemples, la méthode de synthèse sur support est validée. La prochaine étape est la synthèse en parallèle grâce au synthétiseur parallèle MiniBlock™.

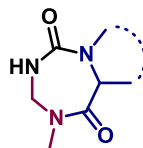
## II.4. Chimiothèque de 1,3,5-triazépane-2,6-diones

La chimiothèque de dipeptides carboxamides comptait 137 dipeptides dont 80 ont été obtenus à partir d'acides aminés commerciaux (voie A) et 57 sont issus de la voie peptidique (voie B). Le *réarrangement d'Hofmann* et le cyclo-clivage ont été réalisés pour tous ses dipeptides, ce qui a conduit à la synthèse de 109 cycles (67 dont les dipeptides ont été obtenus par la voie A et 42 dont les dipeptides ont été obtenus par la voie B). Tous les hétérocycles ont été caractérisés par RMN du proton, par spectrométrie de masse et par HPLC lorsque ceux-ci absorbent suffisamment pour une détection UV.

Pour simplifier la lecture de la chimiothèque de 1,3,5-triazépane-2,6-diones, nous avons choisi de mettre en place la nomenclature suivante : Lorsque le cycle est formé par cyclisation d'un dipeptide carboxamide obtenu à partir d'acides aminés commerciaux A et B (**tableaux III.2 et III.3**), il sera noté (**Ax, By**) et lorsque le dipeptide a été obtenu par la voie des peptoides, il sera noté (**Cz, By**). Par exemple le composé *cyclo(Phe-gSar-CO)* apparaît sous l'appellation (**A1, B1**) alors que *cyclo(Phe-g(N-héxyle)Gly-OH)* est noté (**C1, B1**).

Les résultats sont présentés dans cinq tableaux, le premier comprenant les hétérocycles dont le dipeptide carboxamide est dérivé de la sarcosine, (**tableau III.4**), le second comprenant les hétérocycles dont le dipeptide est dérivé de la proline et de séquence homochirale (**tableau III.5**), le troisième regroupe les cycles dérivant de séquences hétérochirales (**tableau III.6**), le quatrième comportant les autres cycles dont les dipeptides ont été obtenus par la voie A (**tableau III.7**) et le cinquième présente les cycles dont les dipeptides ont été obtenus par la voie B (**tableau III.7**).

Les rendements présentés dans les différents tableaux sont calculés par rapport à la quantité de résine PS-SuOH **III.28** introduite et les puretés HPLC (C<sub>18</sub>-HPLC, (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA dans CH<sub>3</sub>CN) sont celles des bruts réactionnels après traitement avec la résine bicarbonate de triméthylammonium, les puretés HPLC ne sont notées que pour les produits visibles en UV.



(A1, By)

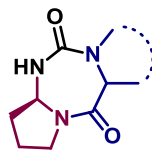
	nom	Rdt (%)	Pureté HPLC (%)		nom	Rdt (%)	Pureté HPLC (%)
(A1, B1)	<i>cyclo</i> ((L)-Phe- <i>gSar</i> -CO)	71	93	(A1, B14)	<i>cyclo</i> ((L)-Lys(2-Cl-Z)- <i>gSar</i> -CO)	28	95
(A1, B2)	<i>cyclo</i> ((L)-Cha- <i>gSar</i> -CO)	42	88	(A1, B15)	<i>cyclo</i> ((L)-Pro- <i>gSar</i> -CO)	39	- <sup>a</sup>
(A1, B3)	<i>cyclo</i> ((L)- $\alpha$ -tBu-Gly- <i>gSar</i> -CO)	36	80	(A1, B16)	<i>cyclo</i> ((L)-NMe-Phe- <i>gSar</i> -CO)	33	49
(A1, B4)	<i>cyclo</i> ((L)-HomoPhe- <i>gSar</i> -CO)	25	89	(A1, B17)	<i>cyclo</i> ((L)-NMe-Leu- <i>gSar</i> -CO)	20	- <sup>a</sup>
(A1, B5)	<i>cyclo</i> ((L)-Orn(2-Cl-Z)- <i>gSar</i> -CO)	22	90	(A1, B21)	<i>cyclo</i> ((L)-Thr(OBn)- <i>gSar</i> -CO)	5	82
(A1, B6)	<i>cyclo</i> ((L)-Glu(OcHx)- <i>gSar</i> -CO)	31	100	(A1, B22)	<i>cyclo</i> ((L)-(4-Cl)-Phe- <i>gSar</i> -CO)	18	100
(A1, B7)	<i>cyclo</i> ((L)-Ala- <i>gSar</i> -CO)	44	- <sup>a</sup>	(A1, B23)	<i>cyclo</i> ((L)-Nle- <i>gSar</i> -CO)	19	90
(A1, B8)	<i>cyclo</i> ((L)-Asp(OBn)- <i>gSar</i> -CO)	39	100	(A1, B25)	<i>cyclo</i> ((L)-Ile- <i>gSar</i> -CO)	14	- <sup>a</sup>
(A1, B10)	<i>cyclo</i> ((L)-Glu(OBn)- <i>gSar</i> -CO)	31	92	(A1, B26)	<i>cyclo</i> ((L)- $\beta$ -tBu-Ala- <i>gSar</i> -CO)	16	36
(A1, B11)	<i>cyclo</i> ((L)-Leu- <i>gSar</i> -CO)	47	100	(A1, B27)	<i>cyclo</i> ((L)-cyclopropyl-Ala- <i>gSar</i> -CO)	13	- <sup>a</sup>
(A1, B12)	<i>cyclo</i> ((L)-Ser(OBn)- <i>gSar</i> -CO)	33	92	(A1, B34)	<i>cyclo</i> ((D)-Val- <i>gSar</i> -CO)	13	- <sup>a</sup>
(A1, B13)	<i>cyclo</i> ((L)-Val- <i>gSar</i> -CO)	42	100				

<sup>a</sup> produits non visible en UV

**Tableau III.4** : 1,3,5-triazépane-2,6-diones possédant un résidu *gem*-sarcosine

Comme on peut le noter dans le **tableau III.4**, à l'exception des composés (**A1**, **B16**) et (**A1**, **B26**), les puretés HPLC des bruts sont supérieures 80 %. En revanche les rendements sont moins bons que pour les composés ayant servi de modèles à la mise en place de la synthèse.

Les composés dont le premier acide aminé à voir été couplé sur la résine *Sieber* est une (L)-proline et qui sont formés à partir d'une séquence homochirale sont présentés dans le **tableau III.5**. Les hétérocycles issus de la cyclisation d'une séquence hétérochirale sont présentés dans le **tableau III.6**.

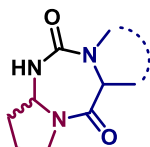


(A2, By)

	nom	Rdt (%)	Pureté HPLC (%)		nom	Rdt (%)	Pureté HPLC (%)
(A2, B1)	<i>cyclo</i> ((L)-Phe- <i>g</i> ((L)-Pro)-CO)	88	98	(A2, B11)	<i>cyclo</i> ((L)-Leu- <i>g</i> ((L)-Pro)-CO)	82	- <sup>a</sup>
(A2, B2)	<i>cyclo</i> ((L)-Cha- <i>g</i> ((L)-Pro)-CO)	55	98	(A2, B12)	<i>cyclo</i> ((L)-Ser(OBn)- <i>g</i> ((L)-Pro)-CO)	24	89
(A2, B3)	<i>cyclo</i> ((L)- α-tBu-Gly- <i>g</i> ((L)-Pro)-CO)	36	- <sup>a</sup>	(A2, B13)	<i>cyclo</i> ((L)-Val- <i>g</i> ((L)-Pro)-CO)	41	- <sup>a</sup>
(A2, B4)	<i>cyclo</i> ((L)-HomoPhe- <i>g</i> ((L)-Pro)-CO)	38	98	(A2, B14)	<i>cyclo</i> ((L)-Lys(2-Cl-Z)- <i>g</i> ((L)-Pro)-CO)	33	99
(A2, B5)	<i>cyclo</i> ((L)-Orn(2-Cl-Z)- <i>g</i> ((L)-Pro)-CO)	61	93	(A2, B15)	<i>cyclo</i> ((L)-Pro- <i>g</i> ((L)-Pro)-CO)	52	- <sup>a</sup>
(A2, B6)	<i>cyclo</i> ((L)-Glu(OcHx)- <i>g</i> ((L)-Pro)-CO)	58	91	(A2, B16)	<i>cyclo</i> ((L)-NMe-Phe- <i>g</i> ((L)-Pro)-CO)	33	87
(A2, B7)	<i>cyclo</i> ((L)-Ala- <i>g</i> ((L)-Pro)-CO)	30	- <sup>a</sup>	(A2, B17)	<i>cyclo</i> ((L)-NMe-Leu- <i>g</i> ((L)-Pro)-CO)	50	98
(A2, B8)	<i>cyclo</i> ((L)-Asp(OBn)- <i>g</i> ((L)-Pro)-CO)	41	80	(A2, B19)	<i>cyclo</i> ((L)-Tic- <i>g</i> ((L)-Pro)-CO)	81	84
(A2, B9)	<i>cyclo</i> ((L)-Cys(4MeBn)- <i>g</i> ((L)-Pro)-CO)	15	50	(A2, B28)	<i>cyclo</i> (Aib- <i>g</i> ((L)-Pro)-CO)	31	90
(A2, B10)	<i>cyclo</i> ((L)-Glu(OBn)- <i>g</i> ((L)-Pro)-CO)	30	100				

<sup>a</sup> produits non visible en UV

**Tableau III.5** : 1,3,5-triazépane-2,6-diones homochirales possédant un cycle pyrrolidine



(A2, B<sub>y</sub>) et (A13, B<sub>y</sub>)

	nom	Rdt (%)	Pureté HPLC (%)
(A2, B32)	<i>cyclo</i> ((D)-Ala- <i>g</i> ((L)-Pro)-CO)	19	- <sup>a</sup>
(A2, B33)	<i>cyclo</i> ((D)-Leu- <i>g</i> ((L)-Pro)-CO)	67	96
(A2, B35)	<i>cyclo</i> ((D)-Phe- <i>g</i> ((L)-Pro)-CO)	68	80
(A2, B36)	<i>cyclo</i> ((D)-Pro- <i>g</i> ((L)-Pro)-CO)	42	- <sup>a</sup>
(A13, B1)	<i>cyclo</i> ((L)-Phe- <i>g</i> ((D)-Pro)-CO)	29	94
(A13, B10)	<i>cyclo</i> ((L)-Glu(OBn)- <i>g</i> ((D)-Pro)-CO)	66	83
(A13, B13)	<i>cyclo</i> ((L)-Val- <i>g</i> ((D)-Pro)-CO)	80	71

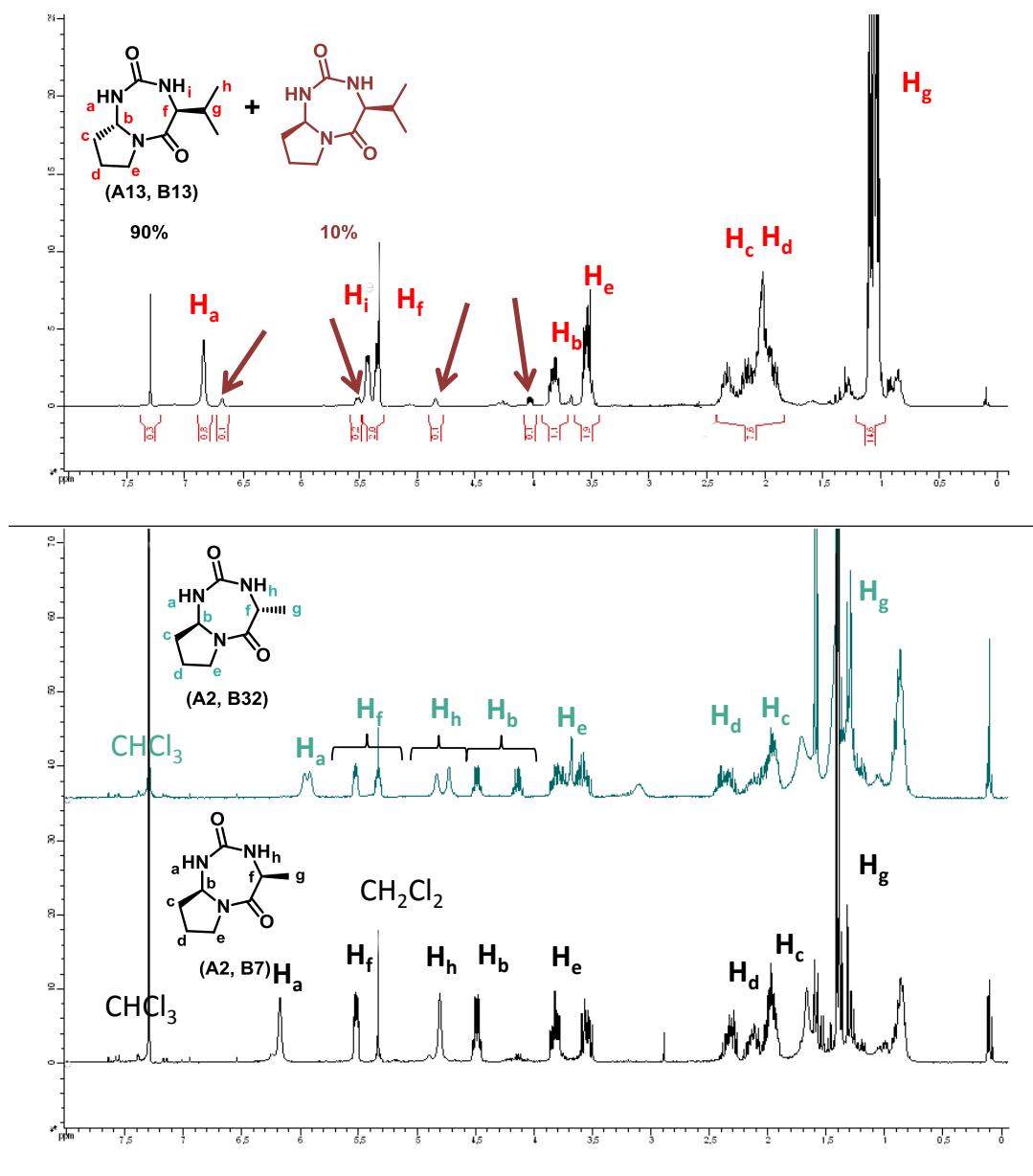
<sup>a</sup> produits non visible en UV

**Tableau III.6** : 1,3,5-triazépane-2,6-diones issues de séquences hétérochirales possédant un cycle pyrrolidine

De même que pour les dérivés du **tableau III.4**, les puretés HPLC des produits présentés dans les **tableaux III.5** et **III.6** sont supérieures à 80 % sauf pour les composés (A2, B9) et (A13, B13). D'après les **tableaux III.5** et **III.6**, les rendements des séquences hétérochirales sont plus faibles que ceux des séquences homochirales correspondantes (sauf pour (A13, B10) et (A13, B13) mais leurs puretés sont moindres d'après les HPLC). Il semblerait donc que la réaction de cyclo-clivage soit sensible à la stéréochimie de la séquence.

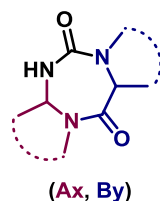
L'étude <sup>1</sup>H RMN et C<sub>18</sub> RP-HPLC de composés issus de séquences hétérochirales montre la présence dans diverses proportions d'un second cycle résultant d'une épimérisation sur le carbone en  $\alpha$  de la *gem*-proline, les produits de cycloclivage correspondant aux cycles (A2, B33), (A2, B35), (A2, B36), (A13, B13), (A13, B10), et (A13, B1) contiennent le diastéréoisomère correspondant à hauteur de 10 %. (**figure III.8**, haut). De même le mélange réactionnel contenant le cycle *cyclo*((D)-Ala-*g*((L)-Pro)-CO) (A2, B32) est composé à 50 % du diastéréoisomère *cyclo*((D)-Ala-*g*((D)-Pro)-CO) (**figure III.8**, bas). Des études plus anciennes réalisées notamment par le groupe de Murray Goodman sur la conversion de la proline en dérivé *gem*-diamine par réarrangement de Curtius en présence d'alcool suggère la possibilité

d'une racémisation du dérivé *gem*-diamine de la proline. C'est le seul cas reporté d'une racémisation lors de cette réaction.<sup>174</sup>



**Figure III.8** : spectre RMN de (A13, B13) brut (CDCl<sub>3</sub>, 300 MH, 298K, 10 mg.ml<sup>-1</sup>) (en haut) et superposition des spectres RMN des composés (A13, B7) et (A2, B7) bruts (CDCl<sub>3</sub>, 300 MH, 298K, 10 mg.ml<sup>-1</sup>) (en bas)

Dans le quatrième tableau (tableau III.7) sont regroupés les hétérocycles dont le premier acide aminé couplé sur la résine *Sieber* est différent de la sarcosine ou de la proline. Ces acides aminés sont soit des acides aminés acycliques, cycliques ou bicycliques. Des systèmes tétracycliques comme (A8, B19) ont ainsi pu être obtenus avec de bonnes puretés HPLC.

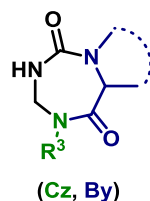


	nom	Rdt (%)	Pureté HPLC (%)
(A3, B1)	<i>cyclo</i> ((L)-Phe- <i>g</i> ((L)-NMe-Phe)-CO)	28	93
(A3, B6)	<i>cyclo</i> ((L)-Glu(OcHx)- <i>g</i> ((L)-NMe-Phe)-CO)	35	94
(A3, B17)	<i>cyclo</i> ((L)-NMe-Leu- <i>g</i> ((L)-NMe-Phe)-CO)	45	100
(A3, B18)	<i>cyclo</i> (NMe-Gly- <i>g</i> ((L)-NMe-Phe)-CO)	30	73
(A4, B1)	<i>cyclo</i> ((L)-Phe- <i>g</i> (4-(S)-cyclohexyl)Pro-CO)	23	90
(A5, B1)	<i>cyclo</i> ((L)-Phe- <i>g</i> (4-(S)-fluoro)Pro-CO)	21	97
(A6, B1)	<i>cyclo</i> ((L)-Phe- <i>g</i> NChg-CO)	24	100
(A7, B1)	<i>cyclo</i> ((L)-Phe- <i>g</i> ((L)-Oic)-CO)	39	98
(A8, B1)	<i>cyclo</i> ((L)-Phe- <i>g</i> ((L)-Tic)-CO)	19	100
(A9, B1)	<i>cyclo</i> ((L)-Phe- <i>g</i> ((4-(S)-N <sub>3</sub> )-(L)-Pro)-CO)	27	99
(A8, B6)	<i>cyclo</i> ((L)-Glu(OcHx)- <i>g</i> ((L)-Tic)-CO)	16	100
(A8, B15)	<i>cyclo</i> ((L)-Pro- <i>g</i> ((L)-Tic)-CO)	13	95
(A8, B17)	<i>cyclo</i> ((L)-NMe-Leu- <i>g</i> ((L)-Tic)-CO)	36	89
(A8, B18)	<i>cyclo</i> (NMe-Gly- <i>g</i> ((L)-Tic)-CO)	18	- <sup>a</sup>
(A8, B19)	<i>cyclo</i> ((L)-Tic- <i>g</i> ((L)-Tic)-CO)	54	94
(A10, B1)	<i>cyclo</i> ((L)-Phe- <i>g</i> ((L)-Pip)-CO)	48	100
(A10, B19)	<i>cyclo</i> ((L)-Tic- <i>g</i> ((L)-Pip)-CO)	6	97
(A10, B24)	<i>cyclo</i> ((L)-3-(2-naphtyl)-Ala- <i>g</i> ((L)-Pip)-CO)	33	99

<sup>a</sup> produits non visible en UV

**Tableau III.7:** 1,3,5-triazépane-2,6-diones dont le premier acide aminé *N*-alkylé couplé sur la résine *Sieber* est différent de la sarcosine ou de la proline

Dans le cinquième tableau (**tableau III.8**) sont regroupés les cycles dont le dipeptide carboxamide a été obtenu par la voie B. Cette méthodologie a permis la synthèse de cycles originaux complétant de manière intéressante en termes de diversité les séries obtenues à partir d'acides aminés commerciaux.



	nom	Rdt (%)	Pureté HPLC (%)		nom	Rdt (%)	Pureté HPLC (%)
(C3, B1)	<i>cyclo</i> ((L)-Phe- <i>gN</i> (hexyl)Gly-CO)	20	100	(C20, B1)	<i>cyclo</i> ((L)-Phe- <i>gN</i> (naphthalèn-1-ylméthyl)Gly-CO)	30	95
(C4, B1)	<i>cyclo</i> ((L)-Phe- <i>gN</i> (Bn)Gly-CO)	23	99	(C21, B1)	<i>cyclo</i> ((L)-Phe- <i>gN</i> (3,4)(MeO) <sub>2</sub> Bn)Gly-CO)	8	97
(C5, B1)	<i>cyclo</i> ((L)-Phe- <i>gN</i> ( $\alpha$ -Me-Bn)Gly-CO)	22	92	(C22, B1)	<i>cyclo</i> ((L)-Phe- <i>gN</i> (allyl)Gly-CO)	43	100
(C7, B1)	<i>cyclo</i> ((L)-Phe- <i>gN</i> (propyne)Gly-CO)	21	100	(C23, B1)	<i>cyclo</i> ((L)-Phe- <i>gN</i> (cHx)Gly-CO)	77	100
(C9, B1)	<i>cyclo</i> ((L)-Phe- <i>gN</i> ((4-Cl)-Bn)Gly-CO)	20	98	(C24, B1)	<i>cyclo</i> ((L)-Phe- <i>gN</i> (Et)Gly-CO)	31	90
(C10, B1)	<i>cyclo</i> ((L)-Phe- <i>gN</i> (pyridin-2-ylméthyl)Gly-CO)	33	99	(C27, B1)	<i>cyclo</i> ((L)-Phe- <i>gN</i> ( <i>i</i> Pr)Gly-CO)	10	98
(C12, B1)	<i>cyclo</i> ((L)-Phe- <i>gN</i> (cyclohexylméthyl)Gly-CO)	37	100	(C28, B1)	<i>cyclo</i> ((L)-Phe- <i>gN</i> (Pr)Gly-CO)	5	95
(C13, B1)	<i>cyclo</i> ((L)-Phe- <i>gN</i> ((4-F)-Bn)Gly-CO)	28	99	(C29, B1)	<i>cyclo</i> ((L)-Phe- <i>gN</i> (3-méthoxypropyl)Gly-CO)	7	92
(C14, B1)	<i>cyclo</i> ((L)-Phe- <i>gN</i> (4-amino-benzylpipéridin-4-yl)Gly-CO)	33	97	(C30, B1)	<i>cyclo</i> ((L)-Phe- <i>gN</i> ( <i>i</i> Bu)Gly-CO)	11	96
(C15, B1)	<i>cyclo</i> ((L)-Phe- <i>gN</i> ( <i>N</i> -Z-éthylamino)Gly-CO)	20	99	(C10, B11)	<i>cyclo</i> ((L)-Leu- <i>gN</i> (pyridin-2-ylméthyl)Gly-CO)	23	98
(C17, B1)	<i>cyclo</i> ((L)-Phe- <i>gN</i> (furfuryl)Gly-CO)	21	97	(C11, B11)	<i>cyclo</i> ((L)-Leu- <i>gN</i> (phénéthyl)Gly-CO)	25	98
(C18, B1)	<i>cyclo</i> ((L)-Phe- <i>gN</i> (2,3-dihydro-1H-indèn-2-yl)Gly-CO)	33	100	(C12, B11)	<i>cyclo</i> ((L)-Leu- <i>gN</i> (cyclohexylméthyl)Gly-CO)	9	94
(C13, B11)	<i>cyclo</i> ((L)-Leu- <i>gN</i> ((4-F)-Bn)Gly-CO)	44	99	(C14, B19)	<i>cyclo</i> ((L)-Tic- <i>gN</i> (4-amino-benzylpipéridin-4-yl)Gly-CO)	7	60



<b>(C14, B11)</b>	<i>cyclo</i> ((L)-Leu- <i>gN</i> (4-amino-benzylpipéridin-4-yl)Gly-CO)	80	85	<b>(C15, B19)</b>	<i>cyclo</i> ((L)-Tic- <i>gN</i> ( <i>N</i> -Z-éthylamino)Gly-CO)	22	99
<b>(C18, B11)</b>	<i>cyclo</i> ((L)-Leu- <i>gN</i> (2,3-dihydro-1H-indèn-2-yl)Gly-CO)	23	100	<b>(C12, B12)</b>	<i>cyclo</i> ((L)-Ser(OBn)- <i>gN</i> (cyclohexylméthyl)Gly-CO)	37	99
<b>(C20, B11)</b>	<i>cyclo</i> ((L)-Leu- <i>gN</i> (naphthalèn-1-ylméthyl)Gly-CO)	11	95	<b>(C22, B12)</b>	<i>cyclo</i> ((L)-Ser(OBn)- <i>gN</i> (allyl)Gly-CO)	49	98
<b>(C21, B11)</b>	<i>cyclo</i> ((L)-Leu- <i>gN</i> (3,4)(MeO) <sub>2</sub> Bn)Gly-CO)	11	100	<b>(C23, B12)</b>	<i>cyclo</i> ((L)-Ser(OBn)- <i>gN</i> (cHx)Gly-CO)	56	98
<b>(C23, B11)</b>	<i>cyclo</i> ((L)-Leu- <i>gN</i> (cHx)Gly-CO)	62	78	<b>(C24, B12)</b>	<i>cyclo</i> ((L)-Ser(OBn)- <i>gN</i> (Et)Gly-CO)	16	99
<b>(C27, B11)</b>	<i>cyclo</i> ((L)-Leu- <i>gN</i> ( <i>i</i> Pr)Gly-CO)	38	- <sup>a</sup>	<b>(C21, B13)</b>	<i>cyclo</i> ((L)-Val- <i>gN</i> (3,4)(MeO) <sub>2</sub> Bn)Gly-CO)	6	98
<b>(C30, B11)</b>	<i>cyclo</i> ((L)-Leu- <i>gN</i> ( <i>i</i> Bu)Gly-CO)	11	98	<b>(C23, B13)</b>	<i>cyclo</i> ((L)-Val- <i>gN</i> (cHx)Gly-CO)	59	92
<b>(C10, B19)</b>	<i>cyclo</i> ((L)-Tic- <i>gN</i> (pyridin-2-ylméthyl)Gly-CO)	11	97	<b>(C27, B13)</b>	<i>cyclo</i> ((L)-Val- <i>gN</i> ( <i>i</i> Pr)Gly-CO)	20	- <sup>a</sup>

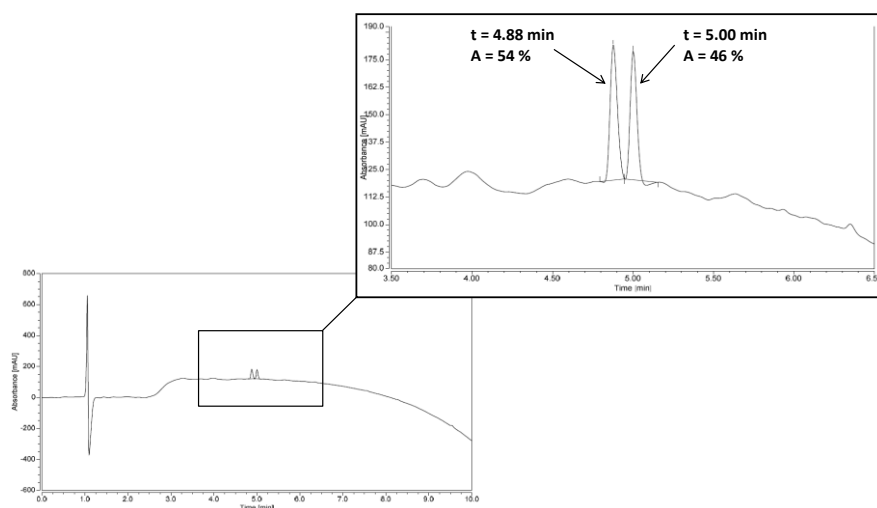
<sup>a</sup> produits non visible en UV

**Tableau III.8** : 1,2,3-triazépane-2,6-diones dont le dipeptide de départ a été obtenu par la voie B

La synthèse en parallèle sur support solide a donc permis l'obtention de plus d'une centaine de 1,3,5-triazépane-2,6-diones avec des puretés HPLC comprises entre 80 % et 100 %. Les quantités d'hétérocycles présents en fin de la synthèse sont comprises entre 2 mg et 15 mg, elles dépendent essentiellement des groupements présents sur les chaînes latérales, dans certains cas, la quantité d'hétérocycle est suffisante pour réaliser une étape supplémentaire de diversification post-cyclisation.

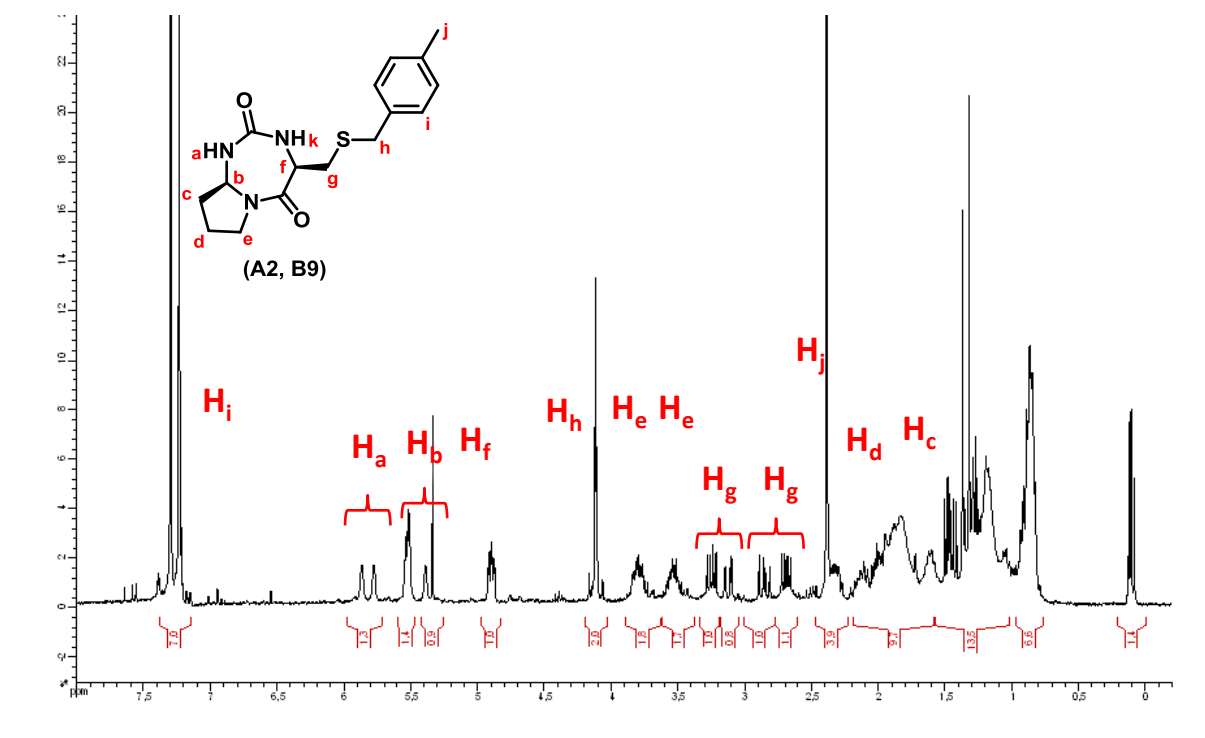
## II.5. Limitation de cette approche

Au total, la chimiothèque de dipeptides carboxamides comptait 137 membres mais seuls 109 hétérocycles ont été obtenus à partir de ces séquences, donc 28 dipeptides n'ont pas permis la synthèse d'hétérocycles soit 20 % de la chimiothèque des carboxamides. Pour certaines de ces séquences, ce résultat était prévisible en raison notamment de la sensibilité de certaines chaînes latérales à l'oxydation. En effet, le PIFA utilisé lors du *réarrangement de Hofmann* possède un caractère oxydant puissant, ce qui rend difficile l'utilisation d'acides aminés pouvant s'oxyder tels que l'histidine, la cystéine, la méthionine et le tryptophane même lorsque les fonctions sensibles de ces derniers sont protégées. Par exemple, l'utilisation du dipeptide Boc-L-Cys(4-MeBzl)-Pro-NH<sub>2</sub> conduit à la formation de deux composés d'après le chromatogramme HPLC (**figure III.9**).

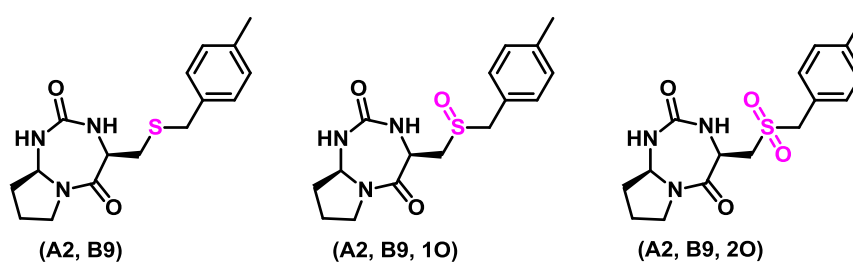


**Figure III.9** : chromatogramme HPLC résultant de la cyclisation de Boc-L-Cys(4-MeBzl)-Pro-NH<sub>2</sub> (C<sub>18</sub>-HPLC (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 10-100% B, 1 mL/min, 10 min))

D'après l'analyse du spectre RMN (**figure III.10**), les composés obtenus sont des composés hétérocycliques, l'atome de soufre ayant pu subir une ou deux oxydations, trois composés sont envisageables (**figure III.11**).



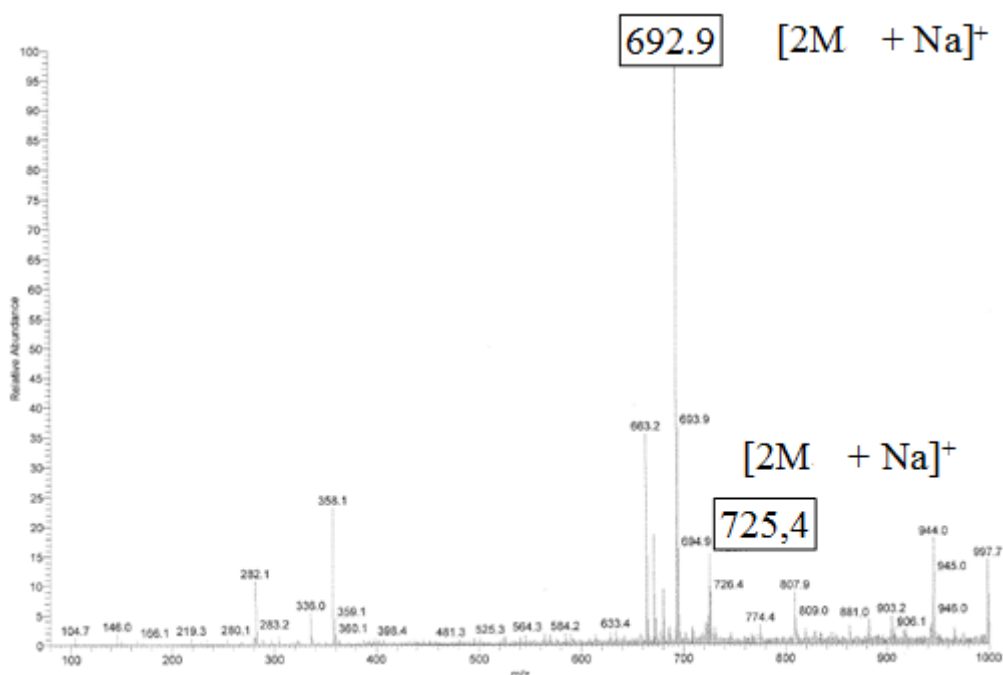
**Figure III.10** : spectre RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, 298 K, 6 mg.ml<sup>-1</sup>) du brut réactionnel de (A2, B9)



**Figure III.11** : oxydation du soufre par PIFA

	M	M + Na	2M	2M + Na
(A2, B9)	319,4	342,4	638,8	661,8
(A2, B9, 10)	335,4	348,4	670,8	693,8
(A2, B9, 20)	351,4	374,4	702,8	725,8

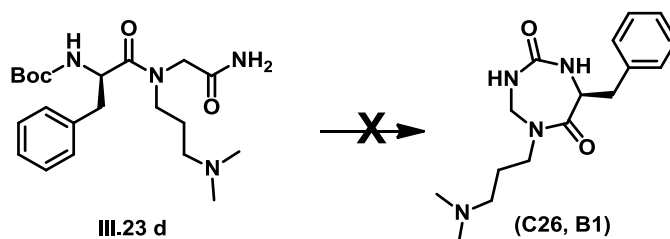
Le spectre de masse (**figure III.12**) du mélange met en évidence plusieurs masses intéressantes : 358,1 ; 663,2 et 692,9



**Figure III.12** : spectre de masse ESI

Il semble que le composé (**A2, B9, 10**) soit présent dans le produit isolé. La masse 725,4 pourrait correspondre à  $[2M + Na]^+$  du composé (**A2, B9, 20**) mais cette hypothèse demanderait à être confirmée.

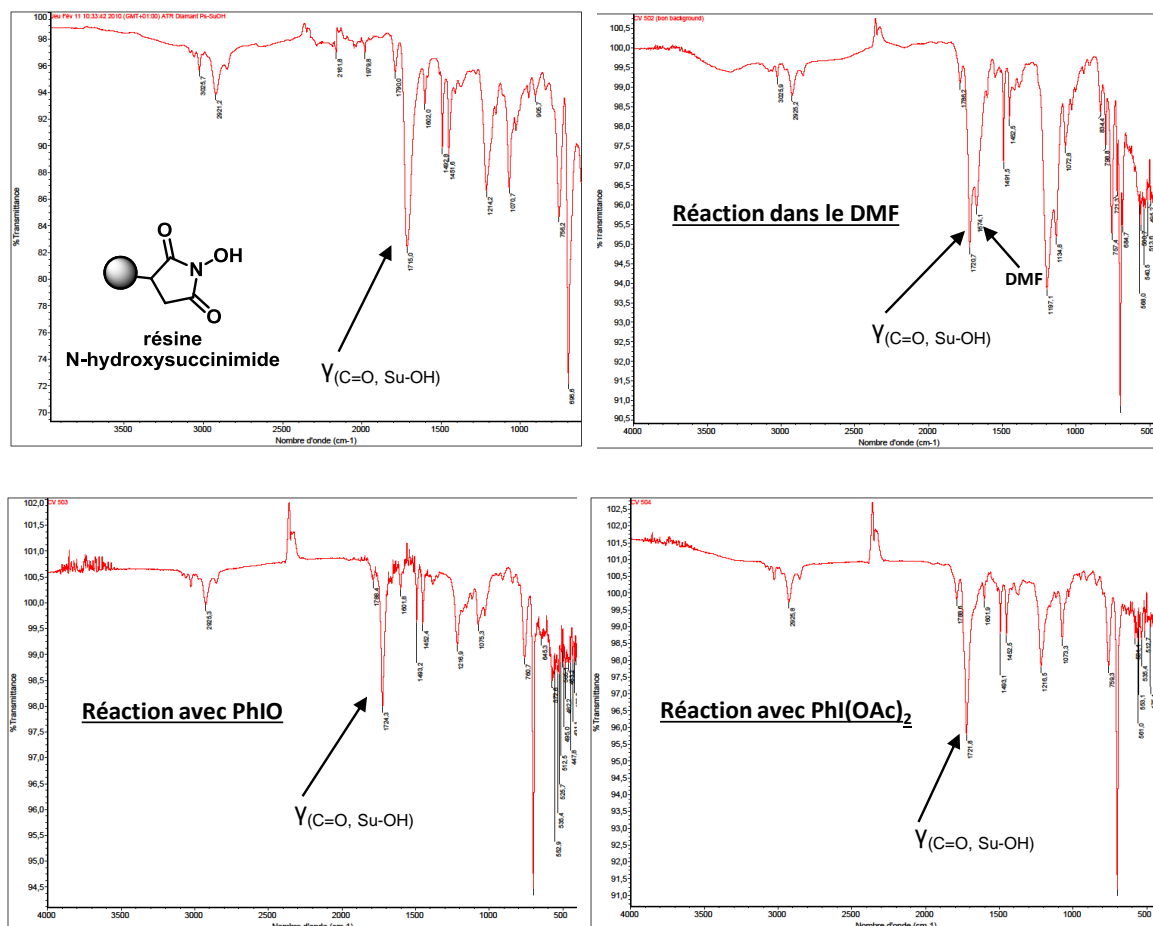
Il s'est également avéré difficile d'obtenir les hétérocycles possédant une amine tertiaire sur la chaîne latérale. Ainsi, les dipeptides carboxamides **III.23 d** préparés à partir des amines  $R^3-NH_2$  N,N-diméthyléthylamine (C2), 1-(2-aminoéthyl)pyrrolidine (C16), 3-morpholinopropylamine (C25) et 3-diméthylaminopropylamine (C26) pour la voie B n'ont pas conduit à l'obtention des cycles correspondants (**schéma III.15**).



**Schéma III.15** : deuxième limitation de la synthèse d'hétérocycle par *réarrangement de Hofmann*

Lorsque le PIFA est ajouté à une solution de dipeptide amide **III.23 d** dans le THF, un précipité se forme alors que ce n'est pas le cas pour les dipeptides amides ne possédant pas d'amine sur les chaînes latérales. Lors de la décomposition du PIFA, de l'acide trifluoroacétique est libéré dans le milieu or les pKa des amines tertiaires sont généralement supérieurs (ca 10) au pKa de la pyridine (5,1) et donc il est possible que l'acide trifluoroacétique soit piégé par l'amine tertiaire formant ainsi un sel non soluble dans le THF. La synthèse a ensuite été effectuée dans les mêmes conditions mais en utilisant du DMF distillé au lieu du THF. Le précipité visible dans la réaction avec le THF n'a pas été observé mais l'étape d'accrochage de l'isocyanate sur la résine PS-SuOH n'a pas eu lieu d'après le spectre FT-IR (**figure III.13**, en haut à droite).

Une autre option pour obtenir les cycles avec une amine tertiaire sur une chaîne latérale serait d'utiliser un autre dérivé d'iode hypervalent pour le *réarrangement d'Hofmann* comme PhIO. Dans un premier temps, nous avons testé la réactivité de PhIO en l'utilisant en remplacement du PIFA pour la synthèse de l'hétérocycle (**A1, B1**). Le cycle a été obtenu avec pureté équivalente (93%) mais avec un rendement de 40 % alors que le rendement était de 71 % avec le PIFA. Le composé PhIO a ensuite été utilisé pour la synthèse de (**C26, B1**) de même que PhI(OAc)<sub>2</sub> mais dans les deux cas et comme pour la réaction avec le PIFA dans le DMF, l'étape d'accrochage de l'isocyanate sur la résine PS-SuOH n'a pas pu être validée par FT-IR (**figure III.13**, PhIO en bas à gauche, et PhI(OAc)<sub>2</sub> en bas à droite). Sur les spectres FT-IR, seule la bande à 1720 nm caractéristique du groupe N-hydroxysuccinimide a été observée.



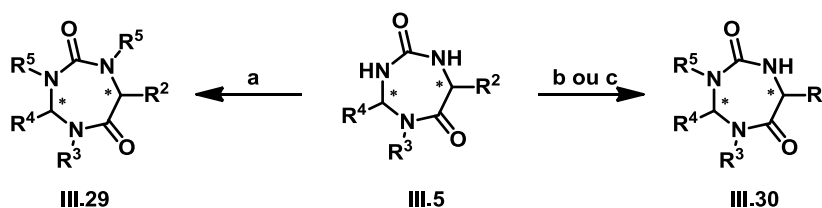
**Figure III.13** : spectres FT-IR de la résine PS-SuOH avant piègeage de l'isocyanate (en haut à gauche), après l'étape de d'accrochage de l'isocyanate formé par réarrangement de Hofmann du dipeptide **III.23 d** en présence de PIFA dans le DMF (en haut à droite), en présence de PhIO dans le THF (en bas à gauche) et en présence de Ph(OAc)<sub>2</sub> dans le THF (en bas à droite)

### III. Diversification post-cyclisation : création de chimiothèques de 1,3,5-triazépane-2,6-dione fonctionnalisées

#### III.1. Alkylation

Comme il a déjà été décrit, le squelette 1,3,5-triazépane-2,6-dione possède l'avantage de pouvoir distribuer cinq pharmacophores dans l'espace. Il est notamment possible d'ajouter des groupes fonctionnels directement sur les azotes de l'urée par des réactions post-

cyclisations. Les réactions de *N*-monoalkylation ou de *N,N*-dialkylation sont les plus simples à mettre en oeuvre (**schéma III.16**).<sup>146b</sup>

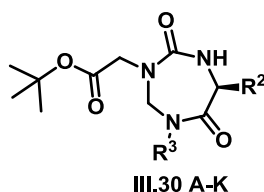


a) NaH (4 éq.), R<sup>5</sup>-X (4 éq.), THF, 25-60°C, 24h ; b) KF/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 40 % wt (10 éq.), R<sup>5</sup>-X (2 éq.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 40°C, 24h, c) NaH (3 éq.), R<sup>5</sup>-X (3 éq.), THF, TA, 24h

**schéma III.16** : *N,N*-dialkylation et *N*-monoalkylation des 1,3,5-triazépane-2,6-diones

La *N,N*-dialkylation de l'urée est réalisée en présence de quatre équivalents d'hydrure de sodium et de quatre équivalents de dérivé halogéné dans le THF tandis que la *N*-monoalkylation requiert dix équivalents de KF/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et deux équivalents de dérivé halogéné. Le KF/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> induit la *N*-monoalkylation sélective de l'azote *gem*-diamino de l'urée, la formation du composé *N,N*-dialkylé est minoritaire (< 1%).

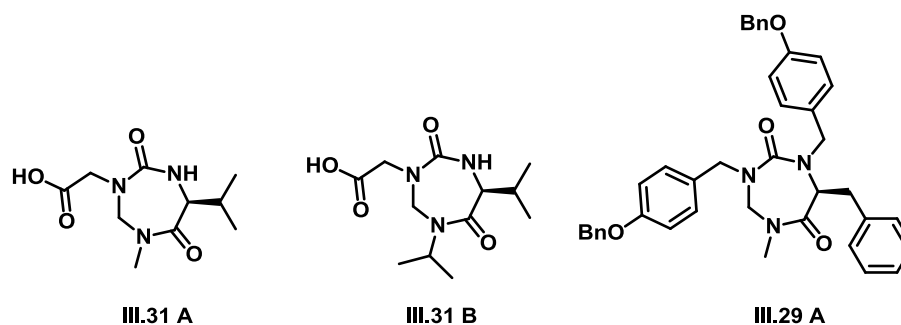
La méthode de *N*-monoalkylation au KF/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a été utilisée sur plusieurs cycles issus de la chimiothèque précédente pour accéder à onze nouvelles 1,3,5-triazépane-2,6-diones fonctionnalisées par un groupement acétate de tertio-butyle (**tableau III.9**).



Composé	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Rdt %	Composé	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Rdt %
III.30 A	<i>i</i> Bu	Me	50	III.30 G	<i>n</i> Bu	Me	64
III.30 B	Phe	Me	64	III.30 H	Phe	<i>i</i> Pr	50
III.30 C	<i>t</i> Bu	Me	53	III.30 I	<i>i</i> Bu	<i>i</i> Pr	95
III.30 D	<i>i</i> Pr	<i>i</i> Pr	40	III.30 J	<i>i</i> Bu	cyclohexyl	70
III.30 E	<i>i</i> Bu	-(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> )-	36	III.30 K	<i>i</i> Pr	cyclohexyl	72
III.30 F	<i>i</i> Pr	Me	92				

**Tableau III.9** : composés de la chimiothèque de 1,3,5-triazépane-2,6-diones fonctionnalisés par un groupement acétate de tertio-butyle

A cette petite chimiothèque de 1,3,5-triazépane-2,6-diones fonctionnalisées, trois composés sont ajoutés : deux sont obtenus de manière quantitative par traitement au TFA de cycles de la chimiothèque précédente (III.31 A et III.31 B) et le dernier (III.29 A) a été obtenu par *N,N*-dialkylation de *cyclo*(Phe-*g*Sar-CO) (A1,B1) par le 1-(benzyloxy)-4-(chlorométhyl)benzène en présence de NaH avec un rendement de 50 % (figure III.14).



**Figure III.14** : composés additionnels de la chimiothèque de 1,3,5-triazépane-2,6-diones fonctionnalisés par alkylation

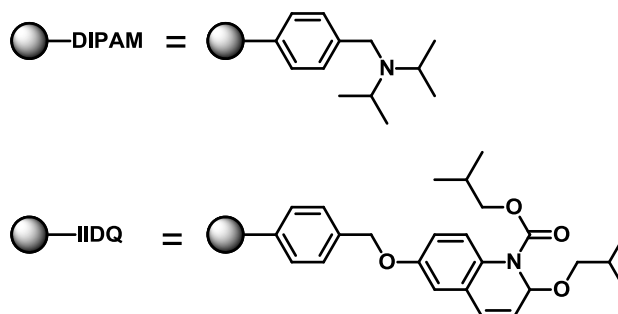
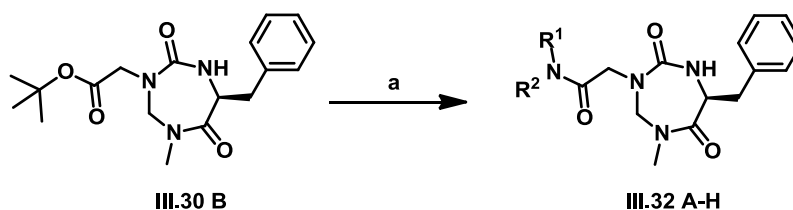
### III.2. Mise au point d'une synthèse parallèle de dérivés 1,3,5-triazépane-2,6-dione fonctionnalisés par une fonction amide

La fonction amide est une fonction très importante en chimie médicinale. Le groupe carboxamide apparaît dans plus de 25 % des molécules thérapeutiques, ce qui s'explique par sa grande stabilité, son caractère neutre et ses propriétés donneur/accepteur de liaisons hydrogènes.<sup>175</sup>

Le composé III.30 B (tableau III.7) a été utilisé comme produit de départ pour la création d'une nouvelle chimiothèque de 1,3,5-triazépane-2,6-dione fonctionnalisées par une fonction amide.

Au cours de ces travaux de thèse, M<sup>r</sup> Boeglin a décrit la synthèse de dérivés amide à partir d'hétérocycles présentant une fonction acide en utilisant des réactifs supportés : la résine PS-IIDQ comme réactif de couplage<sup>176</sup> et la PS-DIPAM comme base supportée (schéma III.17). Le principal avantage des réactifs supportés est leur élimination très facile par simple filtration.





a) (i) TFA, 0°C, 30 min, (ii) PS-DIPAM (1,5 éq.), PS-IIDQ (2 éq.), R<sup>1</sup>R<sup>2</sup>NH (1,2 éq.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>CN (2:1,v:v), TA, 3 jours.

**Schéma III.17** : méthode générale de synthèse d'une chimiothèque d'hétérocycles fonctionnalisés par différentes fonctions amide

Après l'élimination du groupement *tert*-butyle par le TFA, l'acide correspondant est mis en solution dans un mélange dichlorométhane/acétonitrile puis les réactifs supportés sont ajoutés ainsi que l'amine. Une fois, le produit de départ entièrement consommé, les réactifs supportés sont éliminés par filtration et les composés **III.32** sont purifiés par chromatographie sur gel de silice. Six amines ont été utilisées pour la création d'une petite chimiothèque (**tableau III.10**).

	R <sup>1</sup> R <sup>2</sup> NH	Rdt
<b>III.32 A</b>	naphtylméthylamine	70 %
<b>III.32 B</b>	4-amino-1-benzylpipéridine	70 %
<b>III.32 C</b>	phénéthylamine	76 %
<b>III.32 D</b>	H-L-Asp(OBn)-OBn	69 %
<b>III.32 E</b>	H-D-Asp(OBn)-OBn	71 %
<b>III.32 F</b>	H-L-Phe-OBn	76 %

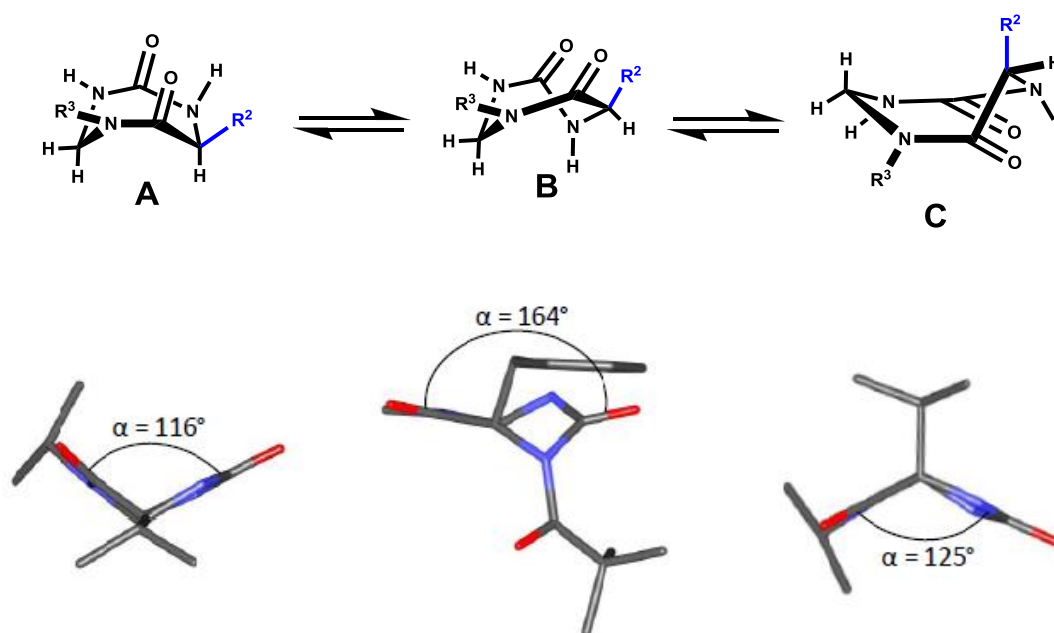
**Tableau III.10** : 1,2,3-triazépane-2,6-diones fonctionnalisées par une fonction amide

Les bons rendements de cette synthèse ainsi que sa facilité de mise en place mériteraient une utilisation plus poussée de cette dernière. En effet, de nombreuses amines commerciales sont susceptibles d'être couplées y compris des amines aromatiques pour lesquelles l'IIDQ s'avère très efficace comme agent de couplage. De même, d'autres 1,3,5-triazépane-2,6-diones pourraient également servir de produits de départ pour la création d'une chimiothèque plus vaste.

#### IV. Etudes structurales des composés de la chimiothèque

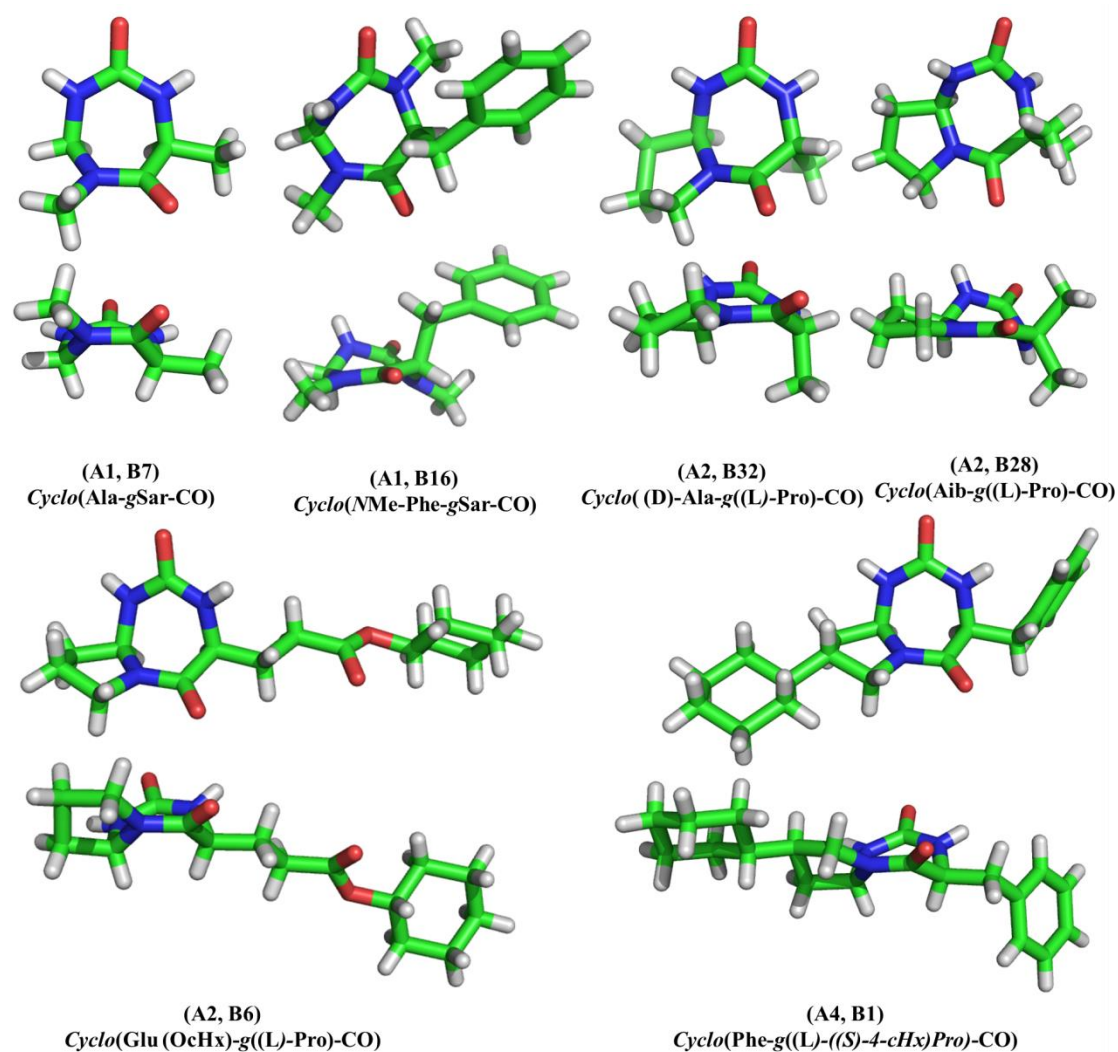
Les travaux précédents réalisés dans le laboratoire ont montré que les cycles de type 1,3,5-triazépane-2,6-dione peuvent essentiellement adopter trois conformations **A**, **B** ou **C** lors de la cristallisation.

La conformation **A** se caractérise par un angle  $\alpha$  entre les plans de l'amide et de l'urée d'environ  $115^\circ$  et un positionnement pseudo-équatorial du groupement  $R^2$  (**figure III.15**, gauche), la conformation **B** se caractérise par un angle  $\alpha$  compris entre  $155^\circ$  et  $166^\circ$  et un positionnement pseudo-axial de  $R^2$  (**figure III.15**, milieu) et enfin, la conformation **C** est caractérisée par  $\alpha = 127^\circ$  et  $R^2$  en position pseudo-axiale (**figure III.15**, droite).

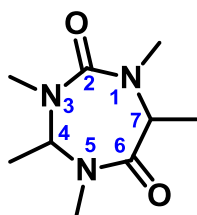


**Figure III.15** : conformations adoptées par le châssis 1,3,5-triazépane-2,6-dione dans des cristaux

Quelques composés issus de la chimiothèque ((A1, B7), (A1, B16), (A2, B32), (A2, B28), (A2, B6) et (A4, B1)) ont été cristallisés et leurs structures ont été obtenues par diffraction des rayons X (figure III.16).



**Figure III.16** : structures cristallographiques de composés issus de la synthèse parallèle sur support solide



	(A1, B7)	(A1, B16)	(A2, B32)	(A2, B28)	(A2, B6)	(A4, B1)
<b>groupe</b>	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P1	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>	C2
<b>T<sub>1</sub></b>	1,91	-45,80	-20,88	-57,53	14,56	4,44
<b>T<sub>2</sub></b>	-2,41	-39,40	-16,45	-25,74	7,54	1,22
<b>T<sub>3</sub></b>	-55,36	81,55	72,54	78,10	39,82	50,70
<b>T<sub>4</sub></b>	68,46	-34,15	-57,58	-36,58	-73,75	-69,64
<b>T<sub>5</sub></b>	2,42	0,13	-11,78	-16,47	16,35	4,05
<b>T<sub>6</sub></b>	-68,68	-27,14	50,13	3,97	63,41	65,59
<b>T<sub>7</sub></b>	55,33	77,20	-13,26	60,52	-73,91	-60,91
<b>α (°)</b>	117,5	144	126	129,5	114,8	119,5
<b>conformation</b>	A	B	C		A	A

T1-7 angles de torsion associés aux séquences C7-N1-C2-N3, N1-C2-N3-C4, C2-N3-C4-N5, N3-C4-N5-C6, C4-N5-C6-C7, N5-C6-C7-N1, C6-C7-N1-C2

**Tableau III.11** : données cristallographiques des cycles obtenus par synthèse en parallèle sur support solide

Les composés **(A1, B7)**, **(A2, B6)** et **(A4, B1)** qui ne possèdent pas de substituants sur leurs atomes d'azote adoptent tous une conformation de type A avec un angle  $\alpha$  compris entre 114,8 et 119,5° et leur substituant R<sup>2</sup> en position pseudoéquatoriale. La structure du composé **(A2, B32)** est la première obtenue pour une triazépanedione issue de séquence hétérochirale. Le cycle qui présente un angle  $\alpha$  de 126° avec un substituant R<sup>2</sup> en position pseudoaxiale adopte plutôt une géométrie de type C. Il est à noter que dans ce cas (triazépanedione dérivée d'une séquence hétérochirale), l'urée semble dévier de la planéité de manière significative (T<sub>1</sub> ≈ -21° et T<sub>2</sub> ≈ -16°) par rapport aux structures présentant une géométrie de type A (séquences homochirales notamment).

Lors de ces travaux de thèse, Mr Boeglin a observé que l'introduction d'un substituant alkyle sur l'azote en position 3 (R<sup>5</sup> ≠ H) ou bien un groupement acyle en position 1 (R<sup>1</sup> ≠ H) entraînait également une distorsion forte de l'urée. Cette observation est également vérifiée dans le cas du composé **(A1, B16)** dont l'azote en position 1 est alkylée (R<sup>1</sup> = Me). Le cycle

correspondant à **(A1, B16)** mais non alkylé (**(A1, B1)**) a également été cristallisé, il est donc possible d'étudier l'influence de l'alkylation de N1 sur la géométrie de l'urée (**tableau III.12**).

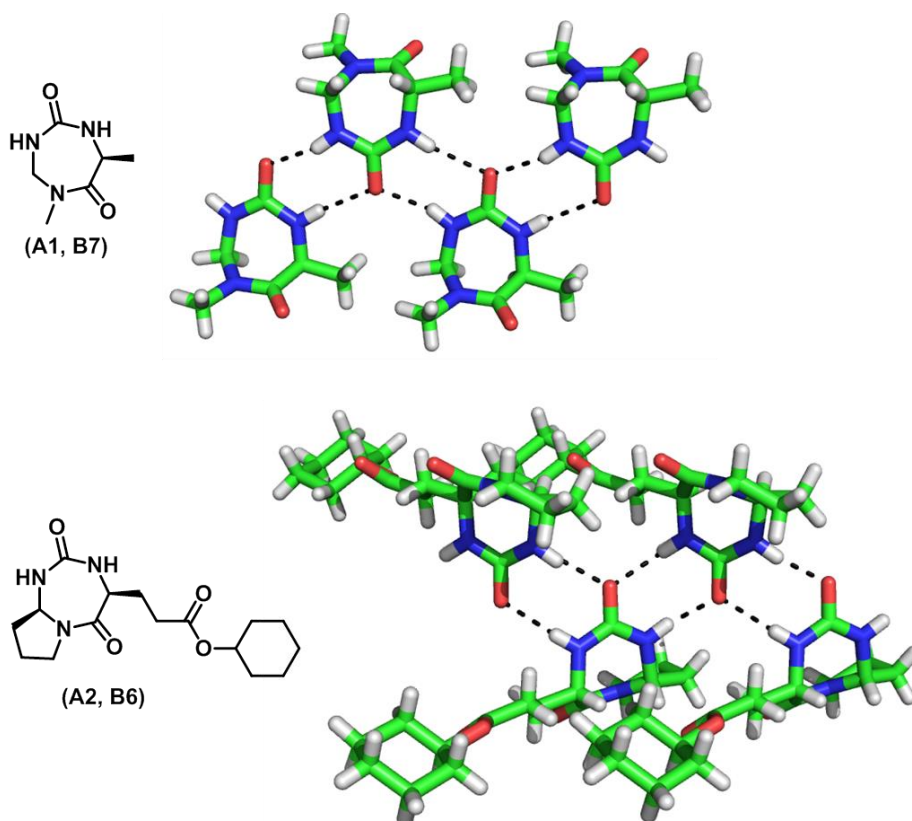
	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>6</sub>	T <sub>7</sub>	α (°)
<b>(A1, B1)</b>	-0,5	-1,9	58,2	-66,5	-4,4	68	-53,3	120,7
<b>(A1, B16)</b>	-45,80	-39,40	81,55	-34,15	0,13	-27,14	77,20	144

**Tableau III.12** : influence de la monoalkylation de N1 sur la conformation du cycle

Dans le cas de **(A1, B1)**, l'urée est plane (T<sub>1</sub> et T<sub>2</sub> proche de 0°) alors que dans le cas de **(A1, B16)** on observe une distorsion importante de celle-ci (T<sub>1</sub> = -45,80° et T<sub>2</sub> = -39,40°). De plus, l'angle formé entre les plans de l'urée et de l'amide est plus prononcé suite à la monoalkylation de N1 (120,7° pour **(A1, B1)** et 144° pour **(A1, B16)**).

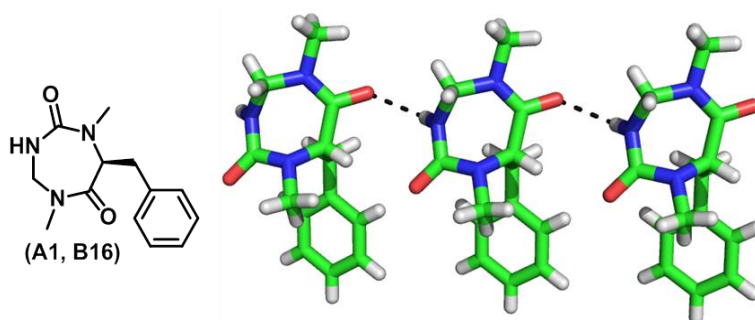
Le dernier composé à avoir été cristallisé est le *cyclo*(Aib-gPro-CO) **(A2, B28)**. Ce composé présente une importante distorsion de l'urée (T<sub>1</sub> = -57,53° et T<sub>2</sub> = -25,74°) qui est proche de celle observée dans la conformation B mais l'angle α (129,5°) est plus proche de celui remarqué dans la conformation C. La conformation de ce composé **(A2, B28)** correspond à une géométrie jamais observée auparavant et qui résulte de la forte contrainte stérique imposée par la présence des deux méthyles sur le carbone C7. Il semblerait que la di-substitution du carbone C7 entraîne la formation d'une nouvelle conformation, néanmoins, un seul composé di-substitué a pu être obtenu donc il est difficile de conclure dans ces conditions.

A l'état cristallin, les 1,3,5-triazépane-2,6-diones présentent des propriétés d'auto-assemblage intéressantes dues aux multiples possibilités de liaisons hydrogène intermoléculaires. Les modes de liaisons hydrogène intermoléculaires varient en fonction du degré de substitution des azotes de l'urée mais également de la conformation du cycle. On peut observer la formation de chaînes moléculaire, de rubans moléculaires ou bien encore de surfaces dans le cas de réseaux bidimensionnels. Dans le cas des cycles non alkylés de conformation A **(A1, B7)** ou bien **(A2, B6)**, chaque molécule est liée à deux voisines par les liaisons hydrogène entre les urées pour former des rubans moléculaires avec la formation de pseudo-cycles à huit chaînons entre deux 1,3,5-triazépane-2,6-diones (**figure III.17**).



**Figure III.17:** organisation générale des 1,3,5-triazépane-2,6-diones en ruban moléculaire structuré par des liaisons hydrogène

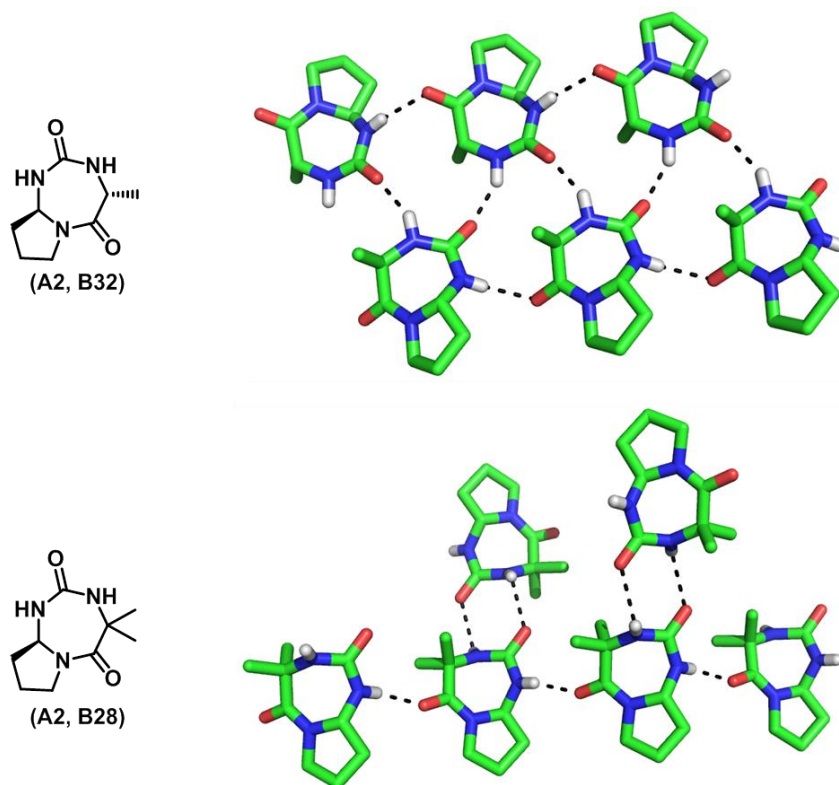
Lorsque l'urée est mono-alkylée, la liaison hydrogène se forme entre le NH libre et le C=O de la fonction amide comme dans le cas du composé **(A1, B16)** pour donner une chaîne moléculaire (**figure III.18**).



**Figure III.18 :** organisation des 1,3,5-triazépane-2,6-diones N-mono-alkylée

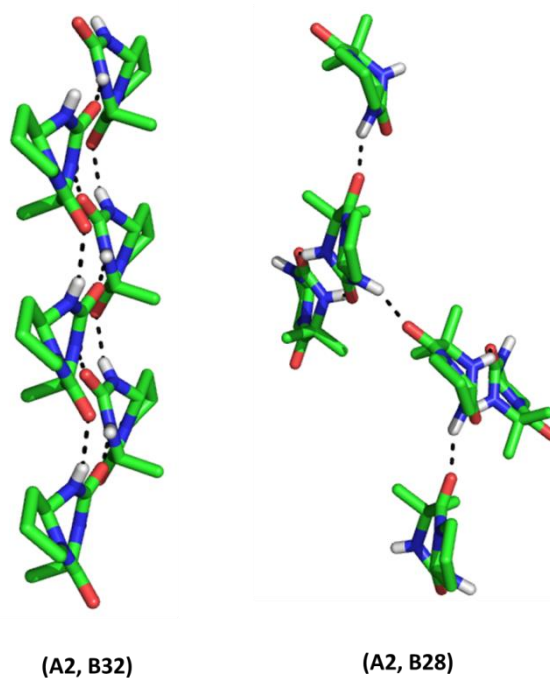
L'assemblage en ruban moléculaire observé pour **(A1, B7)** ou bien **(A2, B6)** est perturbé dans le cas des molécules non alkylées qui n'adoptent pas la géométrie canonique de type A (séquence hétérochirale, ou contenant un résidu Aib). Dans le cas du composé **(A2, B32)**,

chaque molécule est liée à quatre autres par liaison hydrogène pour former un double ruban moléculaire. Un des NH de l'urée est engagé dans une liaison hydrogène avec le C=O d'une urée tandis que le deuxième NH est lié par liaison hydrogène au C=O de la fonction amide d'une seconde molécule. Il en est de même pour le cycle **(A2, B28)** (figure III.19).



**Figure III.19** : rubans moléculaires formés par **(A2, B32)** (haut) et par **(A2, B28)** (bas)

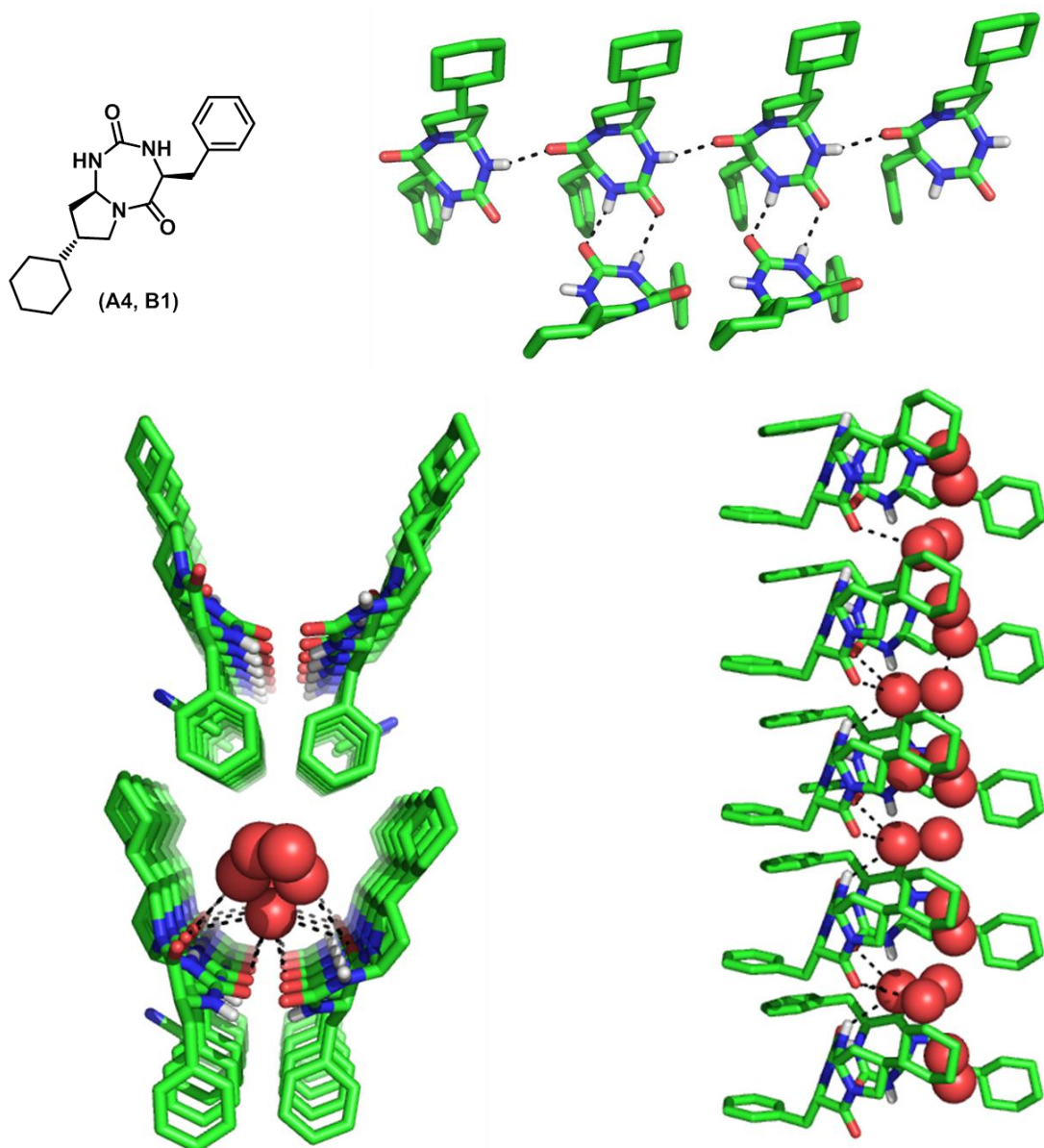
Le double ruban formé par les cycles **(A2, B32)** est presque plan contrairement à celui formé par les cycles **(A2, B28)**. Ceci est dû à la forte déformation de l'urée imposée par les deux groupements méthyles (figure III.20).



**Figure III.20 :** influence de la déformation de l'urée sur la géométrie du ruban moléculaire

Le composé **(A4, B1)** possède la même conformation que **(A1, B7)** et **(A2, B6)** mais diffère dans son arrangement. A la différence de ces derniers, seul un des deux NH urée est impliqué dans la formation de pseudo-cycles à huit chaînons formés par liaisons hydrogène entre les urées. Le NH urée du résidu *gem*-diamine n'est pas impliqué dans la formation d'un pseudo-cycle à huit chaînons mais est lié au C=O de l'amide (**figure III.21** haut). Cet assemblage permet la formation d'un canal d'environ 8 Å de diamètre dans lesquels se trouvent des molécules d'eau bien définies (solvant de cristallisation = acétonitrile) (**figure III.21**, bas).





**Figure III.21** : assemblage moléculaire du composé (A4, B1)

## V. Conclusion

L'un des objectifs de ma thèse était la mise en place d'une méthode de synthèse en parallèle sur support solide permettant la création de chimiothèques de 1,3,5-triazépane-2,6-diones. L'étape clé de cette synthèse est le *réarrangement d'Hofmann* pour la formation de l'isocyanate qui est ensuite piégé par une résine *N*-hydrosuccinimide afin de générer un carbamate activé supporté. Néanmoins, le *réarrangement d'Hofmann* nécessite l'utilisation

de réactifs oxydants puissants (PIFA par exemple) qui entraîne des limitations dans le choix des acides aminés de départ. En parallèle à l'utilisation d'acides aminés commerciaux, une voie d'obtention des dipeptides amides faisant référence à la synthèse des peptoides (voie B, approche « submonomère ») a été utilisée. Cette méthodologie a été utilisée avec succès pour construire une chimiothèque de 109 hétérocycles dont 87 ont des puretés HPLC sont supérieures à 80 % ce qui représente 80 % de la chimiothèque.

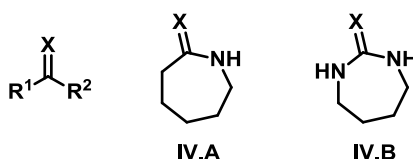
Pour finir, l'obtention de structures cristallographiques pour les dérivés *cyclo*(D-Ala-gPro-CO)) (séquence hétérochirale) et *cyclo*(Aib-gPro-CO) ((**A2**, **B28**), **figure III.18**) a révélé des conformations non canoniques du squelette 1,3,5-triazépane-2,6-dione présentant une forte déformation de la géométrie de l'urée jamais observée auparavant.<sup>177</sup>

**Chapitre IV : Analogues de 1,3,5-triazépane-2,6-dione**  
**présentant une fonction thiocarbonyle**

## I. Généralités à propos des thiocarbonyles

Dans le cadre d'une augmentation de la diversité moléculaire autour du squelette 1,3,5-triazépane-2,6-dione, nous avons décidé de remplacer les deux fonctions carbonyles de ce dernier par des fonctions thiocarbonyles.

Dans la classification périodique, l'atome de soufre est proche de l'atome d'oxygène mais les propriétés chimiques et physico-chimiques des thiocarbonyles sont différentes de celles des carbonyles (**tableau IV.1**).



	X = O	X = S
longueur de la liaison C=X	1,25 Å	1,64 Å
énergie de la liaison C=X	~ 180 kcal/mol	~ 140 kcal/mol
électronégativité de X	3,44	2,58
rayon covalent de X	0,73 Å	1,02 Å
pKa <sup>178</sup> R <sup>2</sup> = NHPH (DMSO à 25°C)	21,5	14,7
moment dipolaire pour IV.A <sup>179</sup>	3,88 D <sup>a</sup>	4,83 D <sup>b</sup>
pKa <sup>178</sup> R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = NHR (DMSO à 25°C)	26,9	21,1
moment dipolaire pour IV.B <sup>179</sup>	4,43 D <sup>b</sup>	5,36 D <sup>b</sup>
Longueur de liaison hydrogène (N-X, Å)	2.90	3.41
Longueur de liaison hydrogène (H-X, Å)	1.90	2.63
Angle (C,X,H) en ° (valeurs pour un angle diedre N,C,X,H, compris entre 60 et 120°)	134	107

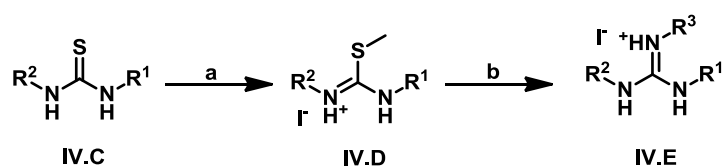
a) mesuré dans le benzène à 25 °C, b) mesuré dans le dioxane à 25°C

**Tableau IV.1** : exemples de propriétés chimiques et physico-chimiques différentes des carbonyles et des thiocarbonyles

La liaison C=S est plus longue que la liaison C=O mais elle est également plus faible (tableau IV.1). Néanmoins, la principale différence entre les carbonyles et les thiocarbonyles qui joue un rôle important en termes d'activité biologique est leur capacité à former des liaisons hydrogène. L'atome de soufre ayant une électronégativité inférieure à l'oxygène (**tableau**

**IV.1)**, il est un accepteur de liaison hydrogène plus faible et en même temps, les NH des thioamides ou thiourées sont plus acides que ceux des amides<sup>180</sup> et des urées correspondantes (**tableau IV.1**), ce sont donc de meilleurs donneurs d'hydrogène. De plus la géométrie des liaisons hydrogène diffère (longueur et angles des liaisons H) selon que l'accepteur est un carbonyle ou un thiocarbonyle (**tableau IV.1**).<sup>181</sup> En effet, lorsque la liaison hydrogène n'est pas formée dans le plan des doublets non liants de l'oxygène ou du soufre (c'est-à-dire quand l'angle dièdre (N,C,X,H) est davantage compris entre 60° et 120°), l'angle (C,S,H) adopte systématiquement des valeurs plus faibles que l'angle (C,O,H) résultant d'une interaction de l'hydrogène avec les électrons  $\pi$  de la liaison C=S.<sup>181</sup> Une autre différence significative est que les urées linéaires adoptent préférentiellement des conformations *trans-trans* (à l'exception des urées tétrasubstituées possédant des groupements aromatiques)<sup>182</sup> alors que les thiourées disubstituées existent souvent souvent sous formes *trans-trans* et *cis-trans* (aussi appelées conformations *syn* et *anti*) en mélange.<sup>181a</sup>

La présence du soufre permet également d'envisager des réactions d'alkylation conduisant par exemple à la synthèse de guanidines (**schéma IV.1**).

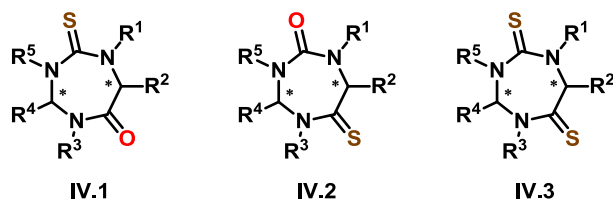


a)  $\text{CH}_3\text{I}$  (10 éq.), 40°C,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 8h, b)  $\text{R}^3\text{NH}_2$  (16 éq.), 50°C,  $\text{CHCl}_3$ , 20h

**Schéma IV.1** : synthèse de sel de guanidine à partir d'une thiourée<sup>183</sup>

Les dérivés guanidines forment une classe de composés très représentée parmi les molécules biologiquement actives d'origine naturelle.<sup>184</sup> Ils sont impliqués dans de nombreux processus chimiques (comme piège d'anions,<sup>185</sup> base organique<sup>186</sup> ou encore comme catalyseur<sup>187</sup>) et possèdent des activités biologiques diverses telles qu'une activité anticancéreuse,<sup>188</sup> antifongique,<sup>189</sup> antibiotique<sup>190</sup> ou bien antiviral.<sup>191</sup> Devant la diversité des applications biologiques des dérivés guanidines et la simplicité d'obtention de ces derniers à partir des thiourées, la synthèse d'un hétérocycle portant une thiourée en remplacement de l'urée est intéressante.

Trois types de composés hétérocycliques comportant des fonctions thiocarbonyles sont donc envisagés : un composé possédant une fonction amide et une fonction thiourée (composé **IV.1**, **figure IV.1**), un composé possédant une fonction thioamide et une fonction urée (composé **IV.2**, **figure IV.1**), et enfin un composé possédant les fonctions thioamide et thiourée (composé **IV.3**, **figure IV.1**).



**Figure IV.1** : hétérocycles comprenant des fonctions thiocarbonyles

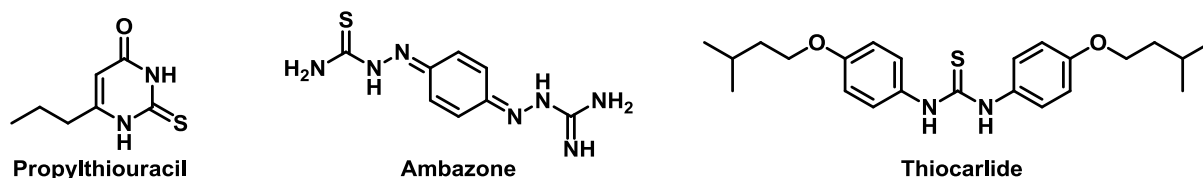
Nous avons mis en place deux méthodologies de synthèse permettant l'obtention de thiocarbonyles :

- formation d'une thiourée au cours de l'étape de cyclisation
- utilisation du réactif de Lawesson sur un hétérocycle.

## II. Synthèse du chassis 2-thioxo-1,3,5-triazépan-6-one : formation de la thiourée par cyclisation

Les thiourées ont une grande importance en chimie médicinale<sup>192</sup> notamment en raison des liaisons hydrogène de plus forte intensité formés par les NHs thiourées par rapport que aux NHs des urées correspondantes.<sup>180c</sup>

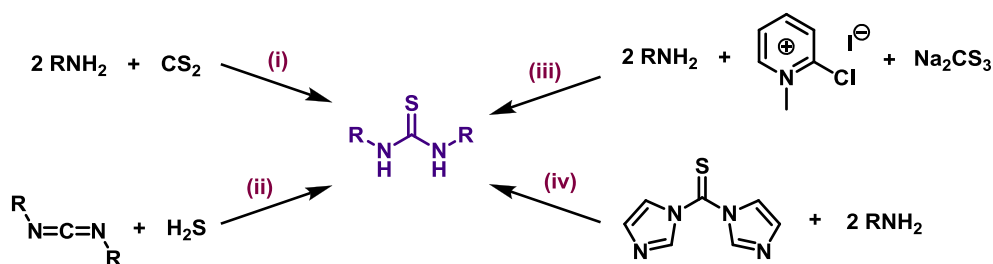
Les thiourées sont présentes dans un grand nombre de composés biologiquement actifs<sup>193</sup> tels que des antibactériens,<sup>194</sup> des antifongiques, des herbicides.<sup>195</sup> On retrouve le motif -NH(C=S)NH- dans plusieurs classes de médicaments, comme par exemple des antithyroïdiens (propylthiouracile, **figure IV.2** à gauche), des antiseptiques (ambazone, **figure IV.2**, au milieu), ou des antibactériens (le thiocarlide est utilisé dans le traitement de la tuberculose, **figure IV.2**, à droite).



**Figure IV.2** : exemples de médicaments mis sur le marché incorporant un motif -NH(C=S)NH-

## II.1. Synthèse des thiourées dissymétriques

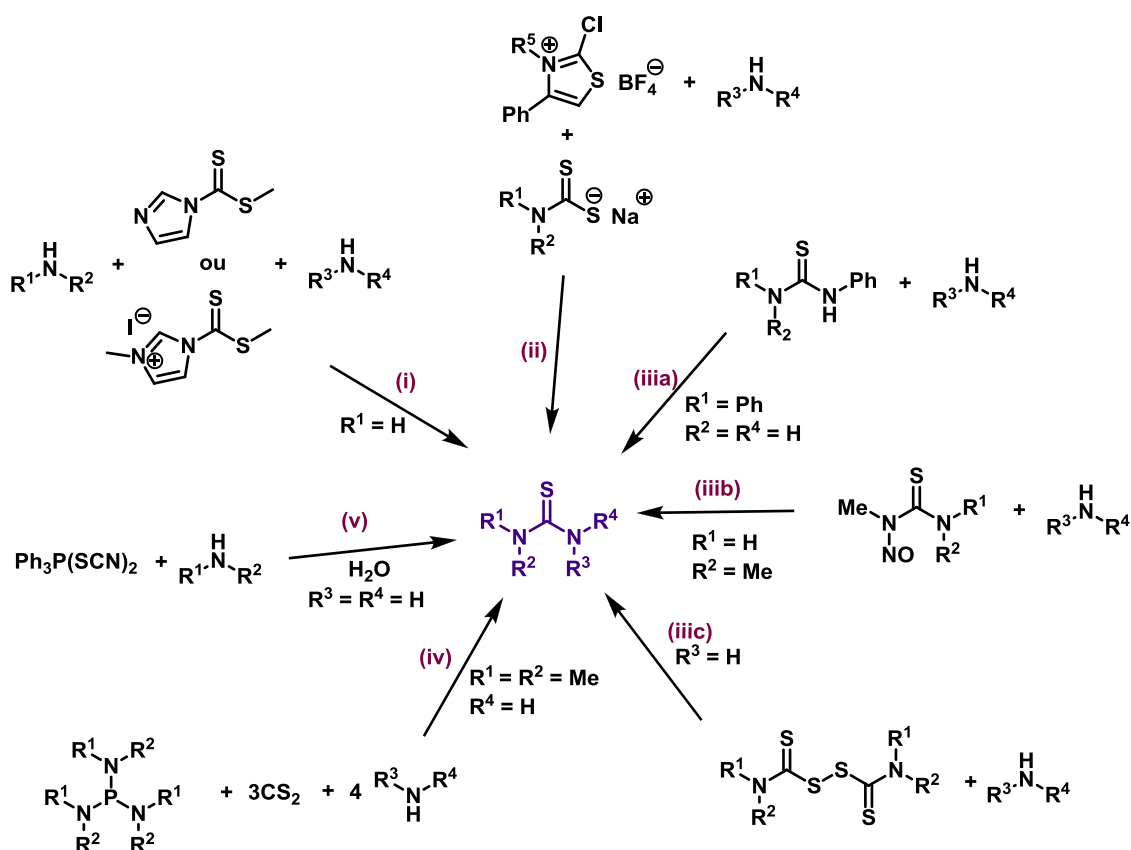
La méthode la plus simple pour accéder aux thiourées est la réaction de deux équivalents d'amines avec un équivalent de thiophosgène,<sup>196</sup> néanmoins, la grande toxicité du thiosphogène a conduit à la mise en place de synthèses différentes n'ayant pas recourt à ce composé (**schéma IV.2**).



**Schéma IV.2** : synthèse de thiourées symétriques

La fonction thiourée peut donc être obtenue par (i) une condensation directe<sup>197</sup> ou catalysée<sup>198</sup> de deux amines sur le disulfure de carbone, (ii) une réaction entre un carbodiimide et le sulfure d'hydrogène,<sup>199</sup> (iii) la réaction entre le sel de 2-chloropyridinium avec le trithiocarbonate de sodium puis par condensation sur deux équivalents d'amines,<sup>200</sup> et (iv) la réaction de deux équivalents d'amines sur le 1,1'-thiocarbonyldiimidazole.<sup>201</sup>

Les méthodes d'obtention des thiourées non-symétriques sont légèrement différentes (**schéma IV.3**).



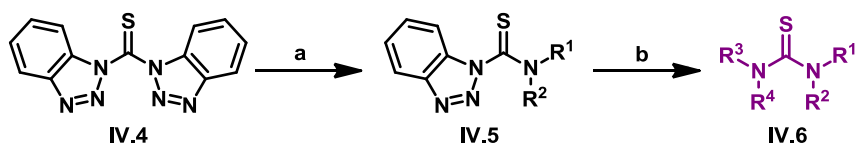
**Schéma IV.3** : différentes méthodes d'obtention d'une thiourée dissymétrique

Pour la synthèse de thiourée non-symétrique, il est possible d'avoir recourt (i) à l'utilisation de 1-(méthylthiocarbonyl) imidazole comme agent de transfert de thiocarbonyle,<sup>191b</sup> (ii) à l'activation du dithiocarbamate grâce à un sel de 2-halothiazolium puis au couplage sur une amine.<sup>202</sup> Il est également possible de synthétiser une thiourée par attaque nucléophile d'une thiourée déjà existante par une amine, par exemple (iiiia) la 1,3-diphénylthiourée<sup>203</sup> ou (iiiib) la nitrosothiourée<sup>204</sup> ou encore (iiic) le disulfure de thirame.<sup>205</sup> De même, la réaction du disulfure de carbone sur une amine en présence de triaryl phosphite ou de hexaméthylphosphoramidate<sup>206</sup> (iv) conduit à la formation d'une thiourée non-symétrique tout comme la réaction d'une amine secondaire sur le thiocyanogène de triphénylphosphine<sup>207</sup> (v).

Toutes ces techniques sont très intéressantes néanmoins, l'utilisation d'un composé équivalent au thiophosgène, stable, rapidement disponible, et facile d'utilisation présenterait de sérieux avantages. Au début des années 2000, Katritzky et ses



collaborateurs ont publié une synthèse de thiourée non-symétrique faisant intervenir le bis(benzotriazolyl)méthanethione **IV.4** (schéma IV.4) comme agent de thiocarbonylation.<sup>208</sup>

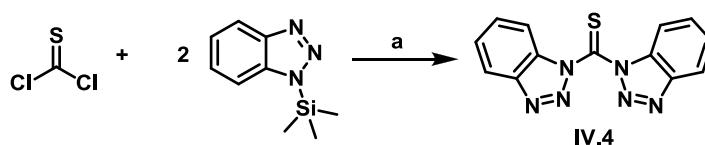


a)  $R^1R^2NH$  (1 éq.),  $CH_2Cl_2$ , TA, 18h (rdt = 91 à 99 %); b) TEA (2 éq.),  $R^3R^4NH$  (1 éq.),  $CH_2Cl_2$ , TA, 24h (rdt = 57 à 99 %)

**Schéma IV.4** : synthèse de thiourée non-symétrique grâce au bis(benzotriazolyl)méthanethione<sup>208</sup>

Le bis(benzotriazolyl)méthanethione **IV.4** est dissout dans le dichlorométhane puis l'amine est ajoutée, le milieu réactionnel est ensuite agité à température ambiante pendant 18h. Après une étape de lavage aqueux et une purification par recristallisation, le composé **IV.5** est engagé dans la seconde étape de la réaction qui est similaire à la première. Le thiocarbamoylbenzotriazole **IV.5** est mis en solution dans le dichlorométhane puis la seconde amine est ajoutée ainsi que de la triéthylamine. Après 24h à température ambiante, la thiourée **IV.6** est obtenue après purification par colonne chromatographique sur gel de silice. Les auteurs ont également mis au point une version "one-pot" de cette synthèse qui consiste simplement à supprimer l'étape de lavage.

Le composé **IV.4** est commercial mais il est également facilement obtenu en une étape à partir du thiophosgène (schéma IV.5).<sup>209</sup>

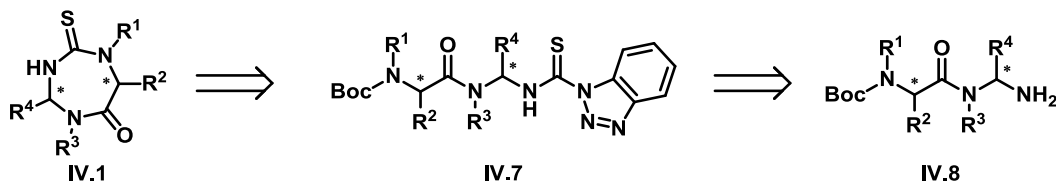


a)  $CCl_4$ , 0°C puis TA, 15h, rdt = 90 %

**Schéma IV.5** : synthèse du Bis(benzotriazolyl)méthanethione<sup>209</sup>

A 0°C, le 1-(Triméthylsilyl)-1H-benzotriazole est dissout dans le tétrachlorure de carbone puis le thiophosgène est ajouté au goutte-à-goutte. Une fois l'ajout terminé, le milieu réactionnel est autorisé à revenir à température ambiante. Après 15h d'agitation, le composé **IV.4** est obtenu par simple filtration.

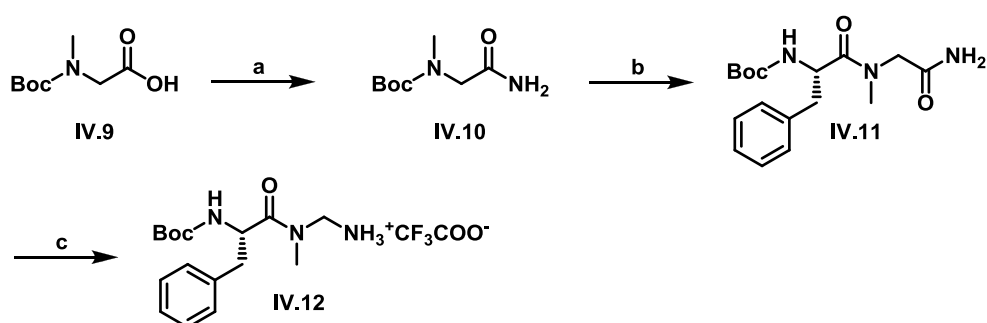
La méthode décrite au **schéma IV.4** nous a semblé être la plus facile à mettre en œuvre pour former une thiourée par cyclisation intramoléculaire et donc pour la synthèse du châssis 2-thioxo-1,3,5-triazépan-6-one (**schéma IV.6**).



**Schéma IV.6** : rétrosynthèse de 2-thioxo-1,3,5-triazépan-6-one

## II.2. Synthèse de *cyclo*(Phe-gSar-CS)

La synthèse des thiourées faisant intervenir des amines primaires ou secondaires, il est nécessaire dans un premier temps de former un dipeptide amine. Mais la stabilité de la *gem*-diamine **IV.8** pose problème, en effet, cette dernière se dégrade rapidement par hydrolyse au cours du temps. Un moyen possible de stabiliser l'amine est la formation d'un sel.<sup>210</sup> Au chapitre III, nous avons eu recours au *réarrangement de Hofmann* en présence de PIFA pour la synthèse d'un isocyanate. L'hydrolyse *in-situ* de cet isocyanate conduit à la formation d'une amine qui est directement piégée par le TFA libéré lors de la dégradation du PIFA (**schéma IV.7**).



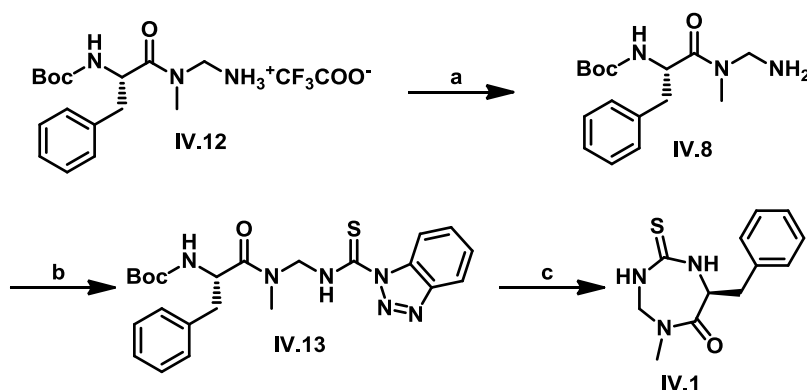
a) (i) *i*BuOCOC<sub>l</sub> (1,2 éq.), NMM (1,2 éq.), THF, -15°C, 30 min, (ii) NH<sub>3g</sub>, TA, 3h; b) (i) TFA, 0°C, 30 min, (ii), BOP (1,05 éq.), DIEA (3 éq.), Boc-Phe-OH (1 éq.), DMF, TA, 4h; c) PIFA (1,2 éq.), CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (1 : 1), TA, 2h30

**Schéma IV.7** : synthèse de dipeptide amide

Après avoir activé l'acide de la sarcosine **IV.9** sous forme d'anhydride mixte par du chloroformiate d'isobutyle en présence de NMM, l'utilisation d'ammoniac gazeux permet la formation de l'amide. Après clivage du groupement protecteur Boc de la sarcosine amide **IV.10** par le TFA, le couplage entre la sarcosine amide et la phénylalanine *N*-Boc protégée a lieu en présence de hexafluorophosphate de Benzotriazol-1-yloxy-tris(diméthylamino)-phosphonium (BOP) et de DIEA dans du DMF à température ambiante. Le dipeptide amide **IV.11** est obtenu avec un rendement de 81 %.

L'amide est ensuite engagé dans le *réarrangement d'Hofmann* grâce au PIFA dans un mélange acétonitrile/eau. L'acétonitrile est éliminée par évaporation puis le mélange réactionnel est lyophilisé. Le solide brut obtenu est ensuite lavé par de l'éther froid afin d'éliminer les sous-produits dérivés de PIFA. Le sel amine/TFA **IV.12** est obtenu avec un rendement brut de 67 %.

La deuxième partie de la synthèse consiste en l'activation de l'amine **IV.8** par le composé **IV.4** puis en la cyclisation (**schéma IV.8**).



a)  $\text{NaHCO}_{3\text{sat}}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , TA, 5 min; b) Bis(benzotriazolyl)méthanethione **IV.4** (1,1 éq.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 0°C puis TA, 15h; c) (i) TFA, 0°C, 30 min, (ii) DIEA (2 éq.),  $\text{CH}_3\text{CN}$ , TA, 3h.

#### **Schéma IV.8** : synthèse de *cyclo*(Phe-*gSar*-CS)

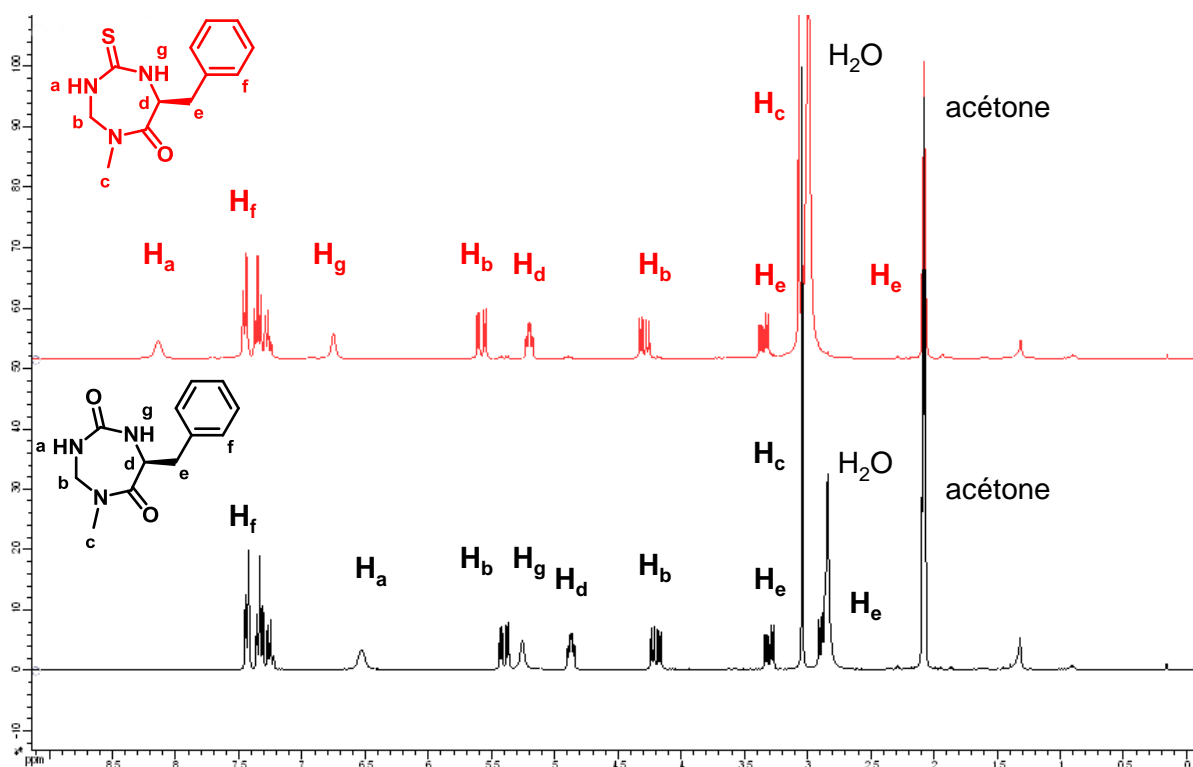
Il semble nécessaire que l'amine soit libre avant de réaliser le couplage sur le Bis(benzotriazolyl)méthanethione **IV.4.**, des expériences de neutralisation *in-situ* n'ont pas conduit au produit attendu. Le sel **IV.12** est donc dissout dans du dichlorométhane puis lavé avec une solution saturée de bicarbonate de sodium. Une fois l'amine **IV.8** libre, cette dernière est directement engagée dans le couplage pour donner le composé **IV.13**. Contrairement au carbamate de succinimide formé lors de la synthèse du *cyclo*(Phe-*gSar*-

CO), le composé **IV.13** est suffisamment stable pour être purifié par chromatographie sur gel de silice. Cette purification est difficile à cause des nombreux produits visibles sur la CCM du brut réactionnel (révéléateur : UV et 1% de ninhydrine dans EtOH). Ces produits peuvent être des sous-produits du composé **IV.4** mais également des produits issus de la synthèse du sel de TFA **IV.12**. A l'issue de la purification, le composé **IV.13** est obtenu en présence de dérivés benzotriazoles, le rendement de la synthèse du composé **IV.13** est de 16 % à partir du dipeptide amide **IV.11** (3 étapes). Les deux dernières étapes sont la déprotection du groupement Boc par le TFA puis la cyclisation en milieu basique dilué. Le cycle 2-thioxo-1,3,5-triazépane-6-one **IV.1** a été obtenu avec un rendement de 39 % à partir du composé **IV.13**. Ce rendement est faible comparé au rendement de cyclisation de *cyclo(Phe-gSar-CO)* (~ 70 %), il peut être expliqué en parti par la surestimation du rendement de **IV.13** mais également par le manque de stabilité du composé **IV.13** lors du traitement au TFA (des taches supplémentaires sont apparues sur la CCM lors du suivi de la réaction).

## II.3. Comparaison de *cyclo(Phe-gSar-CS)* et de *cyclo(Phe-gSar-CO)*

### II.3.a. comparaison par spectrométrie RMN

La présence de la thiourée est confirmée par spectrométrie RMN du proton (**figure IV.3**).



**Figure IV.3** : spectres RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, acétone  $\text{d}_6$ , 298 K) de *cyclo*(Phe-*gSar*-CS) **IV.1** (en rouge) et de *cyclo*(Phe-*gSar*-CO) (en noir) à une concentration de  $2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$

La principale différence sur les spectres RMN  $^1\text{H}$  réside dans le déplacement chimique des protons mobiles des azotes de l'urée et la thiourée. Dans le cas du *cyclo*(Phe-*gSar*-CS) **IV.1**, le proton le plus acide est à 8,14 ppm alors qu'il est à 6,52 ppm pour le cycle *cyclo*(Phe-*gSar*-CO), de même le deuxième proton est à 6,75 ppm pour la thiourée contre 5,25 ppm pour l'urée.

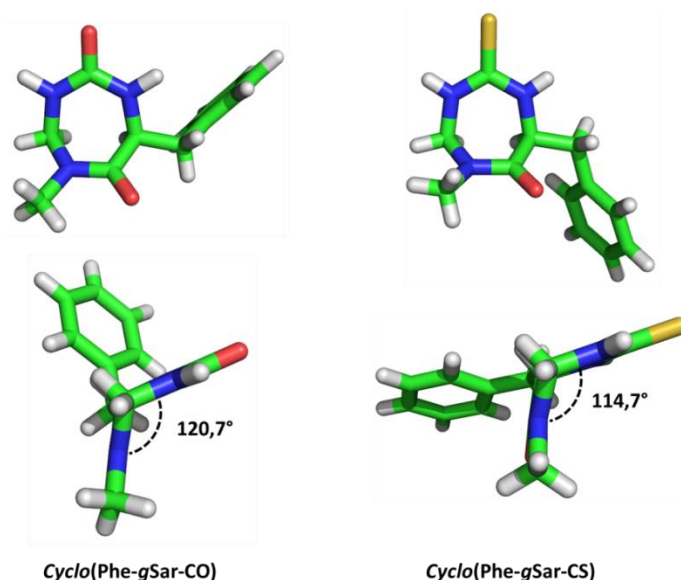
De même concernant le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (300 MHz), le déplacement chimique du carbone de la thiourée est de 181,2 ppm alors qu'il est de 156,3 ppm pour l'urée.

### II.3.b. comparaison des structures cristallographiques

Des cristaux ont été obtenus pour le *cyclo*(Phe-*gSar*-CS) **IV.1** et pour *cyclo*(Phe-*gSar*-CO). Le composé *cyclo*(Phe-*gSar*-CS) cristallise dans le groupe d'espace  $\text{P}2_12_12_1$  alors que *cyclo*(Phe-*gSar*-CO) cristallise dans le groupe  $\text{P}6_1$ .

Comme cela a déjà été discuté (chapitre III, section IV), il existe trois types de conformations du cycle *cyclo*(Xaa-*gXbb*-CO) notées A, B et C qui sont caractérisées par la valeur de l'angle  $\alpha$

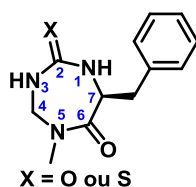
entre les plans moyens de l'amide et de l'urée et par le positionnement pseudo-axial ou pseudo-équatorial de la chaîne latérale R<sup>2</sup>. Nous savons que le **cyclo(Phe-gSar-CO)** adopte la conformation A ( $\alpha = 120^\circ$  et R<sup>2</sup> en position pseudo-équatoriale), l'angle  $\alpha$  du composé **IV.1** vaut  $114^\circ$  et le groupement benzyl est en position pseudo-équatoriale donc ce composé est également de conformation A.



**Figure IV.4** : structures cristallographiques de **cyclo(Phe-gSar-CO)** et de **cyclo(Phe-gSar-CS)**

Les liaisons des hétérocycles sont de mêmes tailles pour **cyclo(Phe-gSar-CO)** et pour **cyclo(Phe-gSar-CS)** (sauf les liaisons C=O (1.26 Å) et C=S (1.70 Å)). En revanche, il existe une petite différence entre les liaisons N-H de la thiourée (0,86 Å) et de l'urée (1,02 Å).

Les mesures des angles de torsions sont très similaires pour les deux composés à l'exception des angles T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> et T<sub>7</sub> (**tableau IV.2**).



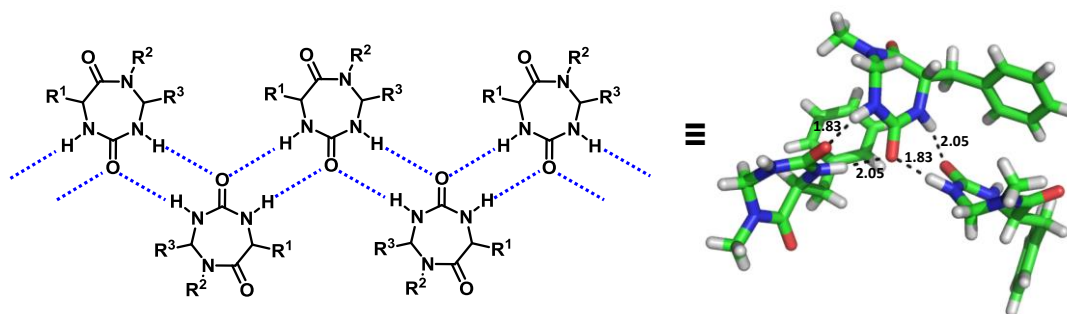
	groupe d'espace	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>6</sub>	T <sub>7</sub>	$\alpha$ (°)
<b>cyclo(Phe-gSar-CO)</b>	P6 <sub>1</sub>	-0,53	-1,86	58,22	-66,48	-4,37	68,02	-53,22	120,7
<b>cyclo(Phe-gSar-CS)</b>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	3,67	-0,10	54,87	-65,91	-3,81	71,60	-60,60	114,7

T<sub>1-7</sub> angles de torsion associés aux séquences C7-N1-C2-N3, N1-C2-N3-C4, C2-N3-C4-N5, N3-C4-N5-C6, C4-N5-C6-C7, N5-C6-C7-N1, C6-C7-N1-C2

**Tableau IV.2** : mesures des angles de torsions

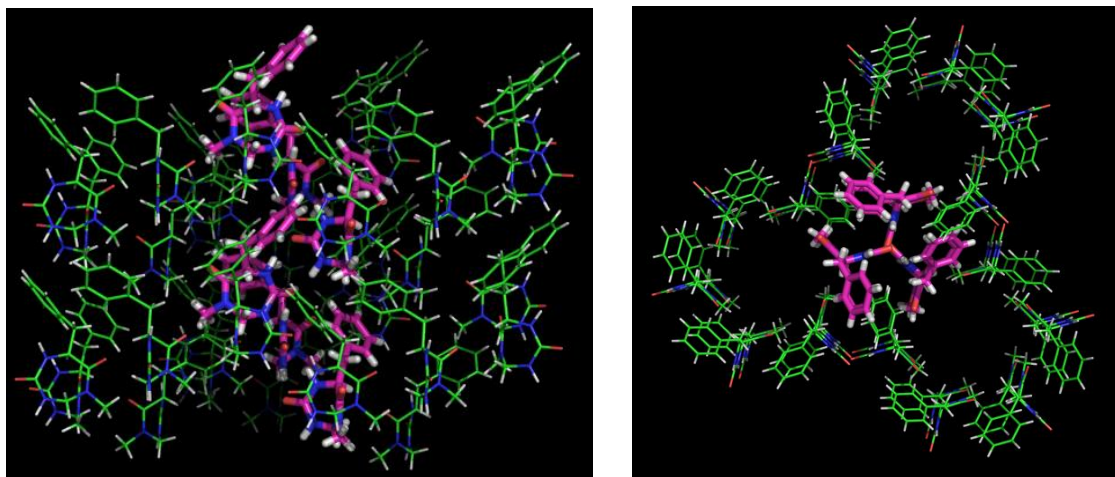
Les angles de torsions  $T_1$ ,  $T_2$  et  $T_5$  dans **IV.1** sont faibles ( $< 10^\circ$ ) ce qui signifie que la thiourée est largement plane. Les angles de torsion et les longueurs de liaisons sont très similaires pour **cyclo(Phe-gSar-CO)** et **cyclo(Phe-gSar-CS)**, ce qui confirme que la géométrie est semblable pour les deux cycles. En revanche, comme il a été décrit au début de ce chapitre, les thiourées et les urées ont des propriétés physico-chimiques différentes en particulier en ce qui concerne la création de liaison hydrogène donc les propriétés d'auto-assemblage des cycles **cyclo(Phe-gSar-CO)** et **cyclo(Phe-gSar-CS)** seront différentes.

Comme il a déjà été également cité au chapitre III, les 1,3,5-triazépane-2,6-diones présentent des propriétés d'auto-assemblage dues aux liaisons hydrogène intermoléculaires et aux interactions de Van der Waals (**figure IV.5**)



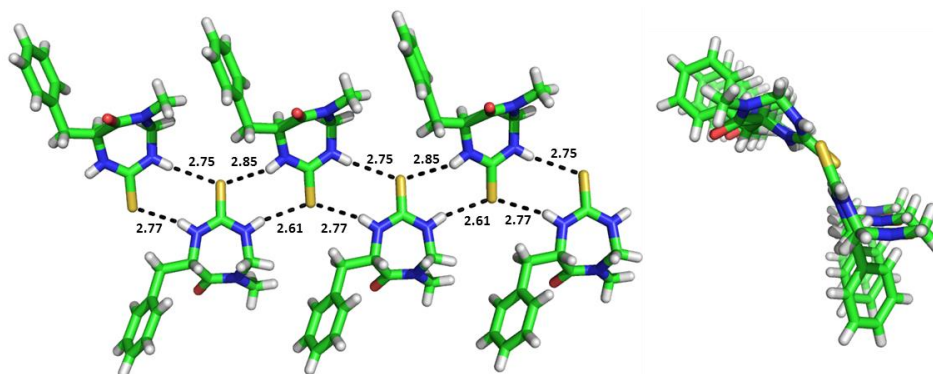
**Figure IV.5**: organisation générale des 1,3,5-triazépane-2,6-diones en ruban moléculaire structuré par des liaisons hydrogène (à gauche) et un exemple de structure avec **cyclo(Phe-gSar-CO)** (à droite)

Chaque hétérocycle est lié à deux voisins par les liaisons hydrogène entre les urées. Il y a donc formation de pseudo-cycles à huit chaînons entre deux 1,3,5-triazépane-2,6-diones. De plus, les rubans moléculaires définis par cet enchainement de **cyclo(Phe-gSar-CO)** sont de nature hélicoïdale (**figure IV.6**, à gauche, une hélice est représentée en rose) et ces hélices peuvent elles-mêmes s'auto-assembler pour générer une structure poreuse (**figure IV.6**, à droite) dont les pores ont un diamètre intérieur d'environ 6 Å.<sup>211</sup>



**Figure IV.6 :** auto-assemblage de *cyclo(Phe-gSar-CO)*

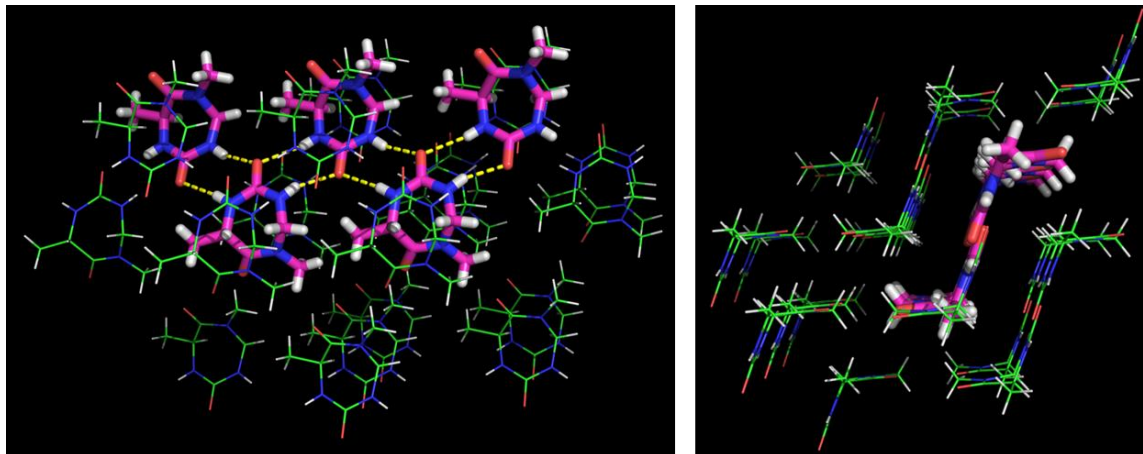
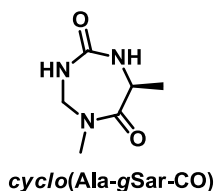
Dans le cas du *cyclo(Phe-gSar-CS)* (IV.1), les liaisons hydrogène forment également des pseudo-cycles à huit chaînons (figure IV.8, à gauche). Mais contrairement à *cyclo(Phe-gSar-CO)*, le ruban moléculaire formé par les molécules de IV.1 est quasiment plan (figure IV.7, à droite).



**Figure IV.7 :** ruban moléculaire formé par les molécules de IV.1

La structure hélicoïdale du ruban formé par les molécules *cyclo(Phe-gSar-CO)* est peut-être due au dérivé benzyle. L'hétérocycle *cyclo(Ala-gSar-CO)* forme également un ruban moléculaire mais ne présente pas la structure hélicoïdale (figure IV.8). Le composé IV.1 quant-à-lui possède le groupement benzyle mais la longueur des liaisons hydrogène entre C=S et N-H étant plus grande (2,61-2,85 Å) qu'entre C=O et N-H (1,83-2,05 Å), les cycles sont plus éloignés les uns des autres et donc la gêne stérique entre les benzyles est plus faible.



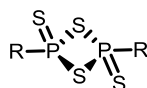
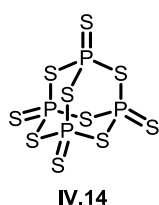


**Figure IV.8** : ruban moléculaire formé par *cyclo(Ala-gSar-CO)*

### III. Thionation du squelette 1,3,5-triazépane-2,6-dione

#### III.1. Réactifs de thionation des carbonyles

La seconde manière d'obtenir un thiocarbonyle à la place d'un carbonyle est la thionation directe avec notamment l'utilisation du réactif de Lawesson ou du pentasulfure de phosphore (**figure IV.9**). La présence de thiocarbonyles à la place des carbonyles permet d'augmenter la lipophilie des composés et donc d'accroître leur biodisponibilité.<sup>212</sup>



R = PhOMe  
Réactif de Lawesson

R = PhOPh  
Réactif de Belleau

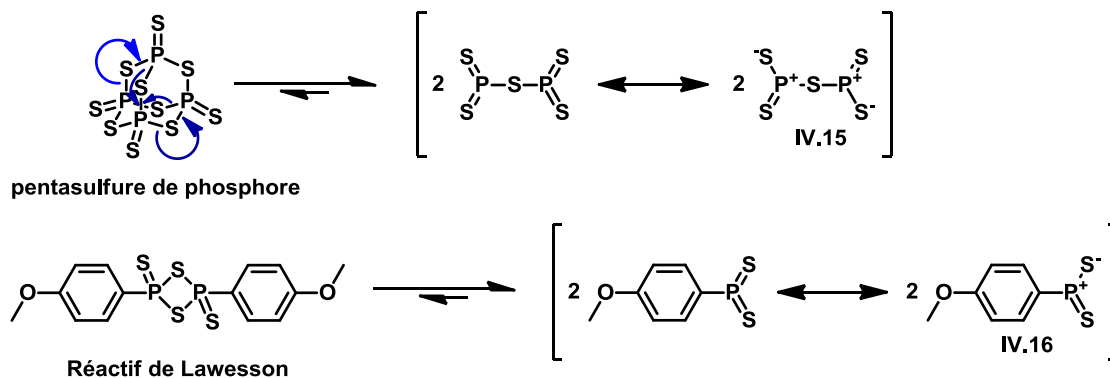
R = S-Me, S-Et, S-*i*Pr, S-Bu  
réactifs de Davy

**Figure IV.9** : réactifs utilisés lors des réactions de thionation

Ces deux réactifs sont les plus utilisés mais d'autres peuvent également être employés, les réactifs de Belleau,<sup>213</sup> de Davy<sup>214</sup> (qui sont tous des analogues du réactif de Lawesson) ou bien le sulfure d'hydrogène.

Le mécanisme de thionation est commun pour les composés analogues au réactif de Lawesson (**schéma IV.9**).

**1<sup>ère</sup> étape : dissociation des réactifs**

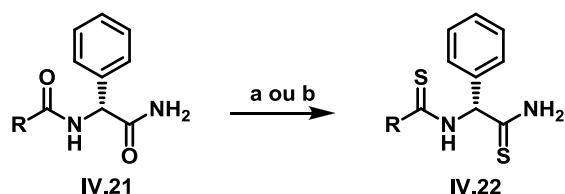


**2<sup>ème</sup> étape : réaction sur le carbonyle**

**Schéma IV.9** : mécanisme d'action du réactif de Lawesson sur un carbonyle

Dans un premier temps, le pentasulfure de phosphore et le réactif de Lawesson se décomposent, en dérivés de sulfure de phosphore **IV.15** et **IV.16**.<sup>215</sup> Puis, le carbonyle se lie au phosphore pour donner l'intermédiaire **IV.17**, l'attaque nucléophile du soufre sur le carbocation permet la formation du cycle à quatre chaînons **IV.18**. Le réarrangement de ce cycle conduit à l'obtention du dérivé thiocarbonylé désiré **IV.19** et du produit **IV.20** qui est thermodynamiquement favorable puisque la liaison P-O est plus forte que la liaison P-S.

A l'heure actuelle, le réactif de Lawesson est le principal réactif utilisé lors des réactions de thionation, ce dernier étant plus actif que le réactif de Belleau (**schéma IV.10**).<sup>216</sup>

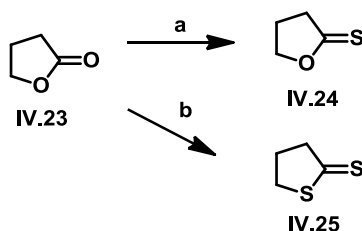


a) Réactif de Lawesson (1,2 éq.), toluène, 100°C, 35-60 min, b) Réactif de Belleau (1,2 éq.), THF, 50°C, une nuit

**Schéma IV.10** : comparaison des réactifs de Lawesson et de Belleau pour la thionation d'amide<sup>216</sup>

L'utilisation du réactif de Lawesson permet de mener la réaction à terme en quelques dizaines de minutes alors qu'une nuit est nécessaire pour le réactif de Belleau. La thionation de l'amide primaire a lieu à température ambiante en une ou deux heures mais la nuit à 50°C est nécessaire pour la thionation de l'amide secondaire.

En revanche le réactif de Lawesson est moins actif que le réactif de Davy et donc il est plus sélectif (**schéma IV.11**).<sup>217</sup>



a) Réactif de Lawesson (0,5 éq.), xylène, 120°C, 5h, b) Réactif de Davy (R= S-Me) (0,5 éq.), benzène, 80°C, 50 min.

**Schéma IV.11** : comparaison des réactifs de Lawesson et de Davy pour la thionation de carbonyles<sup>217</sup>

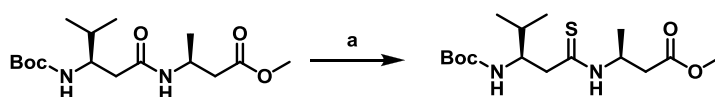
L'utilisation du réactif de Lawesson sur la lactone **IV.23** permet d'obtenir la thionation du carbonyle avec un rendement de 98 % tout en conservant l'oxygène du cycle même à hautes températures et sur plusieurs heures.<sup>218</sup> En revanche, l'utilisation du réactif de Davy conduit en moins d'une heure et à température plus basse à la thionation du carbonyle mais également au remplacement de l'oxygène du cycle par soufre. D'après Yousif *et coll.*, la formation du composé **IV.24** n'est pas observée lors de l'utilisation du réactif de Davy.

Entre le réactif de Lawesson et le pentasulfure de phosphore, le choix se porterait vers le réactif de Lawesson puisque les rendements sont supérieurs<sup>219</sup> même si dernièrement l'utilisation du réactif de Curphey permet d'obtenir des rendements comparables à ceux du réactif de Lawesson.<sup>220</sup> Lors de la réaction entre le pentasulfure de phosphore et un carbonyle, des espèces de type polythiophosphates, très réactives, sont produites et peuvent provoquer des réactions secondaires avec les carbonyles ou les thiocarbonyles faisant ainsi chuter le rendement de thionation. L'ajout de  $(\text{Me}_3\text{Si})_2\text{O}$  (HMDO, HexaMethylDisilOxane) au pentasulfure de phosphore (mélange appelé réactif de Curphey) permet d'augmenter les rendements de thionation par piégeage des espèces polythiophosphates par le HMDO.

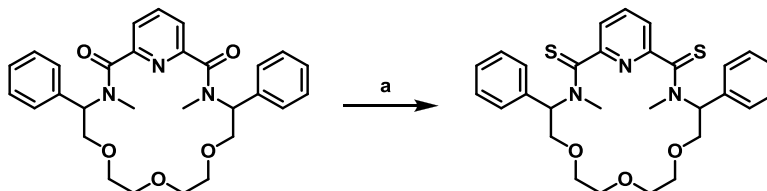
### III.2. Utilisation du réactif de Lawesson sur le squelette 1,3,5-triazépane-2,6-diones

La fonction amide est décrite comme étant très réactive vis-à-vis du réactif de Lawesson,<sup>215</sup> en revanche les exemples concernant la thionation des urées sont plus rares.

La plupart des protocoles de thionation de fonction amide par le réactif de Lawesson ne nécessitent pas de chauffage du milieu réactionnel sauf dans certains cas où l'amide est désactivé et où le chauffage à reflux est nécessaire (**schéma IV.12**).



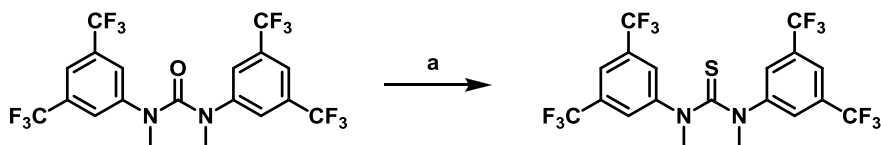
a) Réactif de Lawesson (0,5 éq.), THF, TA, 2h30, **95 %**<sup>180a</sup>



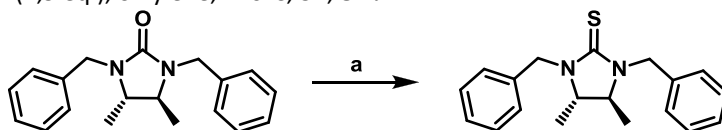
a) Réactif de Lawesson (2,7 éq.), toluène, reflux, 9h, **90 %**<sup>221</sup>

**Schéma IV.12** : exemples de thionation de fonctions amides par le réactif de Lawesson

La réactivité des urées tétrasubstituées envers le réactif de Lawesson est la plus grande (**schéma IV.13**), viennent ensuite les urées trisubstituées (**schéma IV.14**) et il n'y a que peu de réactivité sur les urées disubstituées (**schéma IV.15**). Quelques exemples provenant de la littérature illustrent cette différence de réactivité.



a) Réactif de Lawesson (1,9 éq.), o-xylène, 170°C, 5h, **84 %**<sup>222</sup>

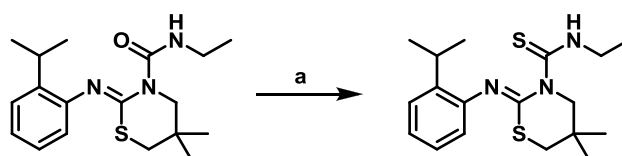


a) Réactif de Lawesson (2 éq.), o-xylène, 145°C, 24h, **91 %**<sup>223</sup>

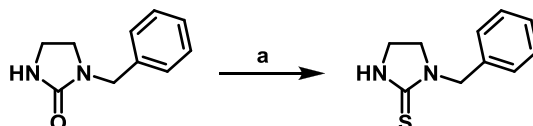
**Schéma IV.13** : exemple de thionation d'urée tétrasubstituée par le réactif de Lawesson

Comme il est visible sur ces deux exemples, les rendements de thionation de la fonction carbonyle d'une urée tétrasubstituée sont élevés (supérieurs à 80 %), néanmoins, les conditions d'obtention des thiocarbonyles sont plus difficiles (plus de 145°C dans l'o-xylène pendant plusieurs heures) que pour les fonctions amides.

Les rendements de thionation des urées trisubstituées sont plus faibles que pour les urées tétrasubstituées mais les conditions de réaction sont plus douces (**schéma IV.14**).



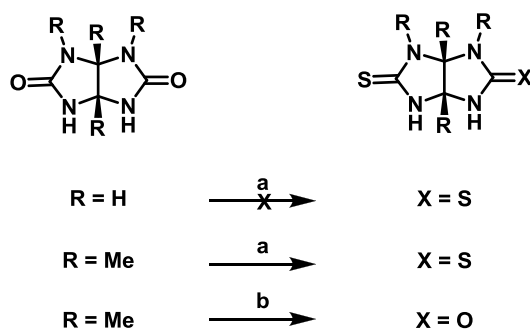
a) Réactif de Lawesson (0,5 éq.), pyridine, 80°C, 2 h, **65 %**<sup>224</sup>



a) Réactif de Lawesson (1,2 éq.), toluène, reflux, une nuit, **50 %**<sup>225</sup>

**Schéma IV.14** : exemple de thionation d'urées trisubstituées par le réactif de Lawesson

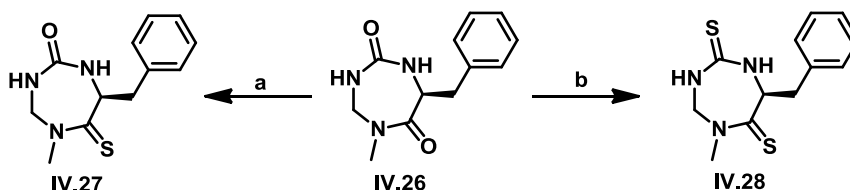
Les rendements plus faibles des réactions de thionations des urées trisubstituées peuvent s'expliquer par la formation de sous-produits comme dans le cas des urées disubstituées. En effet, El-Barbary et Lawesson ont montré que lors de la réaction entre une urée disubstituée et le réactif de Lawesson à hautes températures dans le toluène ou l'*o*-xylène, des sous-produits se forment de façon majoritaire.<sup>226</sup> Cow et Harrison ont également illustré cette difficulté de thionation des urées disubstituées avec l'exemple présenté au **schéma IV.15**.<sup>227</sup> Lorsque la réaction est effectuée sur un glycourile avec R = H, le composé thiocarbonyle désiré n'est pas obtenu. En revanche, dans les mêmes conditions opératoires, lorsque R = Me, le composé dithiocarbonyle est obtenu avec un rendement de 60 %, ce qui est conforme aux rendements des réactions de thionation d'une urée trisubstituée.



a) Réactif de Lawesson (3 éq.), toluène, reflux, 16h, **60 %** ; b) Réactif de Lawesson (1 éq.), toluène, reflux, 16h, **83 %** (mélange de monothiourée et de dithiourée, 2 :1)<sup>227</sup>

**Schéma IV.15** : exemple de la difficulté d'obtenir un thiourée disubstituée par réaction du réactif de Lawesson sur une urée.<sup>227</sup>

Lors de ces travaux de thèse, Joël Boeglin a mis au point une méthode de thionation des carbonyles des 1,3,5-triazépane-2,6-diones (**schéma IV.16**).

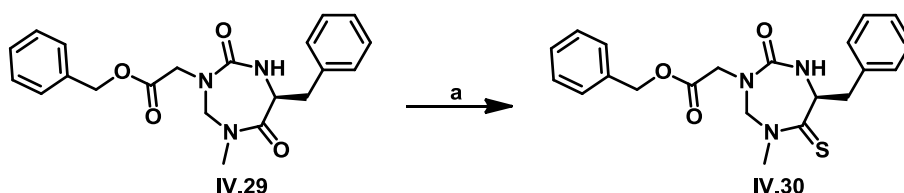


a) Réactif de Lawesson (1 éq.), THF, TA ; b) Réactif de Lawesson (1 éq.), toluène, 80°C

**Schéma IV.16** : Thionation des carbonyles du châssis 1,3,5-triazépane-2,6-dione

A température ambiante, le réactif de Lawesson ne réagit que sur la fonction amide donnant le composé **IV.27** avec un rendement de 79%. La thionation de la fonction urée nécessite quant-à-elle le chauffage de la réaction à 80°C, le composé **IV.28** est alors obtenu avec un rendement de 80%.

Dans le cadre de cette thèse et afin d'évaluer le potentiel de cette réaction pour la thionation d'autres triazépanediones et mesurer l'influence du degré de substitution de l'urée, le protocole de thionation des amides par le réactif de Lawesson a été appliqué sur une molécule *N*-monoalkylée présente en grande quantité au laboratoire : le composé **IV.29** (schéma IV.17)

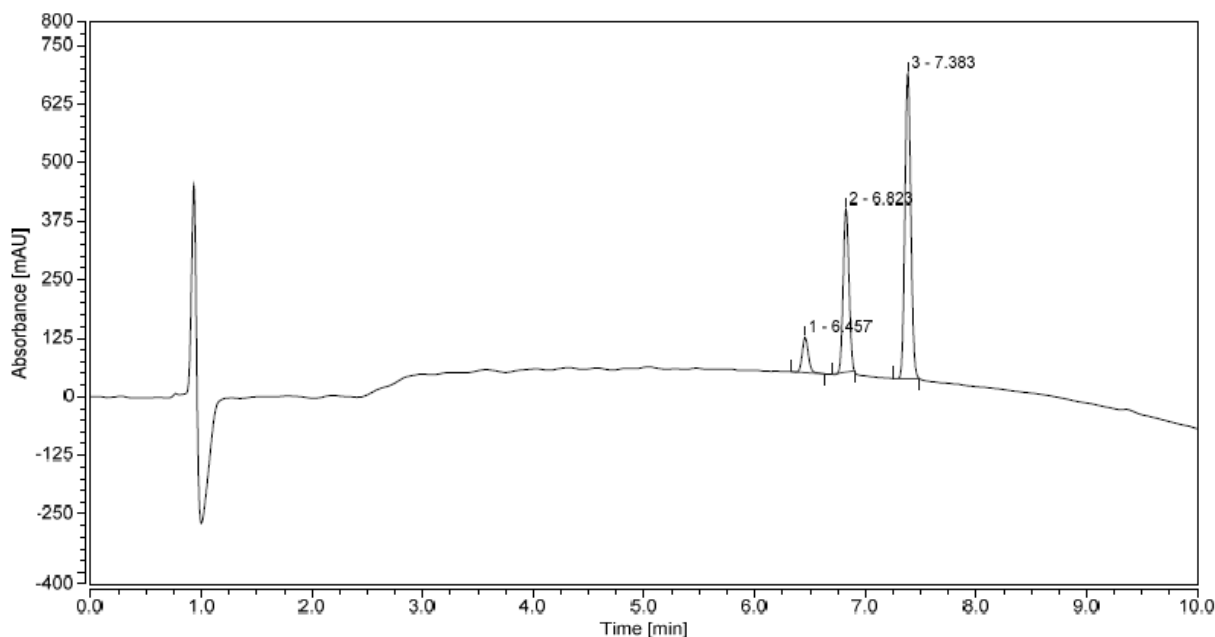


a) Réactif de Lawesson (2 éq.), THF, 60°C, 57 %

**Schéma IV.17** : formation d'un thioamide sur une 1,3,5-triazépane-2,6-dione monoalkylée

Contrairement à la procédure décrite par Joël Boeglin, deux équivalents de réactif de Lawesson ont été nécessaires ainsi que le chauffage à 60°C pendant deux jours pour convertir le produit de départ. Le dérivé thioamide **IV.30** a été obtenu avec un rendement de 57 %.

Cette méthodologie a ensuite été appliquée au composé *cyclo*(Val-*gSar*-CO) *N*-monoalkylé par l'acétate de tertiobutyle (composé **III.29 F**, **Tableau III.9**, chapitre III). Après purification par colonne chromatographique sur gel de silice, un seul produit est visible sur une plaque de CCM (révélateur UV et ninhydrine 1% dans EtOH) or le chromatogramme HPLC du produit purifié révèle la présence de trois produits (**figure IV.10** et **tableau IV.3**).



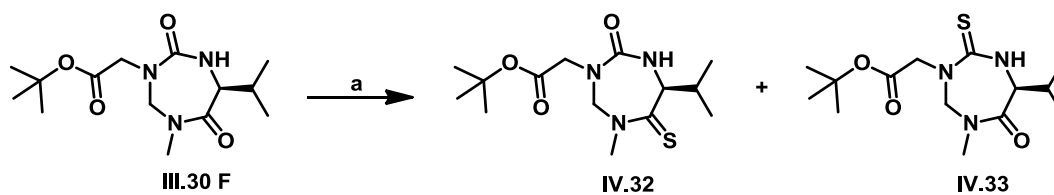
**Figure IV.10** : chromatogramme du produit majoritaire isolé par chromatographie sur silice après thionation du composé **III.29 F** ( $C_{18}$ -HPLC, (A : 0.1% TFA in  $H_2O$ , B : 0.1% TFA in  $CH_3CN$ , 20-80% B, 1 mL/min, 10 min)

$t_R$ (min)	Aire (%)
6,46	7
6,82	32
7,38	61

**Tableau IV.3** : temps de rétention et proportions des produits vus sur le chromatogramme du produit majoritaire isolé après thionation du composé **III.29 F**

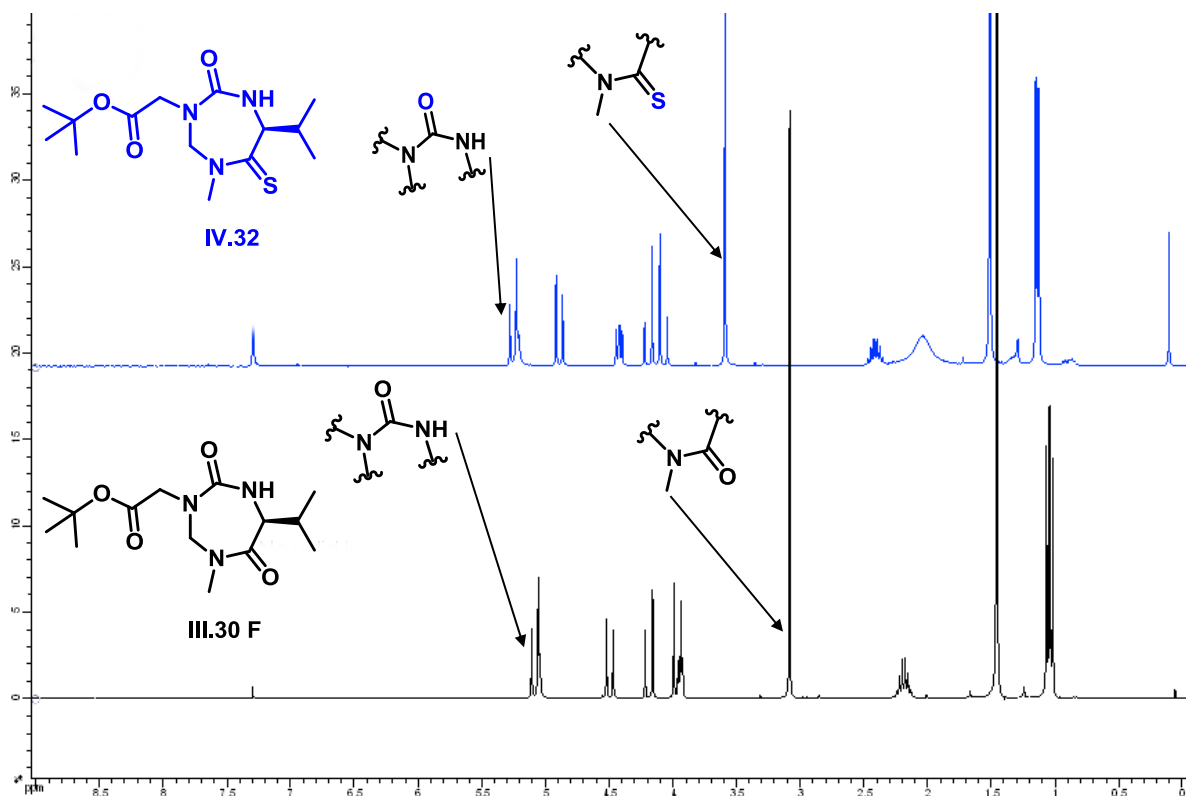
Une seconde purification par HPLC semi-préparative en phase inverse a permis d'isoler les deux composés majoritaires : **IV.32** dont le temps de rétention en HPLC est de 6, 82 min et **IV.33** dont le temps de rétention est de 7, 38 minutes ( $C_{18}$ -HPLC, (A : 0.1% TFA in  $H_2O$ , B : 0.1% TFA in  $CH_3CN$ , 20-80% B, 4 mL/min, 10 min)). L'analyse des spectres de masse a révélé que les deux composés **IV.32** et **IV.33** ont la même masse qui correspond au remplacement d'un oxygène par un soufre. Il semblerait donc qu'il y ait eu formation simultanée de la thiourée et du thioamide (**schéma IV.18**, **figure IV.11**, **figure IV.12**).



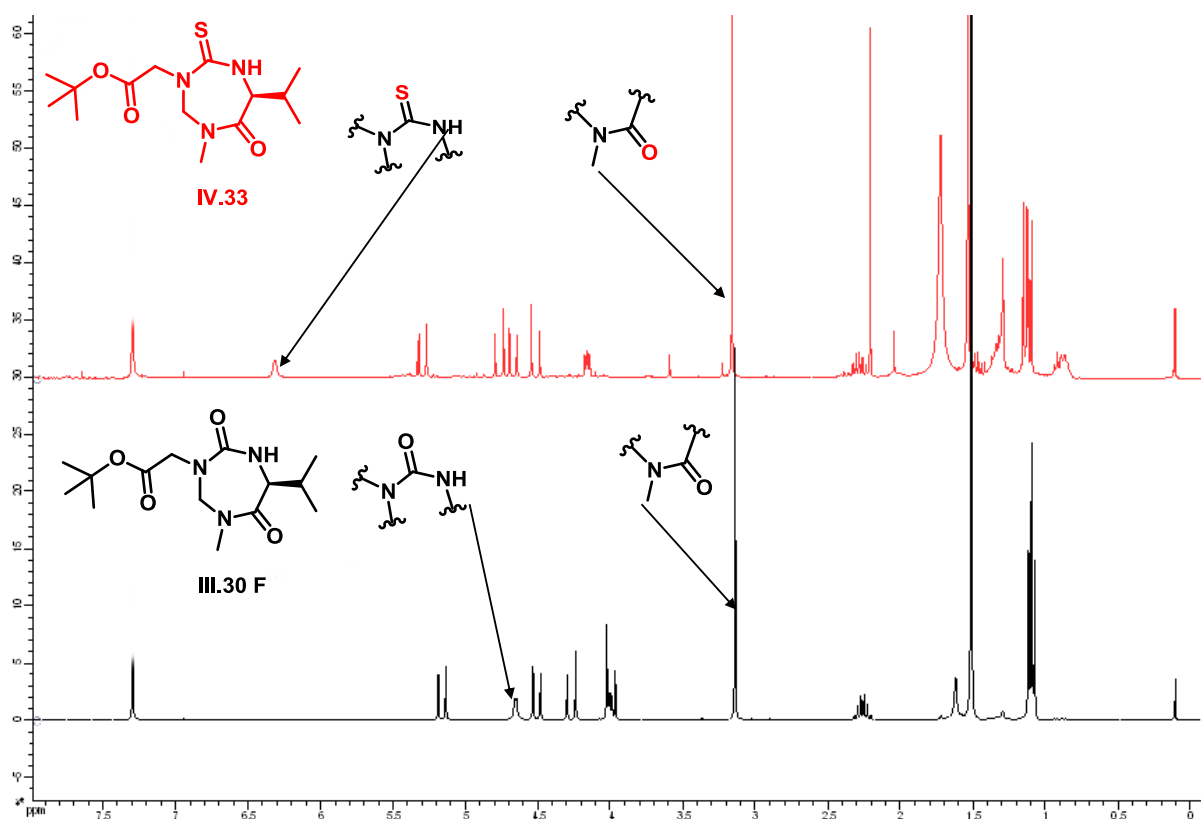


a) Réactif de Lawesson (2 éq.), THF, 60°C

**Schéma IV.18** : thionation du composé **III.30 F**



**Figure IV.11** : spectres RMN des composés **III.30 F** (noir) et **IV.32** (bleu) dans  $\text{CDCl}_3$  à  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$  (300 MHz, 298 K)



**Figure IV.12** : spectres RMN des composés **III.30 F** (noir) et **IV.33** (rouge) dans  $\text{CDCl}_3$  à  $4 \text{ mg.mL}^{-1}$  (300 MHz, 298 K)

	$\delta$ (NMe) (ppm)	$\delta$ (NH) (ppm)
<b>III.30 F</b> ( $10 \text{ mg.mL}^{-1}$ )	3,08	5,04
<b>IV.32</b> ( $10 \text{ mg.mL}^{-1}$ )	3,59	5,21
<b>III.30 F</b> ( $4 \text{ mg.mL}^{-1}$ )	3,14	4,66
<b>IV.33</b> ( $4 \text{ mg.mL}^{-1}$ )	3,16	6,32

**Tableau IV.4** : déplacements chimiques de **III.29 F**, **IV.32** et **IV.33**

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  du composé **III.30 F** (**figure IV.11**, spectre noir) et du composé **IV.32** (**figure IV.11**, spectre bleu) montrent un déplacement chimique différent pour les protons NMe. Le déplacement chimique des protons du méthyle porté par l'azote est de 3,08 ppm dans le cas du composé **III.30 F** qui possède un amide alors qu'il est débindé ( $\delta = 3,59 \text{ ppm}$ ) dans le cas du composé **IV.32** ce qui suggère la présence d'une fonction thioamide (**tableau IV.4**). En revanche, le déplacement chimique du proton NH est voisin dans les deux composés suggérant que la fonction urée n'est pas affectée pour le composé **IV.32**. Concernant le composé **IV.33** (**figure IV.12**, spectre rouge), le déplacement chimique du

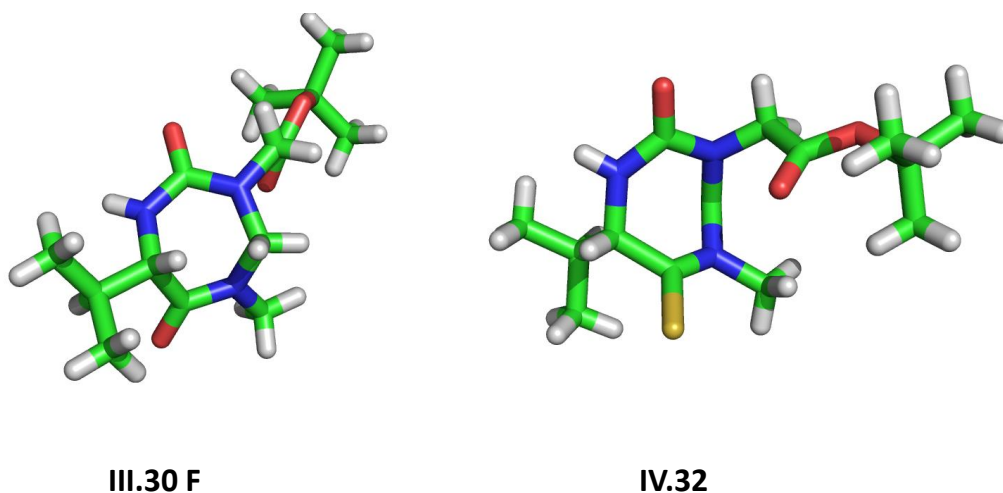
singulet correspondant aux protons NMe est proche de celui du composé **III.30 F** (figure **IV.12**, spectre noir) ce qui implique la conservation de la fonction amide. En revanche le signal du proton NH urée à 5,04 ppm dans le spectre du composé **III.30 F** disparaît et un signal nettement plus déblindé apparaît à 6,32 ppm (même solvant, même concentration) dans le spectre de **IV.33** compatible avec la transformation de l'urée en thiourée. De plus, l'analyse des spectres RMN du carbone révèle la présence de signaux à 157,91 ppm (NCON), 168,83 ppm (COOtBu) et 201,44 (NCSC<sub>H</sub>) ppm pour le composé **IV.32** et 167,75(COOtBu), 169,86 (N<sub>C</sub>CO<sub>H</sub>) et 185,17 (NCSN) pour le composé **IV.33**, ce qui confirme les déductions faites grâce aux spectres RMN du proton.

Les deux composés formés au cours de la réaction de thionation sont bien la 6-thioxo-1,3,5-triazépane-2-one **IV.32** (rdt = 25 %) et la 2-thioxo-1,3,5-triazépane-6-one **IV.33** (rdt = 12 %) (schéma **IV.13**).

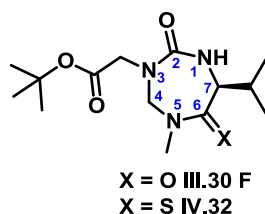
La formation non attendue du composé **IV.33** est d'autant plus surprenante que la réactivité du réactif de Lawesson est plus élevée sur les amides que sur les urées. De plus lors de la réaction test (schéma **IV.12**), la formation de la thiourée n'a pas été observée. Une explication possible pour expliquer la non-réaction de l'urée du composé **IV.29** avec le réactif de Lawesson serait l'encombrement stérique dû au deux groupements phényles présents sur l'hétérocycle. Ces derniers pourraient gêner la formation de la liaison P-O entre l'ylure de dithiophosphines (composé **IV.16**, schéma **IV.9**, page 142) et l'urée.<sup>228</sup>

### III.3. Comparaison des structures cristallographiques des composés **III.30 F** et **IV.32**

Des cristaux des composés **III.30 F** et **IV.32** ont été obtenus et analysés par diffraction des rayons X. Les structures des deux composés diffèrent en partie par la conformation du cycle (figure **IV.13**).



**Figure IV.13** : Structures cristallographiques des composés **III.30 F** et **IV.32**



	groupe d'espace	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>6</sub>	T <sub>7</sub>	α
<b>III.30 F</b>	P2 <sub>1</sub>	6,25	11,27	42,21	-71,91	8,20	67,28	-68,88	114,7
<b>IV.32</b>	P1	33,67	5,25	-73,76	62,76	16,21	-54,47	9,38	109,3

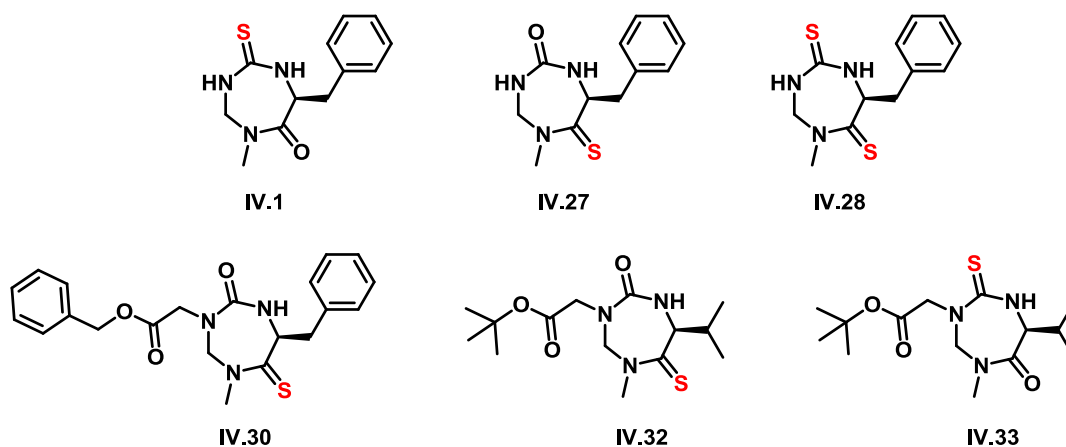
T<sub>1-7</sub> angles de torsion associés aux séquences C7-N1-C2-N3, N1-C2-N3-C4, C2-N3-C4-N5, N3-C4-N5-C6, C4-N5-C6-C7, N5-C6-C7-N1, C6-C7-N1-C2

**Tableau IV.5** : données cristallographiques des cycles **III.30 F** et **IV.32**

La molécule **III.30 F** adopte la conformation A qui se caractérise par la planéité de l'urée (T<sub>1</sub> et T<sub>2</sub> inférieur à 16°), par un angle α entre les plans formés par l'urée et l'amide d'une valeur de 114,7° et par la position pseudo-équatoriale adoptée par le groupement isopropyle. En revanche, l'urée du composé **IV.32** est davantage "twistée" (T<sub>1</sub> = 33,67°), et le groupement isopropyle adopte une position pseudo-axiale caractéristique de la conformation B. Toutefois l'angle formé par les plans thioamide et thiourée est plus faible que celui mesuré dans les conformations B décrites pour les 1,3,5-triazépane-2,6-diones.

## IV. Conclusion

Dans le cadre d'une augmentation de la diversité moléculaire autour du squelette 1,3,5-triazépane-2,6-dione par remplacement d'un carbonyle par un thiocarbonyle, six nouveaux cycles à squelettes 6-thioxo-1,3,5-triazépan-2-one, 2-thioxo-1,3,5-triazépan-6-one, et 1,3,5-triazépane-2,6-dithione ont été synthétisés (**figure IV.14**).



**Figure IV.14** : hétérocycles analogues de 1,3,5-triazépane-2,6-dione présentant une ou deux fonctions thiocarbonyles dans le squelette.

Le composé **IV.1** se distingue des autres analogues de 1,3,5-triazépane-2,6-diones car la fonction thiocarbonyle a été formée au cours de l'étape de cyclisation.

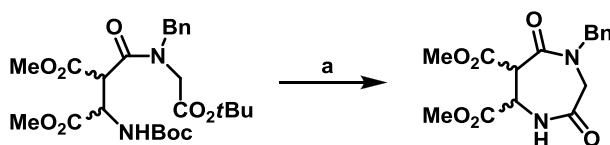
Les autres composés ont subi une thionation post-cyclisation mais il est à noter une certaine différence de réactivité entre les composés non-alkylés et les *N*-monoalkylés qui mériterait encore d'être exemplifiée à travers une série plus diversifiée d'hétérocycles.



**Chapitre V : Synthèse de cycles analogues aux 1,3,5-  
triazépane-2,6-diones à huit membres**

## I. Augmentation de taille de cycle

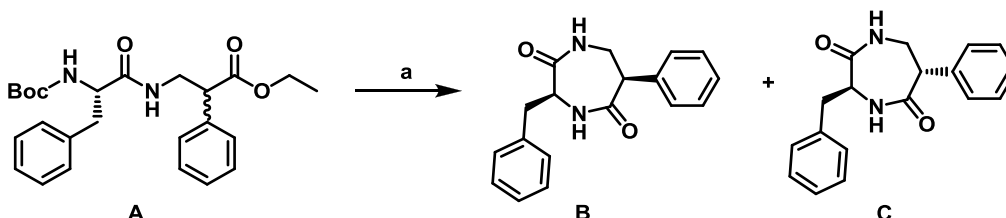
Le processus de cyclisation ainsi que l'introduction de  $\beta$ -acides aminés sont deux pistes souvent citées pour augmenter la stabilité des peptides.<sup>229</sup> La combinaison de ces deux concepts permettrait donc de synthétiser des composés dérivés de peptides beaucoup plus stables que les peptides eux-mêmes. La synthèse d'analogues de dicétopipérazines dans lesquels un  $\alpha$ -acide aminé a été remplacé par un  $\beta$ -acide aminé est un exemple de cette combinaison. A la fin des années 1990, El Mahdi et *coll.* ont décrit la synthèse de 1,4-diazépane-2,5-dione dont l'azote de l' $\alpha$ -acide aminé est *N*-alkylé<sup>230</sup> cette *N*-alkylation permet de favoriser la conformation *cis* de la liaison amide et donc la cyclisation (**schéma V.1**) comme dans le cas des 1,3,5-triazépane-2,6-diones.



a) (i) TFA (30 %), TA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ; (ii) BOP (1,1 éq.), DIEA (3 éq.), -30°C, CHCl<sub>3</sub>, **68 %**<sup>230</sup>

**Schéma V.1** : synthèse de 1,4-diazépane-2,5-dione dont l'azote de l' $\alpha$ -acide aminé est *N*-alkylé

De même, en 2003, une équipe des laboratoires Novartis a publié une synthèse de 1,4-diazépane-2,5-diones sans avoir recours à la contrainte imposée par la *N*-alkylation de l'amide mais en réalisant la cyclisation en milieu très dilué (0,03 mmol.ml<sup>-1</sup>, pour comparaison, la cyclisation des 1,3,5-triazépane-2,6-diones a lieu à une concentration de 0,02 mmol.ml<sup>-1</sup>).<sup>231</sup>



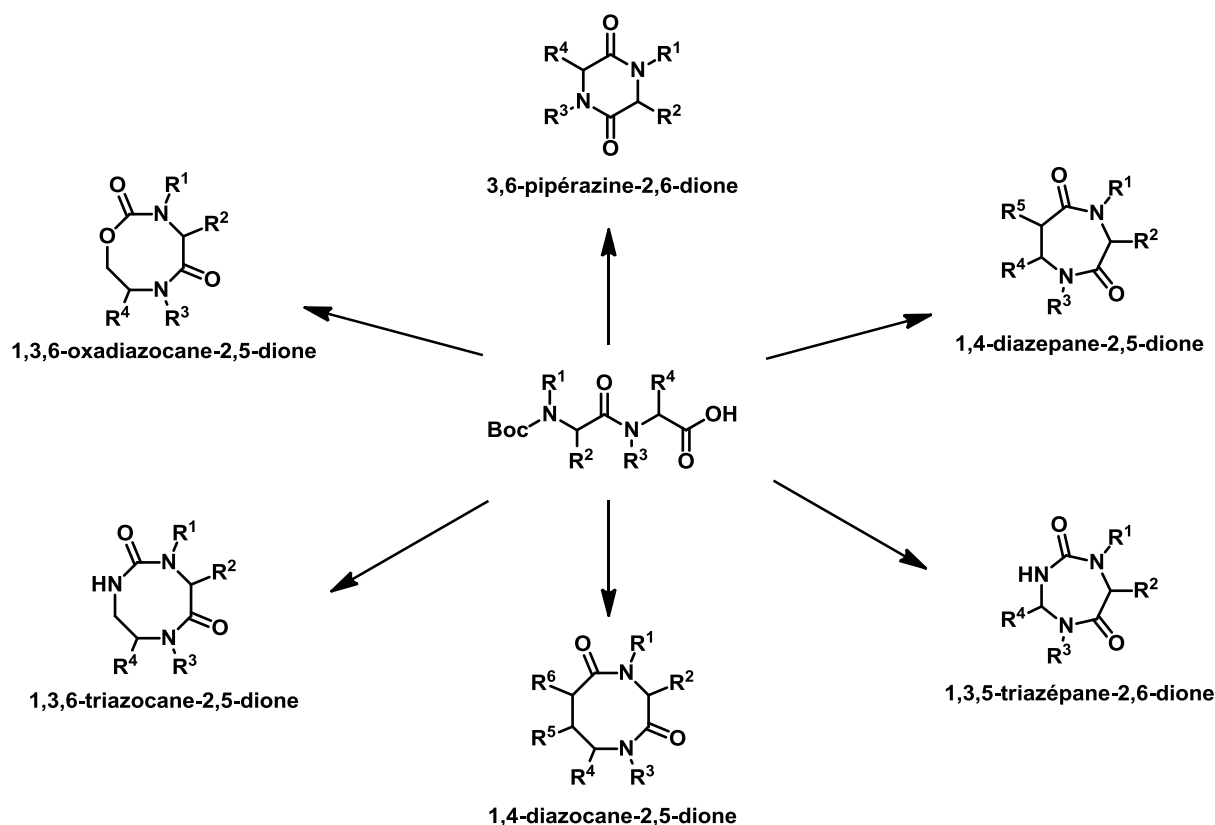
a) (i) TFA (20 %), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TA, 4h; (ii) LiOH (3M), THF, H<sub>2</sub>O, 50°C, 16h; (iii) EDC (1,5 éq.), HOBT (1,5 éq.), DIEA (3 éq.), DMF, 40°C, 16h<sup>231</sup>

**Schéma V.2** : synthèse de 1,4-diazépane-2,5-diones non *N*-alkylées



Le composé **B** est isolé avec un rendement de 18 % et le composé **C** avec un rendement de 20 %. Lors de la cyclisation du dipeptide **A** (schéma V.2), des cycles de tailles plus importantes sont également formés sans être isolés.

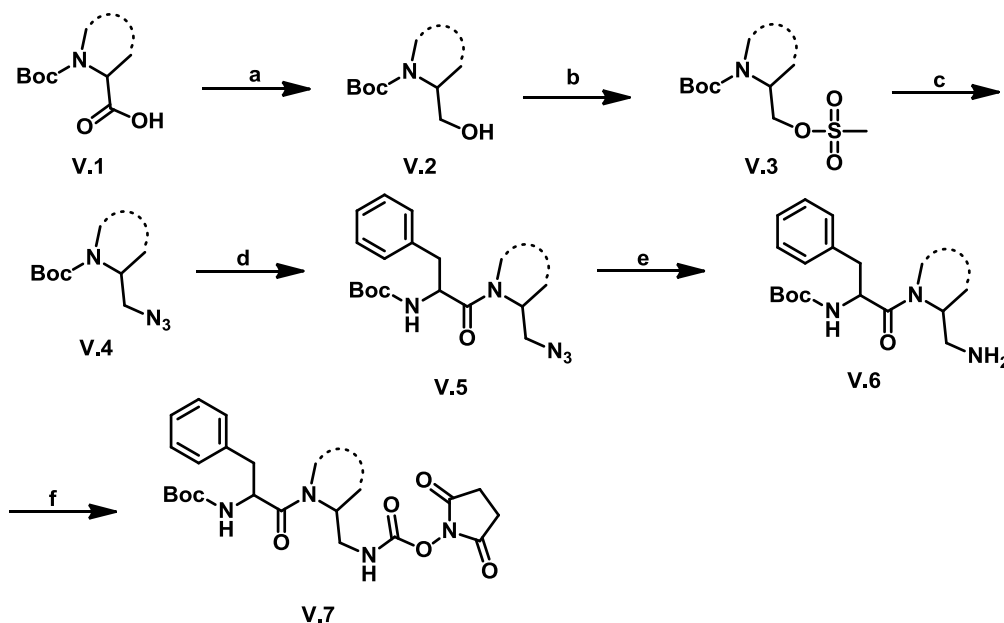
Comme cela a déjà été cité dans le chapitre II, les 1,3,5-triazépane-2,6-diones sont des analogues de dicétopipérazines à sept chaînons dérivant également de simples dipeptides. Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à la création de nouveaux systèmes hétérocycliques dérivant de dipeptides mais comportant cette fois ci huit atomes dans le cycle comme ceux représentés sur la **figure V.1**. Nous avons notamment évalué la possibilité de préparer les squelettes 1,3,6-triazocane-2,5-dione et 1,3,6-oxadiazocane-2,5-diones. Il existe quelques exemples dans la littérature de composés avec un squelette 1,4-diazocane-2,5-dione.<sup>232</sup> Il s'agit d'un système intéressant qui mériterait également d'être développé dans le futur.



**Figure V.1** : squelettes hétérocycliques à six, sept et huit chaînons dérivés de dipeptides

## II. Cycle de type 1,3,6-triazocane-2,5-dione

La synthèse envisagée est analogue à celle des cycles 1,3,5-triazépane-2,6-diones, le précurseur linéaire étant activé sous forme de carbamate de succinimide et comportant une fonction amine *N*-Boc protégée (**schéma V.3**).



a) (i) *i*BuOCOCl (1,05 éq.), NMM (1,1 éq.), THF, -15°C, 30 min, (ii) NaBH<sub>4</sub> (2 éq.), H<sub>2</sub>O, 0°C, 16h b) MeSO<sub>2</sub>Cl (1,5 éq.), TEA (1,5 éq.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C, puis TA, 1h c) NaN<sub>3</sub> (2,5 éq.), DMF, 60°C, 15h; d) (i) TFA, 0°C, 30 min, (ii), BOP (1 éq.), DIEA (3 éq.), Boc-Phe-OH (1 éq.), DMF, TA, 4h e) H<sub>2</sub>, Pd/C (10%), MeOH, TA, 5h (rdt = quant.); f) DSC (1,2 éq.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TA, 20h.

**Schéma V.3** : synthèse du précurseur carbamate pour la synthèse des 1,3,6-triazocane-2,5-diones

La préparation de la fonction éthylène diamine s'inspire des synthèses mises au point au laboratoire pour l'obtention des monomères activés permettant la synthèse d'oligomères d'urée à conformation hélicoïdale.<sup>233</sup> La première étape de cette synthèse consiste en la réduction de l'acide carboxylique de l'acide aminé **V.1** en alcool. L'acide est en premier lieu activé grâce au chloroformiate d'isobutyle (IBCF) en présence de NMM puis l'anhydride mixte obtenu est réduit en alcool par NaBH<sub>4</sub>. Le β-amino alcool **V.2** réagit ensuite avec le chlorure de méthanesulfonyle pour donner le mésylate **V.3** avec un rendement quantitatif. Le mésylate brut **V.3** réagit avec l'azoture de sodium NaN<sub>3</sub> pour former le dérivé azoté **V.4** (avec un rendement de 72 % lorsque le mésylate dérive du prolinol mais seulement de 19 %

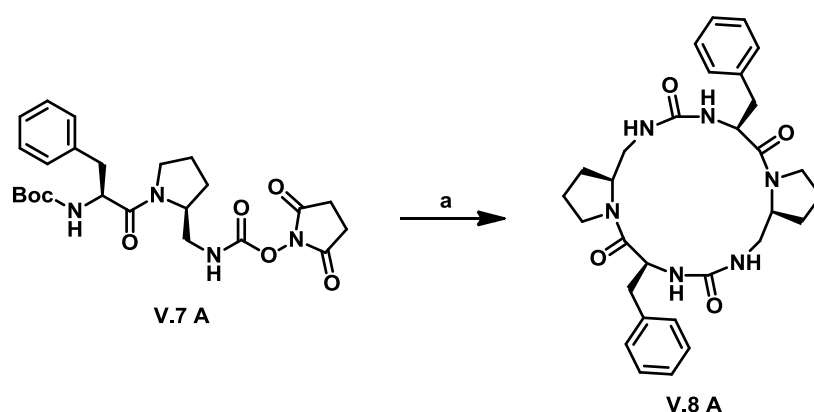
lorsque l'alcool dérive de la sarcosine car l'azoture obtenu est alors volatile). Le groupement Boc est ensuite clivé par traitement au TFA, et le sel d'amine résultant est engagé dans une réaction de couplage avec Boc-Phe-OH en présence de BOP et de DIEA. La fonction azoture de ce dipeptide **V.5** est ensuite réduite en amine par hydrogénation catalysée par du palladium sur charbon donnant ainsi le composé **V.6**. L'amine primaire n'étant pas stable, cette dernière est directement mise en réaction avec le carbonate de disuccinimide (DSC) permettant la formation du carbamate de succinimide **V.7**.

Trois carbamates **V.7** ont été préparés à partir de cette synthèse (**tableau V.1**).

Carbamate V.7	V.1	Boc-Xbb-OH	Rdt global depuis V.1
<b>V.7 A</b>	Boc-L-Pro-OH	Boc-L-Phe-OH	37 %
<b>V.7 B</b>	Boc-L-Pro-OH	Boc-D-Phe-OH	26 %
<b>V.7 C</b>	Boc-Sar-OH	Boc-L-Phe-OH	6 %

**Tableau V.1** : trois carbamates de type **V.7**

La cyclisation du carbamate **V.7 A** a été réalisée dans les mêmes conditions de dilution que pour la synthèse des 1,3,5-triazépane-2,6-diones ( $0.02 \text{ mmol.ml}^{-1}$ ) mais l'analyse du spectre de masse (ESI-MS) a révélé la seule présence du dimère cyclique (**schéma V.4**). Ce dernier a été isolé avec un rendement de 24 %.

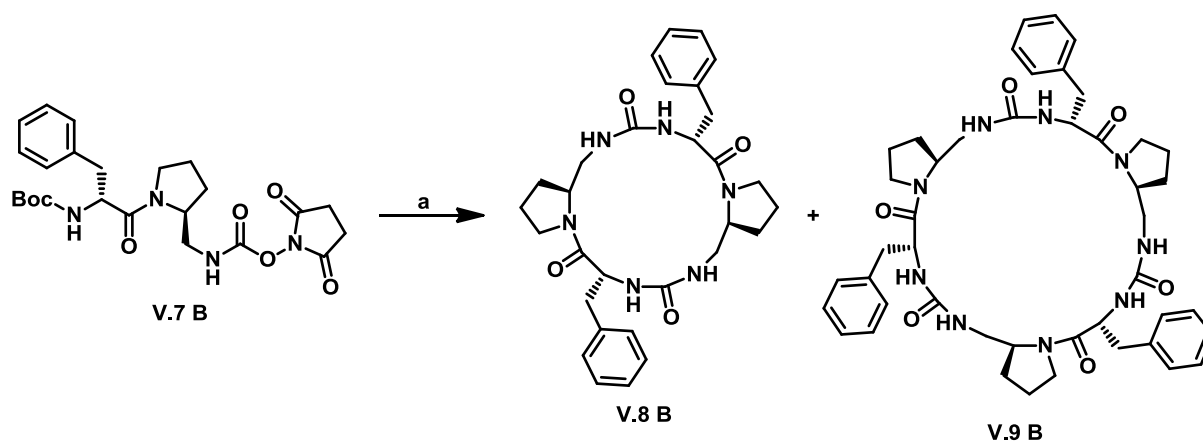


a) (i) TFA,  $0^{\circ}\text{C}$ , 30 min, (ii) DIEA (2 éq.),  $\text{CH}_3\text{CN}$ , TA, 3h

**Schéma V.4** : cyclisation de la séquence homochirale **V.7 A**

La formation du cycle 1,3,6-triazocane-2,5-dione n'ayant pas été observée, des réactions similaires ont été réalisées à des concentrations dix fois ou vingt fois plus faibles mais avec le même résultat.

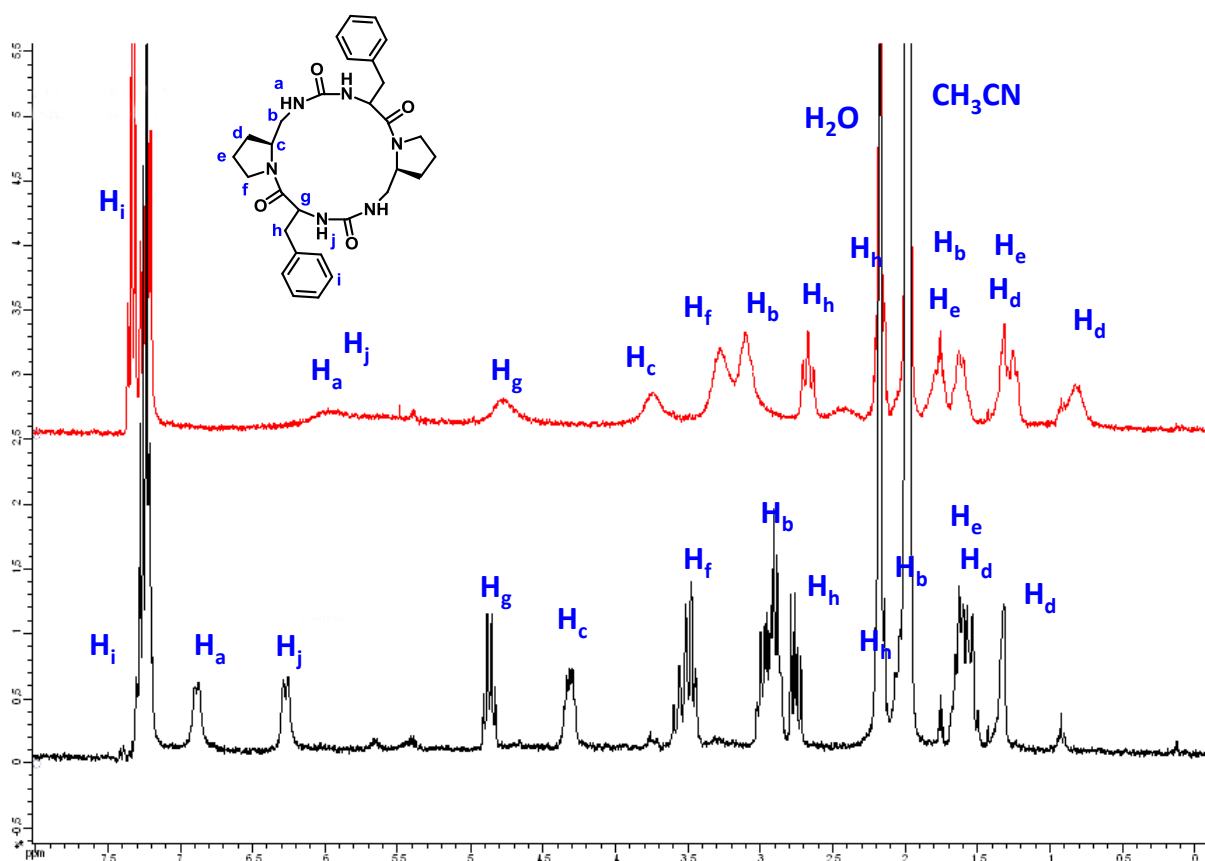
De même, la cyclisation de la séquence hétérochirale (**schéma V.5**) a conduit au dimère cyclique (**V.8 B**) avec un rendement de 25 %. Mais contrairement à la séquence homochirale, le trimère cyclique (**V.9 B**) a également pu être isolé avec un rendement faible (13 %).



a) (i) TFA, 0°C, 30 min, (ii) DIEA (2 éq.), CH<sub>3</sub>CN, TA, 3h

**Schéma V.5** : cyclisation de la séquence hétérochirale

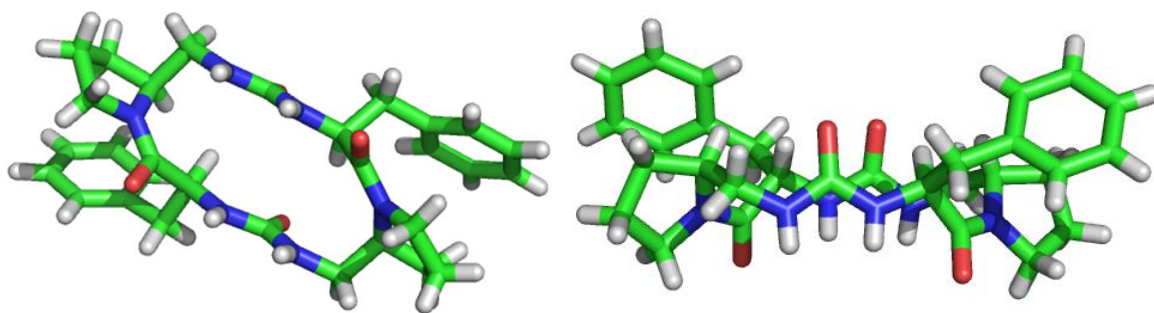
Le spectre RMN du composé **V.8 A** (1 mg.ml<sup>-1</sup>, CD<sub>3</sub>CN, 300 Mhz, 298 K) est très différent de celui de **V.8 B** (0,8 mg.ml<sup>-1</sup>, CD<sub>3</sub>CN, 300 Mhz, 298 K) (**figure V.2**).



**Figure V.2 :** RMN des composés **V.8 A** (rouge,  $1 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) et **V.8 B** (noir,  $0.8 \text{ mg.ml}^{-1}$ )  $\text{CD}_3\text{CN}$ , (300 Mhz, 298 K)

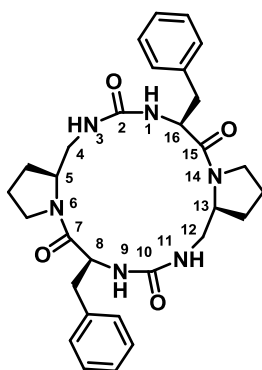
Les deux spectres ont été enregistrés dans le même solvant et à des concentrations très proches mais le spectre de **V.8 A** (rouge) fait apparaître des pics larges ce qui n'est pas le cas pour le composé **V.8 B**. De plus, les déplacements chimiques sont différents. Il est clair que ces deux composés n'ont pas le même comportement en solution. Ces résultats pourraient suggérer que **V.8 A** forme des agrégats contrairement à **V.8 B**.

Le composé **V.8 A** a été cristallisé dans de l'acétonitrile et sa structure cristallographique a été résolue par diffraction des rayons X (**figure V.3**).



**Figure V.3** : structure cristallographique du cycle **V.8 A** (vue perpendiculaire au plan du cycle à gauche et vue de profil à droite)

Le groupe d'espace de ce composé est  $P_1$ . La molécule étant symétrique, les angles de torsions ne sont calculés que pour la moitié de la molécule (**tableau V.2**).



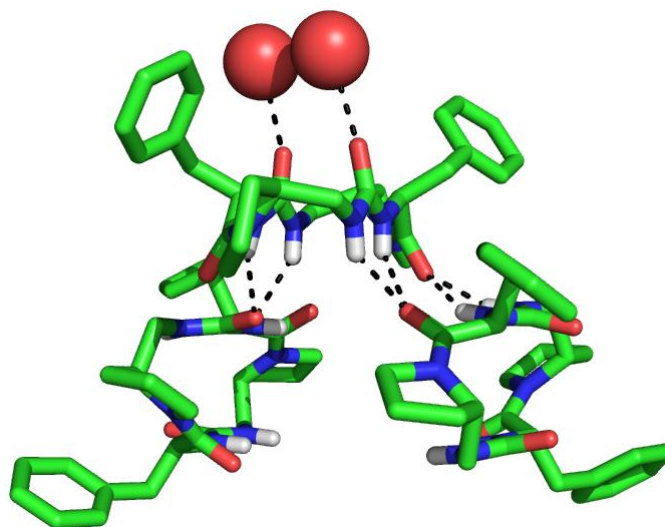
	$T_1$	$T_2$	$T_3$	$T_4$	$T_5$	$T_6$	$T_7$	$T_8$
<b>V.8 A</b>	-178,42	-179,90	84,43	46,28	-94,13	-6,53	142,55	-161,47

$T_{1-8}$  angles de torsion associés aux séquences C16-N1-C2-N3, N1-C2-N3-C4, C2-N3-C4-C5, N3-C4-C5-N6, C4-C5-N6-C7, C5-N6-C7-C8, N6-C7-C8-N9, C7-C8-N9-C10.

**Tableau V.2** : angles de torsion de la molécule **V.8 A**

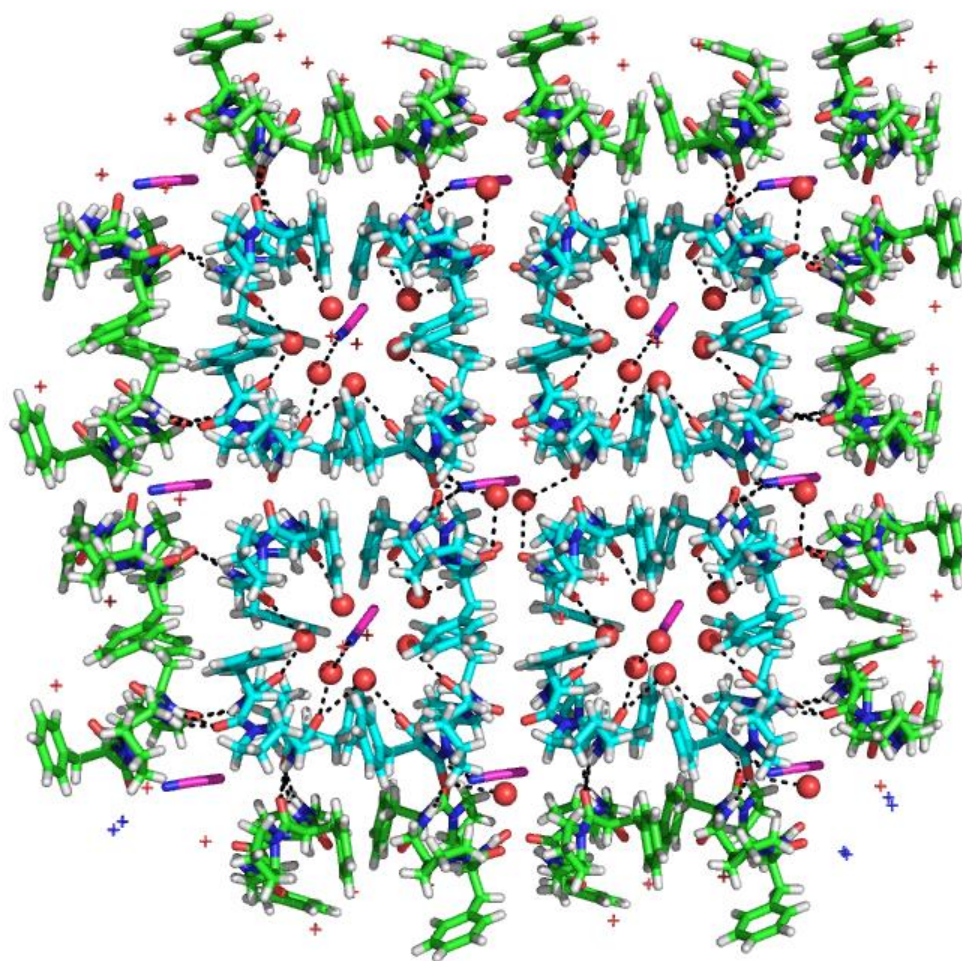
D'après les valeurs des angles de torsion  $T_1$  et  $T_2$  qui sont d'environ  $180^\circ$ , les urées sont planes. De même, l'angle  $T_6$  est proche de  $0^\circ$  ce qui prouve que les amides sont plans. Les coudes sont réalisés au niveau des résidus pyrrolidines avec une valeur de  $T_5$  l'ordre de  $-90^\circ$  (équivalente aux valeurs de  $\phi$  dans les résidus L-proline). Il est à noter que les valeurs d'angles  $\phi$  ( $-161^\circ$ ) et  $\psi$  ( $142^\circ$ ) adoptées par le résidu Phe dans la structure correspondent à celle d'une conformation totalement étendue.

Chaque macrocycle est lié à deux autres macrocycles par un réseau de six liaisons hydrogène impliquant l'oxygène amide et les hydrogènes des azotes de l'urée (**figure V.4**). Les deux carbonyles urée sont chacun liés par liaison hydrogène à une molécule d'eau.



**Figure V.4** : réseau des liaisons hydrogène formées par un macrocycle **V.8 A**

Dans le cristal, quatre macrocycles s'assemblent pour former une pseudo-cage à base carrée (**figure V.5**, en bleu) emprisonnant huit molécules d'eau dont six sont directement reliées par liaisons hydrogène aux carbonyles urée des cycles. La septième molécule d'eau est reliée à deux autres par liaison hydrogène. Une molécule d'acétonitrile (en rose sur la **figure V.5**) est également présente à l'intérieur des cages où elle réalise une liaison hydrogène avec une huitième molécule d'eau qui est elle-même liée à un macrocycle. D'autres molécules d'acétonitrile sont à l'extérieur de la cage et participent à la cohésion de la structure.

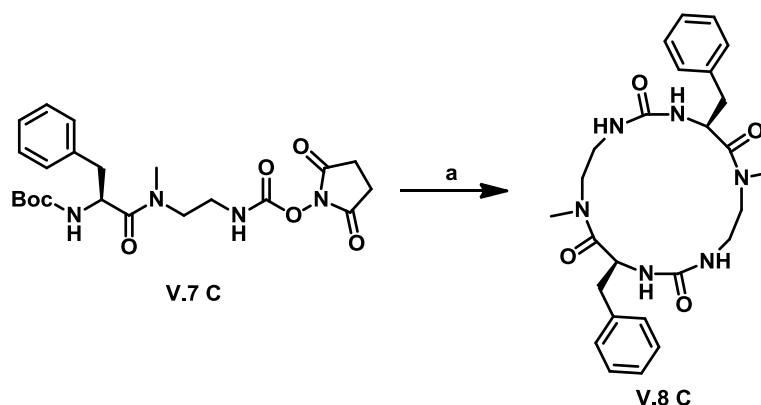


**Figure V.5** : Réseau de liaisons hydrogène intermoléculaires entre les macrocycles **V.8 A** dans le cristal.

Les cages s'empilent les unes sur les autres donnant ainsi une structure tubulaire. Cette structure compacte pourrait expliquer les signaux larges vus sur le spectre RMN de **V.8 A** (**figure V.2**, rouge, page 161).

Nous avons enfin évalué l'influence du relâchement des contraintes imposées par le cycle pyrrolidine sur la réaction de cyclisation. Pour le carbamate **V.7 C**, le cycle pyrrolidine est remplacé par un monomère *N*-méthyl-éthylène diamine achiral dérivé de la sarcosine. Comme observé précédemment pour **V.7 A**, la cyclisation du carbamate **V.7 C** a conduit exclusivement au dimère cyclique **V.8 C** avec un rendement de 30 % (**schéma V.6**).

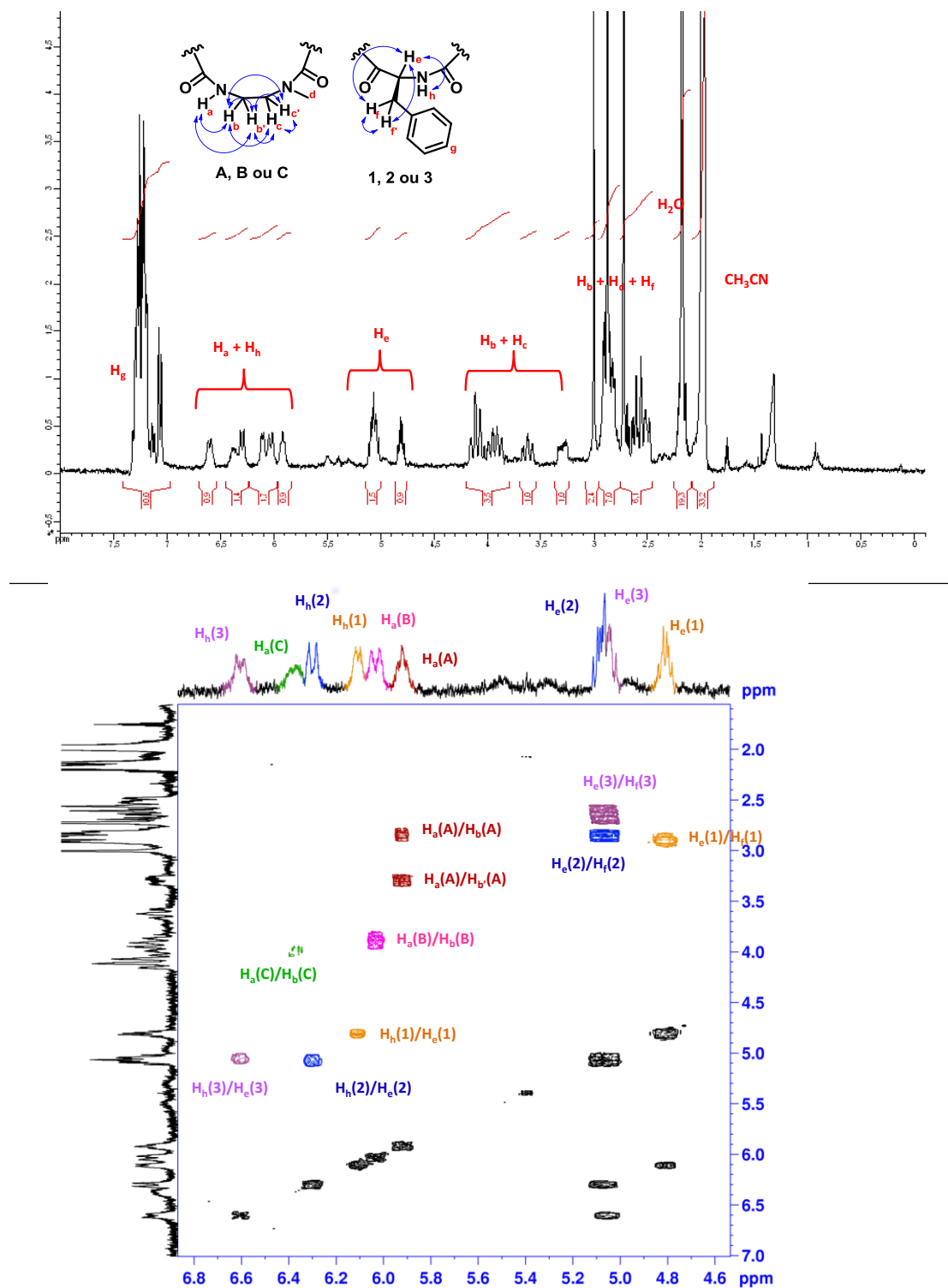




a) (i) TFA, 0°C, 30 min, (ii) DIEA (2 éq.), CH<sub>3</sub>CN, TA, 3h

**Schéma V.6** : cyclisation du carbamate dérivant de Boc-L-Phe-Sar-OH

L'analyse des spectres <sup>1</sup>H RMN 1D et 2D COSY (0,8 mg.ml<sup>-1</sup>, CD<sub>3</sub>CN, 300 MHz) du composé **V.8 C** révèle la présence possible de trois conformères en échange lent (**figure V.6**). Sur le spectre 1D, trois grands singulets sont visibles entre 2,7 et 3 ppm, ces signaux correspondent au méthyle porté par l'azote, de même, six ou sept signaux correspondant à des NH sont visibles entre 5,8 et 6,8 ppm. Etant donné la présence de la fonction carboxamide, les protons *N*-méthyléthylène diamine (H<sub>a</sub>, H<sub>b</sub>, H<sub>c</sub>, H<sub>d</sub>) ne sont pas corrélés aux protons dérivant de la phénylalanine (H<sub>e</sub>, H<sub>f</sub>, H<sub>g</sub>, H<sub>h</sub>) sur le spectre COSY. Nous sommes donc en présence de six jeux de signaux indépendants. Une expérience ROESY sera nécessaire pour réaliser l'attribution complète. Pour faciliter la lecture du spectre COSY, les signaux des protons *N*-méthyléthylène diamine (H<sub>a</sub>, H<sub>b</sub>, H<sub>c</sub>, H<sub>d</sub>) seront notés appartenant aux molécules A, B et C et les protons de la phénylalanine (H<sub>e</sub>, H<sub>f</sub>, H<sub>g</sub>, H<sub>h</sub>) seront notés appartenant aux molécules 1, 2 et 3.



**Figure V.6** : spectres RMN  $^1\text{H}$  (haut) et détail du spectre COSY (bas) du composé **V.8 C** (0,8  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $\text{CD}_3\text{CN}$ , 300 MHz)

D'après le spectre COSY, pour la molécule A (rouge), le proton  $\text{H}_a(\text{A})$  couple avec les deux protons  $\text{H}_b(\text{A})$  et  $\text{H}_{b'}(\text{A})$ . En revanche, pour les deux autres conformères (B, rose et C, vert),

les protons  $H_a$  ne couplent qu'avec un seul  $H_b$ , ce qui laisse à penser que l'angle dièdre entre les protons  $H_a$  et  $H_b$  est d'environ  $90^\circ$  pour les conformères B et C.

D'après les spectres RMN de la **figure V.2**, il n'existe pas plusieurs conformères pour les cycles **V.8 A** et **V.8 B**. Il semblerait que les résidus pyrrolidines bloquent les macro-cycles dans une seule conformation.

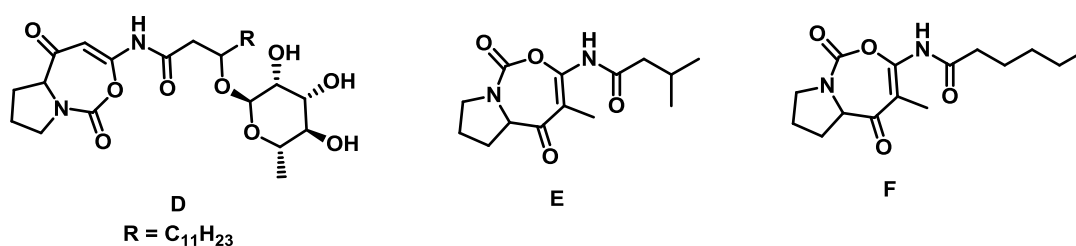
Ces exemples montrent que la formation du cycle à 8 chaînons n'est thermodynamiquement pas favorisée par rapport au cycle à 7 chaînons. Ceci conduit à l'oligomérisation (dimérisation et trimérisation) et à l'obtention de macrocycles à 16 et 24 chaînons. Nous avons observé précédemment que la liaison urée peut dévier de manière significative de la planéité dans des cycles contraints (comme dans le cas du **cyclo(Aib-gPro-CO)**, composé (**A2, B28**) **figure III.14, chapitre III**), néanmoins, cela ne suffit pas à contrebalancer la forte contrainte géométrique imposée par la formation du cycle à 8 chaînons. Pour favoriser une géométrie propice à la fermeture du cycle, nous avons finalement choisi de remplacer la fonction urée par une fonction carbamate et d'évaluer la formation d'hétérocycles de type 1,3,6-oxadiazocane-2,5-dione

### III. Cycles de type 1,3,6-oxadiazocane-2,5-dione

Les peptides sont considérés comme un point de départ intéressant dans le cadre de la recherche de molécules biologiquement actives mais leur faible biodisponibilité, leurs sensibilités à l'hydrolyse enzymatique ainsi que leurs faibles vitesses de pénétration dans le milieu intracellulaire rendent difficile leur utilisation comme composés à visée thérapeutique.<sup>234</sup> Pour pallier à ces difficultés, des composés peptidomimétiques possédant des fonctions amides tertiaires,<sup>235</sup> urées,<sup>236</sup> carbamates,<sup>237</sup> sulfonamides,<sup>238</sup> ou bien azatides<sup>239</sup> ont été synthétisés. Au cours des années 1960, la fonction carbamate a notamment été utilisée comme liaison entre les nucléosides afin de former des analogues d'oligonucléotides résistant aux dégradations enzymatiques.<sup>240</sup>

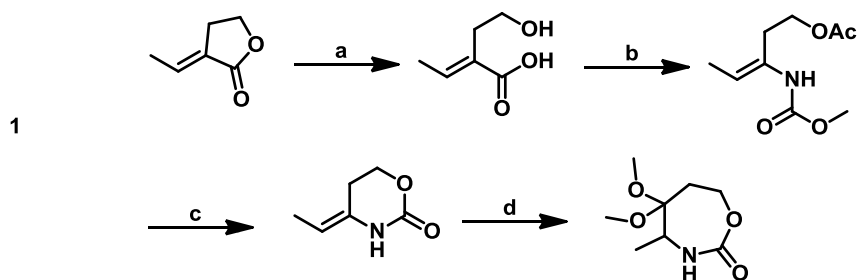
De manière similaire, les oligocarbamates peptidomimétiques inventés par Peter Schultz sont plus hydrophobes et plus résistants à l'hydrolyse que leurs homologues peptidiques,<sup>237a</sup> et ils ont montré des activités biologiques intéressantes. Par exemple, des oligocarbamates linéaires et cycliques ont été développés comme ligands pour la thrombine<sup>241</sup> (protéine de la

coagulation sanguine), de l'intégrine GPIIb/IIIab<sup>242</sup> (récepteur transmembranaire intervenant lors de la coagulation sanguine) ou encore de la cathépsine K<sup>243</sup> (protéine dégradant le collagène, impliquée dans l'ostéoporose). Ils ont également été développés comme vecteurs pour traverser les membranes et transporter des molécules actives.<sup>244</sup> Des carbamates cycliques, à sept chaînons et dérivés d'acides aminés, d'origine naturelle ont également fait preuve d'une activité biologique intéressante. Par exemple, le composé **D (figure V.7)** extrait d'une bactérie (*Pseudomonas fluorescens*) est un inhibiteur de LpPLA<sub>2</sub> (phospholipase A<sub>2</sub> non sécrétées hydrolysant les lipoprotéines de faible densité) possédant une IC<sub>50</sub> de 400 nM.<sup>245</sup> De même, les composés **E** et **F (figure V.7)** sont extraits d'une autre bactérie (*Streptoverticillium*) et inhibent la germination de graines de laitue.<sup>246</sup>

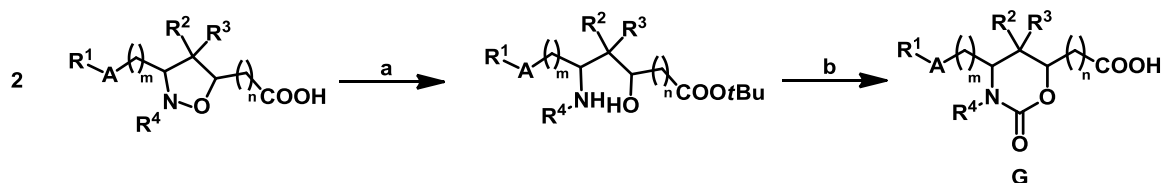


**Figure V.7** : exemples de carbamates cycliques possédant une activité biologique

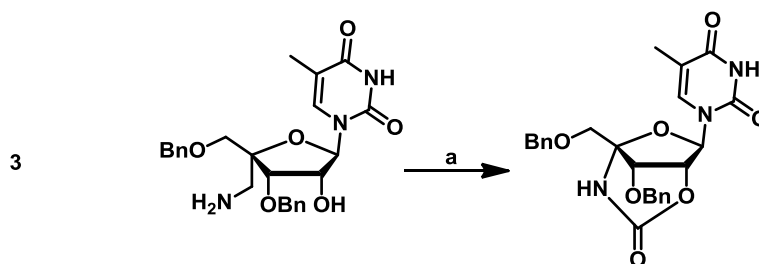
Très souvent, les oligocarbamates cycliques sont des macrocycles résultant de la cyclisation de trimères ou tétramères.<sup>242</sup> Néanmoins, il existe des voies de synthèse permettant l'obtention de cycles à sept ou huit chaînons (**schéma V.7**).



a) hydrolyse basique, b) (i) anhydride acétique, pyridine, (ii) EtOCOCl, TEA, NaN<sub>3</sub>, (iii) réarrangement de Curtius, (iv) MeOH, c) (i) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> aq., (ii) NaH, d) Ti(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, MeOH, rdt global = 28 %<sup>247</sup>



a) (i) *t*Bu-*N,N'*-diisopropylcarbadiimide, CuCl, (ii) Zn/HOAc, b) (i) CDI (1,1'-Carbonyldiimidazole) ou phosphgène, THF, (ii) TFA<sup>248</sup>



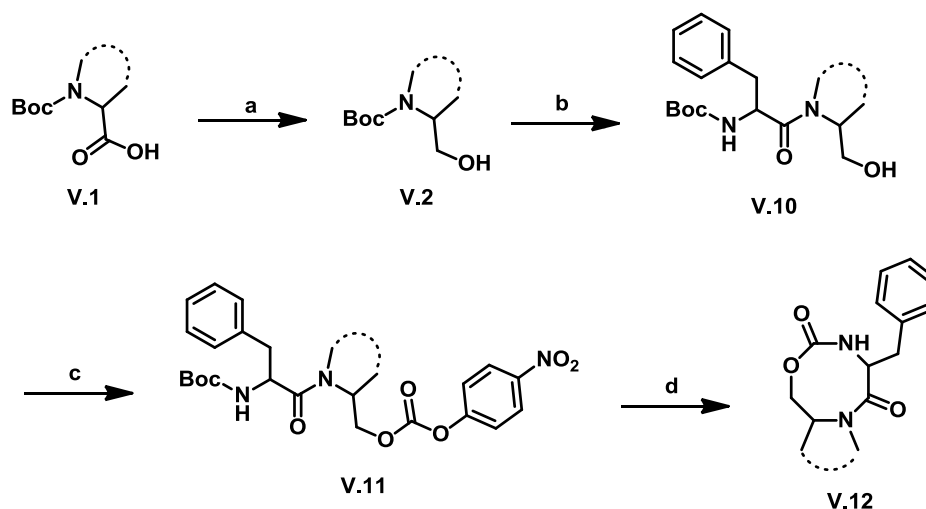
a) (i) chloroformiate de *p*-nitrophényle, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (ii) DIEA, TA, 62 %<sup>249</sup>

### Schéma V.7 : exemples de synthèse de carbamates cycliques à sept ou huit chaînons

Les composés de type **G** (équation 2, **schéma V.7**) sont protégés par un brevet déposé par Du Pont Pharmaceuticals en 2000. Ces composés sont des antagonistes du complexe récepteur fibrinogène IIb/IIIa de glycoprotéine de plaquettes (complexe intervenant lors de la cascade de coagulation) et pourraient devenir des anti-agrégants plaquettaires.

Plusieurs approches peuvent être envisagées pour accéder au cycle 1,3,6-oxadiazocane-2,5-dione. Par exemple, le cycle peut être fermé par formation d'un lien amide ou bien d'un lien carbamate. C'est cette dernière approche qui a été retenue en prenant avantage de la conformation cisoïde au niveau de la liaison amide pour favoriser la cyclisation. La liaison carbamate sera formée par réaction d'une amine sur un carbonate activé lui-même obtenu par réaction d'un alcool sur le chloroformiate de *p*-nitrophényle (**schéma V.8**).<sup>250</sup> Le

précurseur envisagé est le carbonate de *p*-nitrophénol<sup>237a</sup> **V.11** obtenu en une étape à partir du dipeptide alcool *N*-Boc protégé **V.10**.

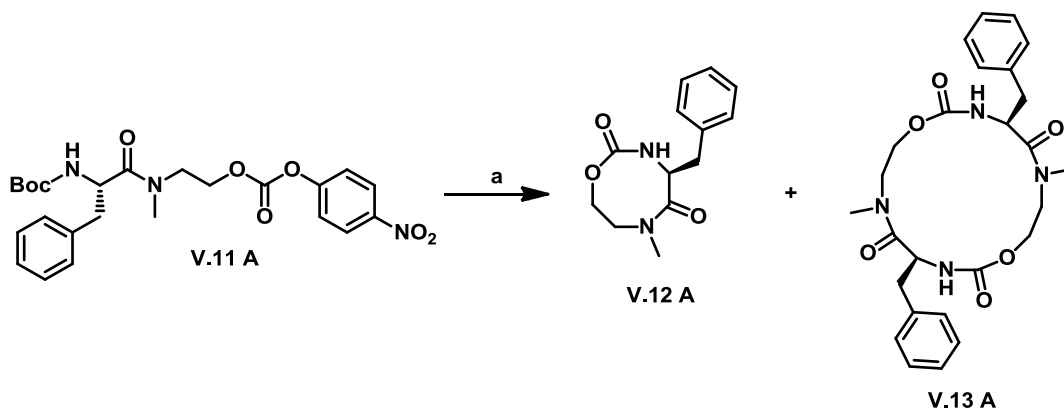


a) (i) *i*BuOCOCl (1,2 éq.), NMM (1,2 éq.), THF, -15°C, 30 min, (ii) NaBH<sub>4</sub> (2 éq.), H<sub>2</sub>O, 0°C, 16h, b) (i) TFA, 0°C, 30 min, (ii), HOBt (1,2 éq.), EDC (1,2 éq.), DIEA (3 éq.), Boc-Phe-OH (1,2 éq.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TA, 4h, c) chloroformate de *p*-nitrophényle (2 éq.), pyridine (1,1 éq.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TA, une nuit, d) (i) TFA, 0°C, 30 min, (ii) DIEA (2 éq.), HOBt (1 éq.), CH<sub>3</sub>CN, TA, 3j

### **Schéma V.8** : synthèse générale de 1,3,6-oxadiazocane-2,5-diones

La première étape est donc la synthèse du dipeptide alcool **V.10** qui est obtenu par couplage d'un acide aminé *N*-Boc protégé sur le β-amino alcool *N*-alkylé en présence d'1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) et d'HOBt. Le précurseur carbonate de *p*-nitrophényle **V.11** est formé par réaction de deux équivalents de chloroformate de 4-nitrophényle sur la fonction alcool du dipeptide **V.10** en présence 1,1 équivalent de pyridine. Après élimination du groupement Boc par du TFA, la cyclisation est réalisée en milieu basique dilué comme dans le cas des 1,3,5-triazépane-2,6-diones mais en ajoutant de l'HOBt pour catalyser la réaction, celle-ci étant plus lente que dans le cas d'un carbamate activé. Trois précurseurs carbonate de *p*-nitrophényle ont été préparés par couplage de Boc-Phe-OH (L ou D) sur l'alcool dérivé de la sarcosine ou de la proline avec des rendements d'activation compris entre 37 % et 59 %.

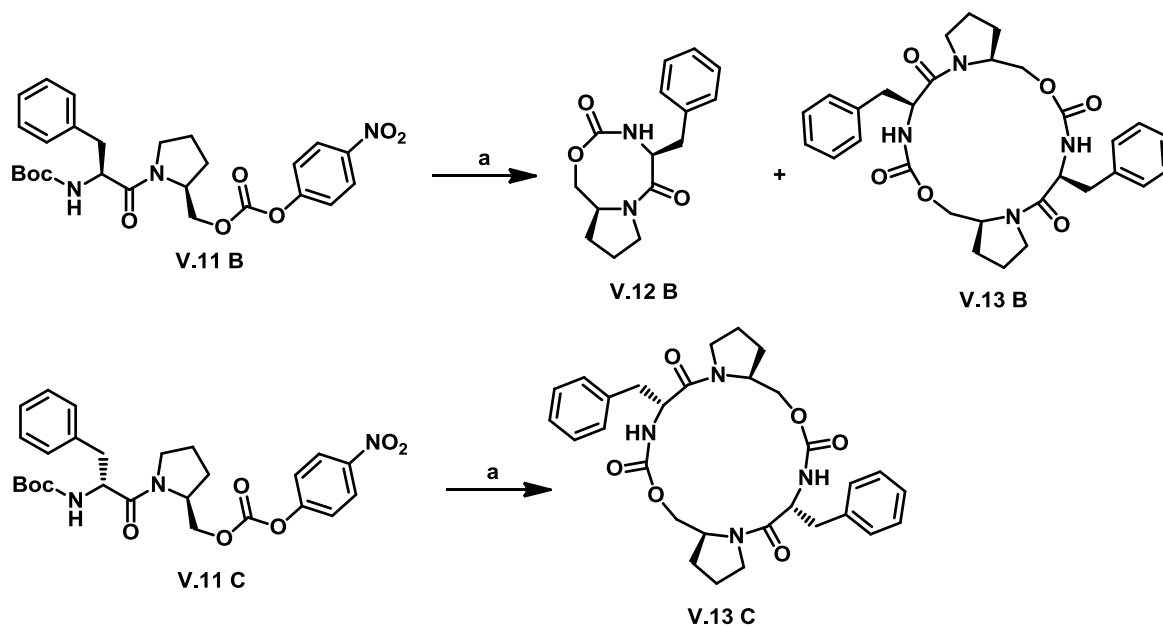
La réaction de cyclisation du composé **V.11.A** a conduit à la formation du monomère cyclique souhaité **V.12 A** avec un rendement de 39 % (**schéma V.9**). Lors de cette synthèse, le dimère cyclique **V.13 A** est également formé et a été isolé avec un rendement de 20 %.



a) (i) TFA, 0°C, 30 min, (ii) DIEA (2 éq.), HOBT (1 éq.), CH<sub>3</sub>CN, TA, 3j, rdt : 39 % (V.12 A), 20 % (V.13 A)

**Schéma V.9** : synthèse de 4-benzyl-6-méthyl-[1,3,6]-oxadiazocane-2,5-dione

Dans le cas de la séquence L-phénylalaninyl-L-prolinol, le monomère cyclique V.12 B ainsi que le dimère cyclique V.13 A ont été isolés avec des rendements de 30 % et 7 % respectivement tandis que dans le cas de la séquence hétérochirale correspondante V.11 C, seul le dimère cyclique V.13 C a été obtenu avec un rendement de 13 % (schéma V.10).



a) (i) TFA, 0°C, 30 min, (ii) DIEA (2 éq.), HOBT (1 éq.), CH<sub>3</sub>CN, TA, 3j, rdt : 30 % (V.12 B), 7 % (V.13 B) 13% (V.13 C)

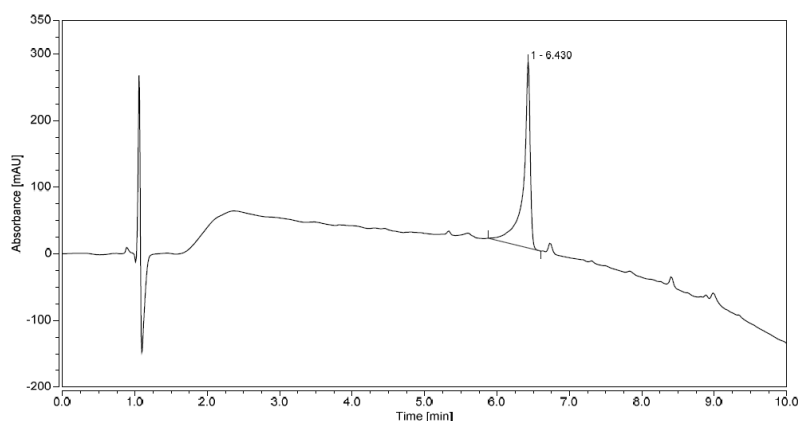
**Schéma V.10** : cyclisation des carbonates de chiralité de p-nitrophénol chiraux

La comparaison des rendements des trois réactions (tableau V.3) met en évidence le rôle de la proline et de l'encombrement stérique lors de la cyclisation.

carbonates	composés V.12	composés V.13	V.12 / V.13 (%)
V.11 A	A rdt = 39 %	A rdt = 20 %	66
V.11 B	B rdt = 30 %	B rdt = 7 %	81
V.11 C	-	C rdt = 13 %	-

**Tableau V.3** : Comparaison des rendements de cyclisation en vue de l'obtention des squelettes 1,3,6-oxadiazocane-2,5-dione

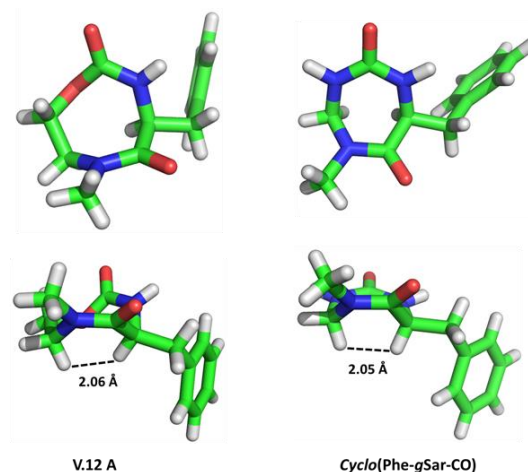
La présence de la proline semble augmenter la proportion de monomère cyclique puisque l'on passe d'un ratio monomère cyclique sur dimère cyclique de 66 à 81 % en remplaçant le  $\beta$ -amino alcool dérivé de la sarcosine par celui dérivé de la proline. En effet, il est possible que le cycle pyrrolidine avec un angle dièdre C(O)-N-CH-CH<sub>2</sub> autour de 90° pré-organise le précurseur dans une conformation plus favorable à la réaction intramoléculaire. En revanche, la cyclisation semble sensible à la stéréochimie puisque la séquence hétérochirale correspondante ne permet pas la formation du monomère cyclique. En effet, d'après le chromatogramme HPLC du brut réactionnel, **figure V.8**, seul le dimère cyclique a été obtenu (avec le même gradient que celui de la **figure V.8**, le monomère cyclique **V.12 B** a un temps de rétention de 4,97 min et le dimère **V.13 B** a un temps de rétention de 6,90 min).



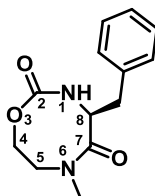
**Figure V.8** : chromatogramme HPLC (C<sub>18</sub>-HPLC (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 10-100% B, 1 mL/min, 10 min)) du brut réactionnel issu de la cyclisation de **V.11 C** après traitement acido-basique

L'analyse par diffraction des rayons X de cristaux du composé **IV.12 A** a permis l'obtention de la structure cristallographique de ce dernier (**figure V.9**, à gauche). L'hétérocycle cristallise dans le groupe d'espace P2<sub>1</sub>.





**Figure V.9** : structures cristallographiques du composé **V.12 A** et de son analogue triazépanedione **cyclo(Phe-gSar-CO)**



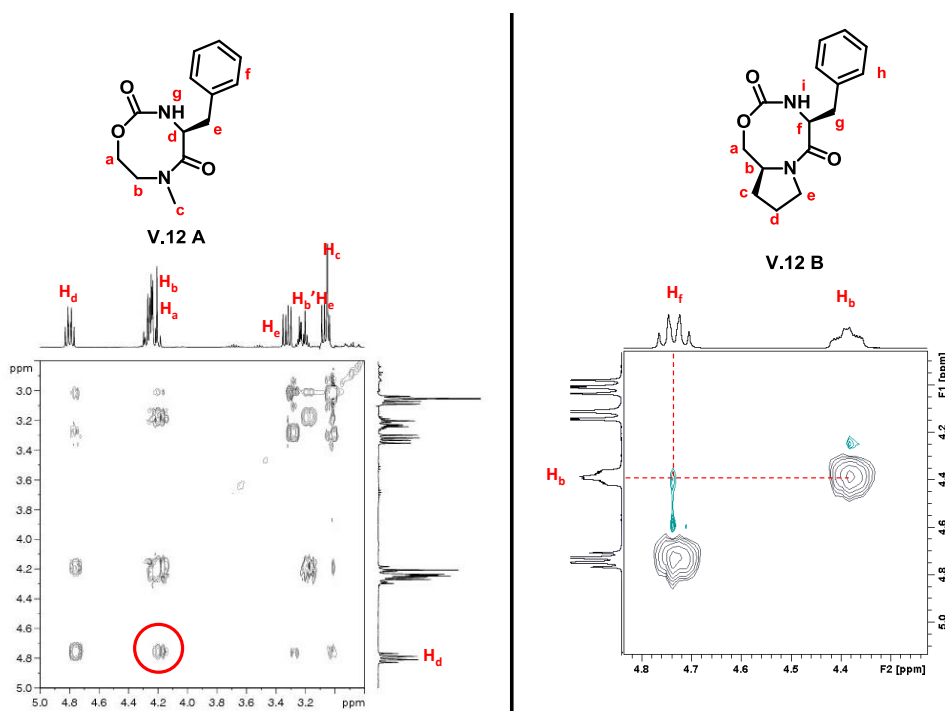
	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>6</sub>	T <sub>7</sub>	T <sub>8</sub>
<b>V.12 A</b>	-12,24	93,01	-90,35	78,00	-83,28	16,80	78,58	-85,84

T<sub>1-8</sub> angles de torsion associés aux séquences C8-N1-C2-O3, N1-C2-O3-C4, C2-O3-C4-C5, O3-C4-C5-N6, C4-C5-N6-C7, C5-N6-C7-C8, N6-C7-C8-N1, C7-C8-N1-C2.

**Tableau V.4** : angles dièdres de **V.12 A**

Les deux molécules présentent des similarités conformationnelles intéressantes. Dans les deux structures cristallographiques, on observe une orientation quasi-équatoriale de la chaîne latérale. Par ailleurs, la distance interatomique très courte entre les protons des carbones en position 5 et 8 (2.06 Å) est similaire à celle observée dans les 1,3,5-triazépane-2,6-diones entre les protons αCH Xaa et gXbb (environ 2.1 Å). Toutefois la différence entre les deux composés **V.12 A** et **cyclo(Phe-gSar-CO)** est manifeste au niveau des groupes urée et carbamate avec un angle de torsion T<sub>2</sub> (NH-CO-O-CH<sub>2</sub>) de 93° dans **V.12 A** largement différent de l'angle dièdre (NH-CO-NH-CH<sub>2</sub>) au niveau de l'urée dans le composé **cyclo(Phe-gSar-CO)** (-2°). Cette géométrie particulière du carbamate due à la flexibilité du lien CH<sub>2</sub>-O-CO est l'élément permettant la formation du monomère cyclique.

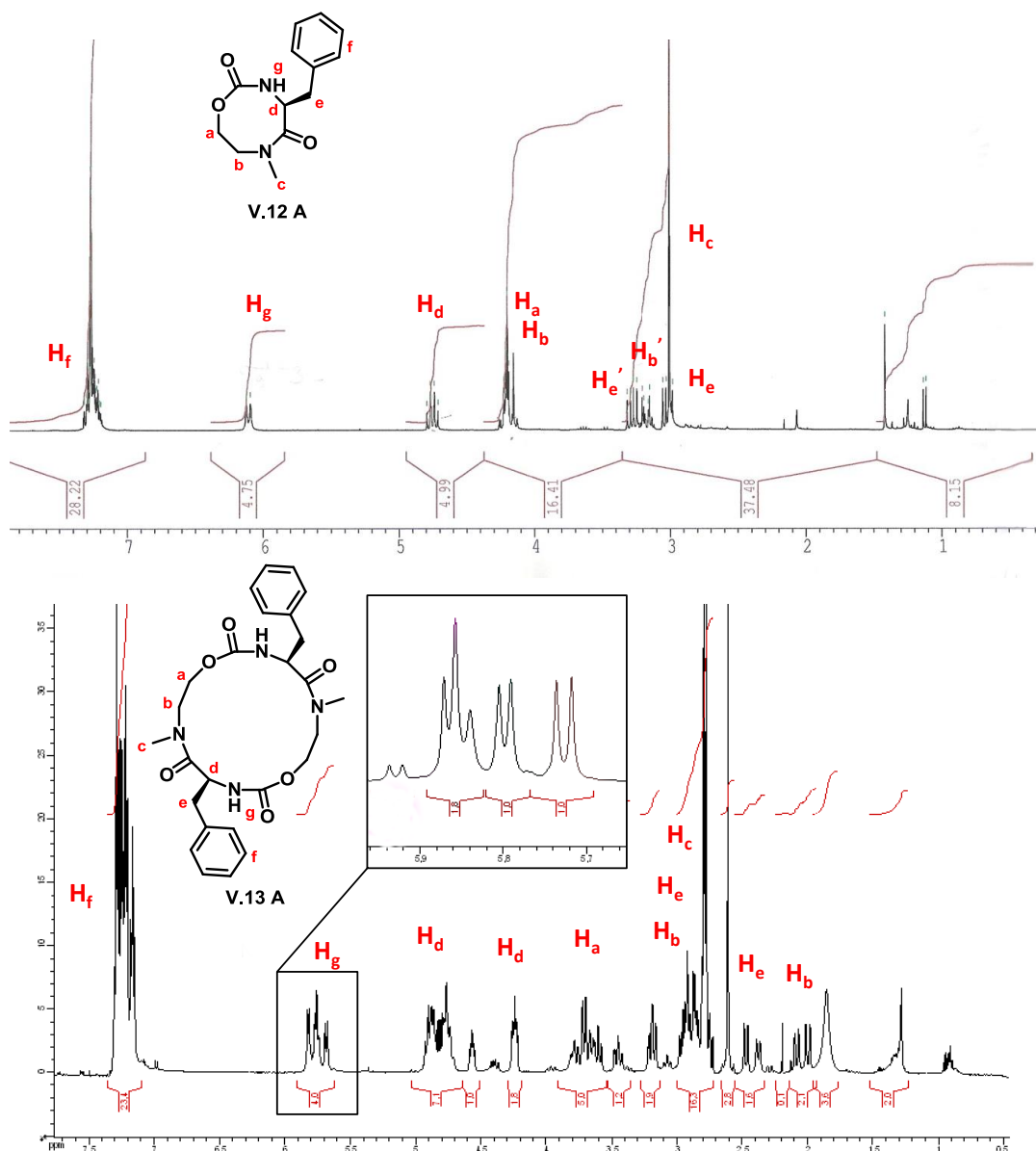
En accord avec la courte distance observée entre les protons des carbones en position 5 et 8 dans la structure RX de **V.12 A**. Le spectre ROESY du composé **V.12 A** ( $\text{CDCl}_3$ ) fait apparaître une corrélation entre un proton  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$  et le proton  $\text{NHCHCO}$  pour le composé **V.12 A** (figure V.10).



**Figure V.10** : spectres ROESY des composés **V.12 A** (gauche) et **V.12 B** (droite)

Le composé **V.12 B** n'a pas été cristallisé mais d'après le spectre ROESY, un couplage similaire entre les protons  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$  ( $\text{H}_b$ ) et  $\text{NHCHCO}$  ( $\text{H}_f$ ) suggère que la distance entre ces deux atomes est courte et donc que les structures des composés **V.12 A** et **V.12 B** doivent être semblables.

A ce jour, nous n'avons pas pu obtenir de cristaux des dimères cycliques, cependant nous avons tenté d'analyser ces composés par RMN, notamment les macrocycles **V.13 A** et **V.13 B**. Alors que le cycle **V.12 A** présente un spectre RMN très simple avec une excellente dispersion dans le chloroforme (figure V.11), le spectre  $^1\text{H}$  de **V.13 A** est beaucoup plus compliqué avec apparemment plusieurs espèces (au moins 4) en équilibre lent. Cet échange lent entre plusieurs espèces est confirmé par la présence de nombreux pics d'échanges entre ces différentes espèces dans le spectre COSY correspondant.

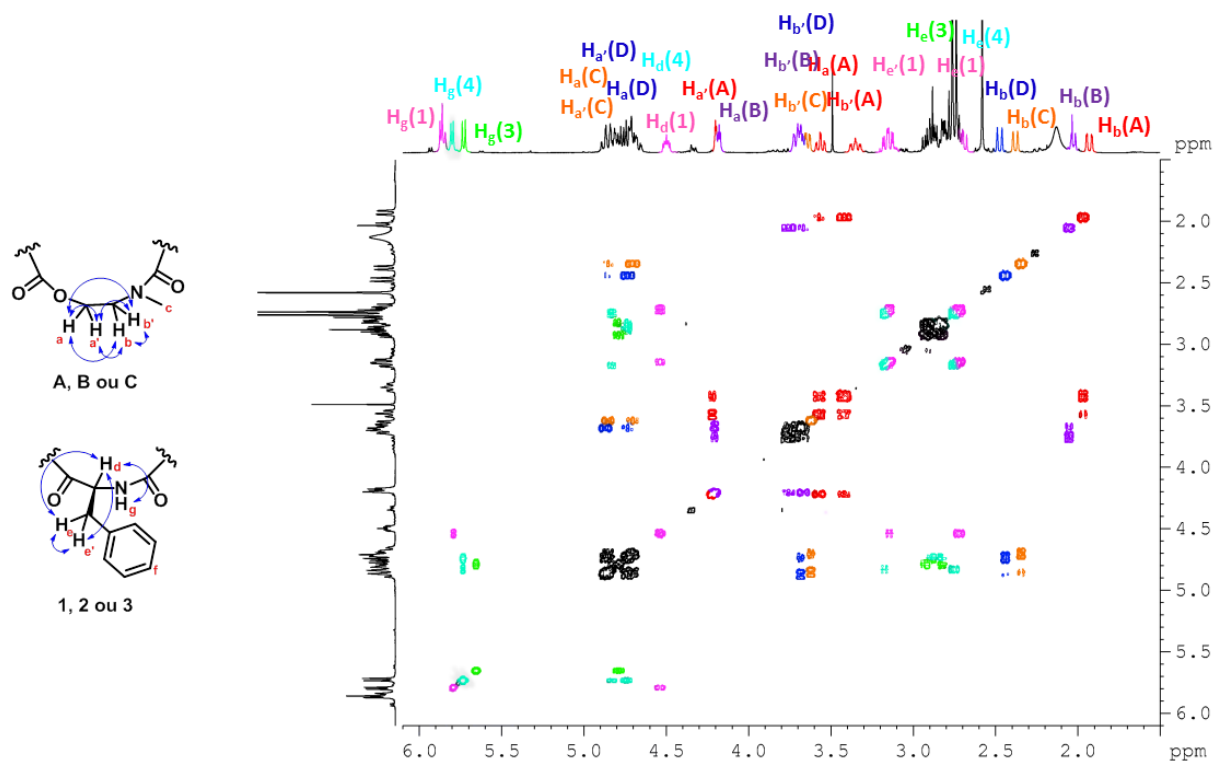


**Figure V.11** : comparaison des spectres RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz, 298 K,  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) des composés **V.12 A** et **V.13 A**

Huit jeux de signaux majoritaires indépendants correspondant à quatre conformères du composé **V.13 A** sont visibles sur le spectre COSY (**figure V.13**).

Pour faciliter la lecture du spectre COSY, les signaux des protons *N*-méthylaminoéthyl carbamate ( $\text{H}_a$ ,  $\text{H}_b$ ,  $\text{H}_c$ ,  $\text{H}_d$ ) sont indiqués par des couleurs différentes pour chacune des 4 espèces majoritaires en échange (espèce A, B, C et D respectivement en rouge, violet orange et bleu). Il en est de même pour les protons ( $\text{H}_e$ ,  $\text{H}_f$ ,  $\text{H}_g$ ,  $\text{H}_h$ ) du résidu phénylalanine dont les signaux correspondant aux espèces 1-4 sont notés respectivement en rose, vert et turquoise.

D'après les intégrations du spectre **V.13 A** (figure V.11), les conformères sont présents en ratio 1 : 1 : 1 : 1.

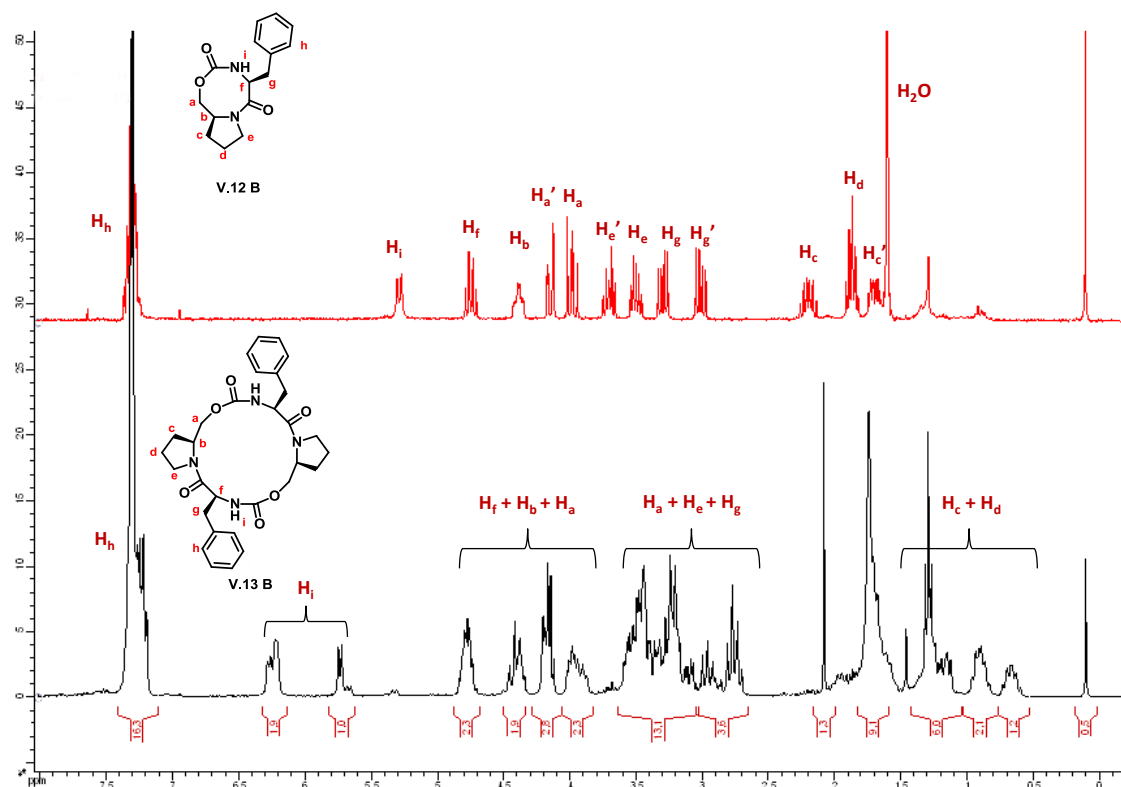


**Figure V.12** : détail du spectre COSY entre 1,5 et 6,3 ppm du dimère cyclique **V.13 A** ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz,  $1 \text{ mg.ml}^{-1}$ )

Lorsque trop de signaux sont superposés, les taches sont en noir. Pour tous les composés, on peut remarquer la forte diastéréotopie des protons  $H_a$ ,  $H_b$  et  $H_e$  due à la contrainte imposée par le cycle. On remarque que le signal correspondant au signal  $H_g$  turquoise corrèle avec deux  $H_d$  différents, il y a donc deux composés associés à la couleur turquoise. Or d'après le spectre 1D (figure V.11, bas), le signal correspondant au proton  $H_g$  turquoise (5,80 ppm) n'intègre que pour un proton. De même, le proton  $H_g$  rose (5,86 ppm) intègre pour deux protons sur le spectre 1D mais ne présente qu'un jeu de corrélation sur le spectre COSY. Le spectre COSY a été mesuré trois jours après le spectre proton 1D, ces expériences prouvent l'évolution lente de l'équilibre des conformères.

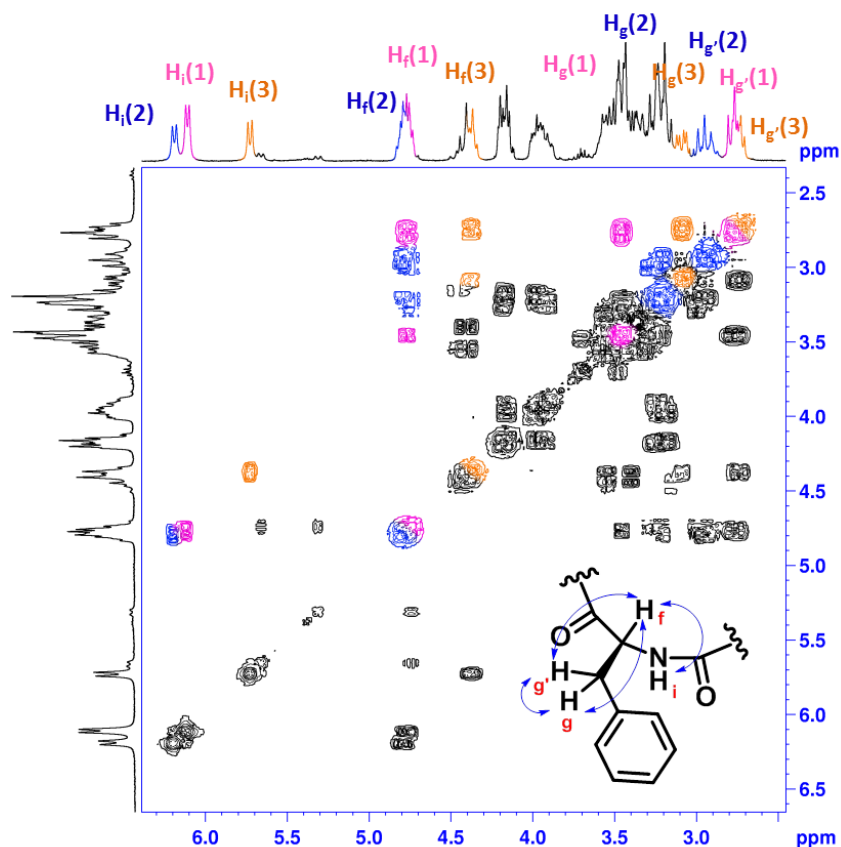
Les mêmes constatations entre monomère et dimère cyclique peuvent être faites sur les composés **V.12 B** et **V.13 B** (figure V.13). Le spectre RMN du proton de **V.12 B** est bien défini

(CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, 298 K) alors que celui de **V.13 B** présente des signaux multiples pouvant correspondre à plusieurs conformères en échange lent.



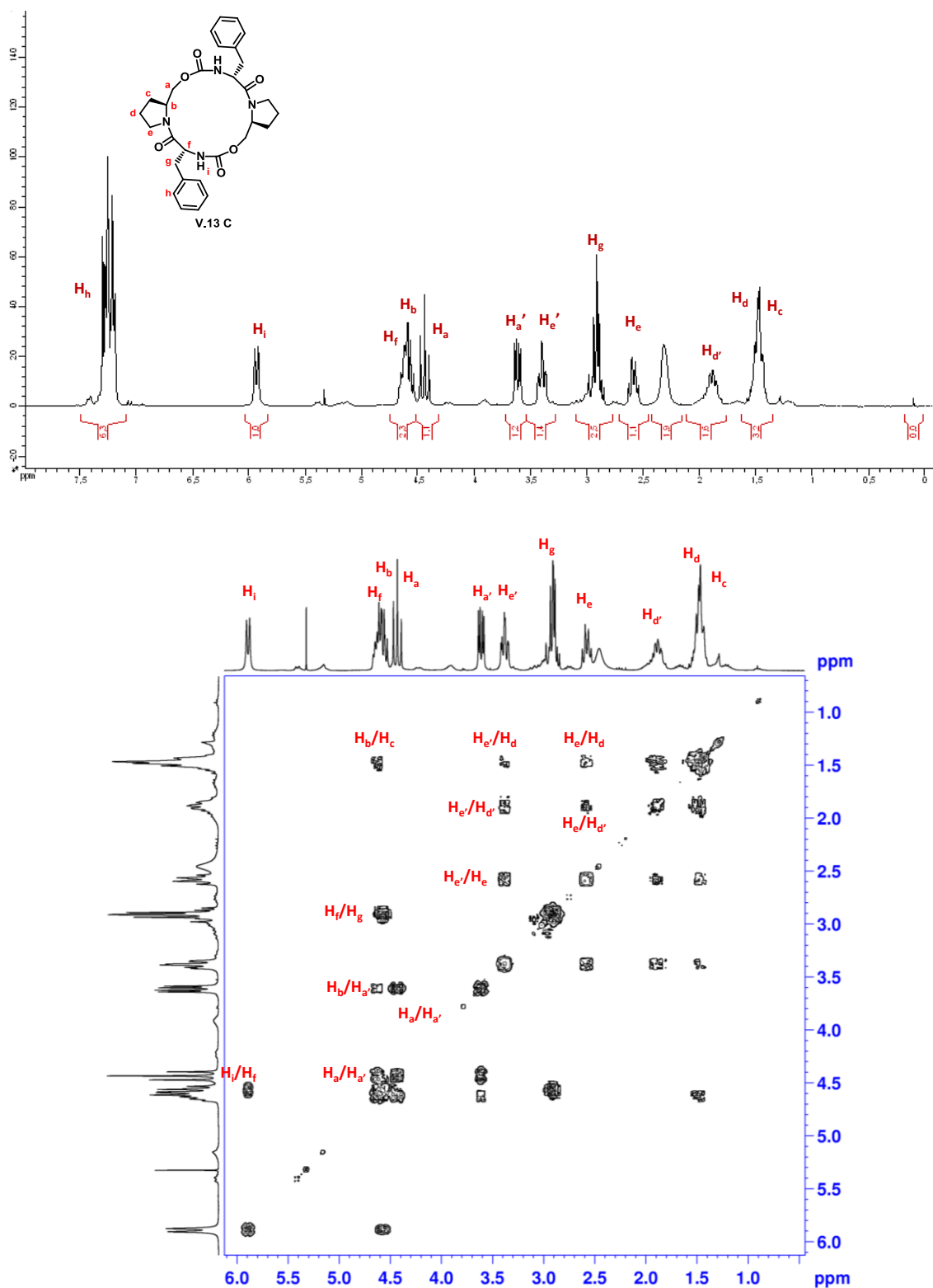
**Figure V.13** : comparaison des spectres RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, 298 K, 1 mg.ml<sup>-1</sup>) des composés **V.12 B** et **V.13 B**

Les intégrations des signaux du composé **V.13 B** correspondant aux NH (H<sub>i</sub>) entre 5,5 et 6,5 ppm permettent d'affirmer l'existence de trois conformères majoritaires de ratio 1 : 1 : 1 et d'un conformère minoritaire de ratio 0,3. L'analyse du spectre COSY (**figure V.14**) permet de confirmer l'existence des trois conformères majoritaires. La superposition de nombreux signaux rend l'identification des conformères très difficile. Néanmoins, les trois jeux de signaux des protons dérivants de la phénylalanine des conformères majoritaires ont pu être identifiés (en rose, bleu et orange) (**figure V.14**).



**Figure V.14** : détail du spectre COSY ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz, 298 K,  $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) du composé **V.13 B**

De même que pour les macrocycles possédant des fonctions urées (**V.8 A** et **V.8 B**), le macrocycle **V.13 C**, analogue de **V.13 B** issu d'une séquence hétérochirale, a un comportement différent en solution. Le spectre RMN de **V.13 C** (figure **V.15**) ne présente qu'un seul signal dans cette zone ce qui suggère la présence d'un conformère majoritaire unique. Cette constatation est confirmée par l'analyse du spectre COSY (figure **V.15**).



**Figure V.15** : spectre RMN proton et détail du spectre COSY du composé **V.13 C** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, 298 K, 1 mg.ml)

La seule différence existante entre les composés **V.13 B** et **V.13 C** est la stéréochimie du carbone asymétrique : le composé **V.13 B** est (*S*) tandis que le composé **V.13 C** est (*R*). Les peptides cycliques sont connus pour exister sous différentes conformations en solution à cause de l'isomérisation *cis/trans* de la liaison peptidique et plus particulièrement les peptides contenant des dérivés prolines. En 2012, l'équipe de Christian Lücke a montré que la présence de deux acides aminés (*D*) et de deux prolines dans un hexapeptide cyclique entraînait une préférence envers la forme *cis/cis* des prolines.<sup>251</sup> Il est possible que la configuration du carbone asymétrique gêne l'isomérisation de la liaison amide et donc bloque la conformation du cycle.

#### IV. Conclusion

La synthèse d'hétérocycles analogues aux 1,3,5-triazépane-2,6-diones de taille supérieure a été explorée dans le but d'augmenter la diversité des cycles dérivés de précurseurs dipeptidiques. Nous avons montré que la formation de cycle à huit chaînons de type 1,3,6-triazocane-2,5-dione n'est pas favorable et que la réaction de cyclisation ne conduit qu'à la formation majoritaire de dimère cyclique à 16 chaînons mais également d'oligomères cycliques de plus grande taille. En revanche, le remplacement de la fonction urée par une fonction carbamate a permis la synthèse de cycles à 8 chaînons 1,3,6-oxadiazocane-2,5-dione. La formation parallèle de dimère cyclique est également observée. La formation du cycle 1,3,6-oxadiazocane-2,5-dione est sensible à la stéréochimie puisque la séquence hétérochirale formée à partir du précurseur issu de la séquence *D*-phénylalaninyl-*L*-prolinol n'a pas abouti à l'obtention du monomère cyclique. Il sera intéressant d'étendre ce travail aux cycles isostères de type 1,4-diazocane-2,5-dione dans lesquels l'oxygène est remplacé par une fonction CH<sub>2</sub>. Ces cycles dont la synthèse a récemment été décrite dans la littérature<sup>232</sup> devrait pouvoir adopter une conformation proche de celle observée dans la structure aux rayons X du composé 1,3,6-oxadiazocane-2,5-dione dérivé de la séquence *L*-phénylalaninyl-sarcosinol que nous avons obtenu.



**Chapitre VI : Evaluation biologique des 1,3,5-triazépane-2,6-**  
**diones**

## I. Travaux antérieurs : Criblage inverse et premières activités inhibitrices sur les sPLA2s

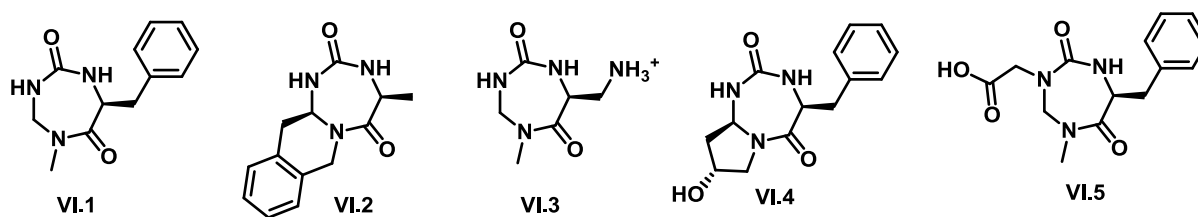
Le squelette 1,3,5-triazépane-2,6-dione est un châssis original présentant des propriétés pouvant laisser pressentir un intérêt pharmacologique :

- capacité de distribuer des pharmacophores variés dans l'espace,
- présence des fonctions amide et urée qui peuvent former des liaisons hydrogènes avec une cible,
- respect des règles de Lipinski pour la majorité des hétérocycles,
- ressemblance structurale à d'autres cycles à 7 membres contenant une fonction urée développés par l'industrie pharmaceutique (inhibiteurs de la protéase du VIH<sup>252</sup>, composé II.5, page 65).

Le squelette 1,3,5-triazépane-2,6-dione a été initialement développé sans application biologique connue, toutefois, plusieurs approches peuvent être envisagées pour identifier des cibles potentielles pour cette nouvelle famille de composés : (i) par analogie avec des molécules bioactives de structure voisine ; (ii) par ciblage à haut débit sur un échantillon représentatif de cibles d'intérêt ; (iii) par criblage virtuel inverse. C'est cette dernière approche qui a été retenue.

Trouver une cible à un ligand est une démarche moins conventionnelle en chimioinformatique que de trouver un ligand pour une cible connue.<sup>253</sup> Le principe du criblage inverse consiste en la construction du modèle tridimensionnel d'un petit nombre de ligands à cribler puis au "docking" de ces structures dans les sites actifs d'une collection de protéines cibles regroupées dans une base de données (par exemple, issues de la Protein Data Bank (PDB)).<sup>147</sup>

Précédemment, le groupe de Didier Rognan de l'université de Strasbourg a mis au point une méthode de criblage virtuel inverse ayant pour but l'identification d'une cible biologique pour les 1,3,5-triazépane-2,6-diones.<sup>147</sup> Initialement, une sélection de cinq hétérocycles (**figure VI.1**), choisis comme étant représentatifs de la diversité des 1,3,6-triazépane-2,6-diones, a été "dockée" à l'intérieur des sites actifs d'une collection de 2 148 protéines dont les structures sont issues dans la base de donnée PDB.



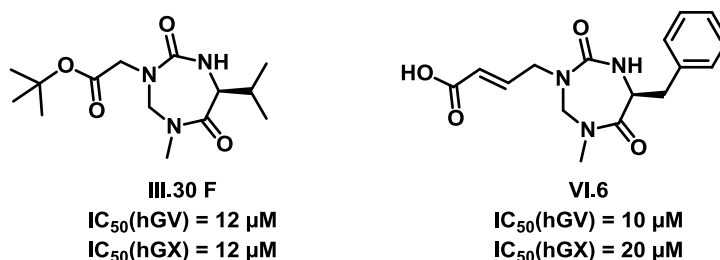
**Figure VI.1** : composés "dockés" dans les sites actifs des protéines de la base de données PDB

Sur les 2 148 protéines testées, les meilleurs scores ont été obtenus pour les neuf protéines suivantes qui s'avèrent être des cibles potentielles :

- l'aconitase (enzyme réalisant l'isomérisation stéréospécifique du citrate en isocitrate via le cis-aconitate),
- la D-amino oxydase (enzyme oxydant les acides aminés D en acides iminés),
- la lypopolysaccharide 3-*R*-galactosyl transférase (enzyme appartenant à la famille des glycosyltransférases et donc transférant un monosaccharide d'un sucre à une autre molécule),
- l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase (enzyme jouant un rôle lors de la synthèse de nucléotide de purine),
- l'œstrogène sulfotransférase (EST) (enzyme transférant un groupement sulfonate d'un œstrogène à un autre stéroïde),
- la méthionine aminopeptidase (MA) (enzyme catalysant la suppression du résidu *N*-terminal de la méthionine),
- les phospholipases A<sub>2</sub> sécrétées,
- la purine nucléoside phosphorylase (PNP) (enzyme clivant en nucléoside par phosphorylation du ribose),
- la thymidine kinase (TK) (enzyme jouant un rôle important lors de la synthèse de l'ADN).

Parmi ces enzymes, les quatre premières n'ont pas été testées *in-vitro* en raison du manque d'intérêt thérapeutique qu'elles représentent. Et parmi les cinq autres, seules les phospholipases A<sub>2</sub> sécrétées se sont révélées être des cibles biologiques réelles.<sup>148</sup> En 2006, sur les 26 hétérocycles synthétisés par Gersande Léna au cours de sa thèse plusieurs composés ont fait preuve d'une activité spécifique aux sPLA<sub>2</sub> hGV et hGX avec une IC<sub>50</sub> de

l'ordre de 10-30  $\mu\text{M}$  parmi lesquels **III.30 F** et **VI.6** (figure VI.2). De nouveaux résultats obtenus pendant mon travail de thèse remettent toutefois en question les activités de ces deux composés (voir section III, chapitre VI).



**Figure VI.2** : Composés de type 1,3,5-triazépane-2,6-dione identifiés comme inhibiteurs des sPLA<sub>2</sub> hGV et hGX

L'une des particularités des 1,3,5-triazépane-2,6-diones testées comme inhibiteurs de sPLA<sub>2</sub> vient de leur spécificité sur les sPLA<sub>2</sub> hGV et hGX. En effet, les composés **III.30 F** et **VI.6** ne sont pas actifs sur les sPLA<sub>2</sub> hGIB et hGIIA (**tableau VI.1**) qui sont les deux enzymes pour lesquelles le plus d'inhibiteurs ont été publiés.

	Activité enzymatique résiduelle en présence de 30 $\mu\text{M}$ de <b>III.30 F</b>	Activité enzymatique résiduelle en présence de 30 $\mu\text{M}$ de <b>VI.6</b>
sPLA <sub>2</sub> hGIB	95	98
sPLA <sub>2</sub> hGIIA	84	78
sPLA <sub>2</sub> hGV	11	11
sPLA <sub>2</sub> hGX	18	24

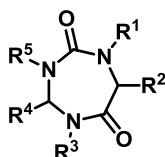
**Tableau VI.1** : activité enzymatique résiduelle en présence de 30  $\mu\text{M}$  sur quatre sPLA<sub>2</sub> d'origine humaine

Cette étude a donc montré que les 1,3,5-triazépane-2,6-diones sont des inhibiteurs spécifiques mais possédant une activité biologique encore faible. Plusieurs pistes ont été explorées pour tenter de trouver de nouveaux composés plus actifs, comme :

- le criblage systématique d'hétérocycles issus des chimiothèques présentées dans le chapitre III,
- la synthèse d'analogues des composés **III.30 F** et **VI.6**,
- l'incorporation de nouveaux pharmacophores sur **cyclo(Phe-gSar-CO)** (**VI.1**) pour une éventuelle complexation du calcium du centre actif,

- des études de docking de la collection des 1,3,5-triazépane-2,6-diones disponibles dans le site actif de la sPLA<sub>2</sub> hGX.

Au cours d'une étude relation structure/activité, le rôle de chaque groupement R (**figure VI.3**) sera observé afin de déterminer les substituants favorables à une augmentation de l'activité inhibitrice.



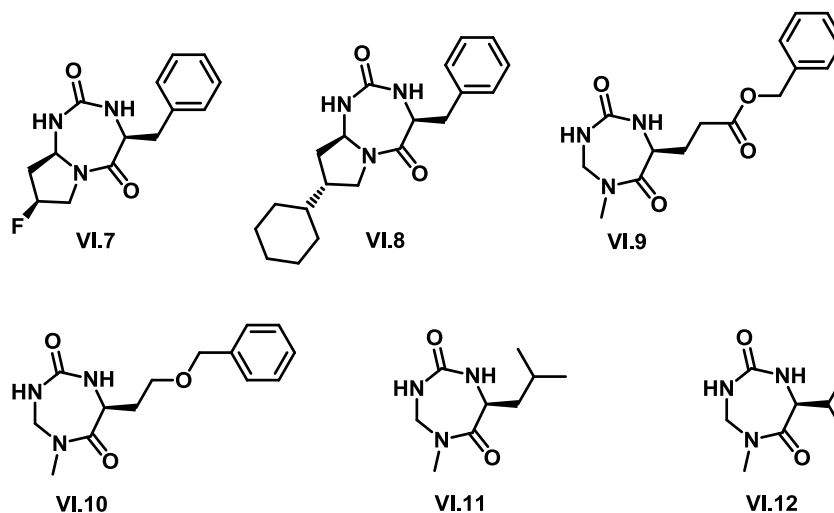
**Figure VI.3** : squelette 1,3,5-triazépane-2,6-dione

## II. Activité inhibitrices des 1,3,5-triazépane-2,6-diones sur les sPLA<sub>2</sub> hGV et hGX

### II.1. Evaluation biologique de composés issus des chimiothèques

#### II.1.a. Composés issus de la chimiothèque de 1,3,5-triazépane-2,6-diones sans diversification post-cyclisation

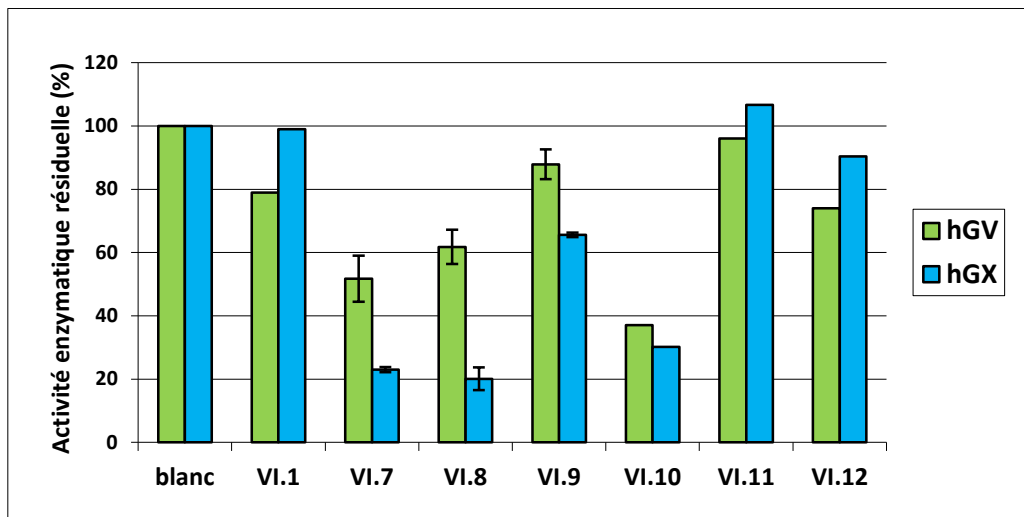
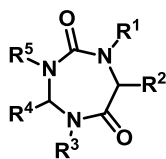
Sur les 109 hétérocycles issus de la chimiothèque de 1,3,5-triazépane-2,6-diones décrite au chapitre III, six ont été sélectionnés et testés sur les phospholipases A<sub>2</sub> hGV et hGX (**figure VI.4**)



**Figure VI.4** : hétérocycles issus de la chimiothèque de 1,3,5-triazépane-2,6-diones sélectionnés pour les tests enzymatiques

Les composés **VI.7** et **VI.8** ont été sélectionnés pour évaluer l'influence de la taille des groupements  $R^3$  et  $R^4$  sur l'inhibition des enzymes, les composés **VI.9** et **VI.10** permettront d'évaluer l'influence d'un groupement aromatique sur la position  $R^2$  à une distance plus importante que celle du composé **VI.6**. En se basant sur l'hypothèse que les hétérocycles 1,3,5-triazépane-2,6-diones se lient au site actif des sPLA<sub>2</sub> hGV et hGX, ces quatre composés (**VI.7**, **VI.8**, **VI.9**, **VI.10**) ont pour objectif de d'explorer les poches hydrophobes du site actif. Les composés **VI.11** et **VI.12** entrent quant-à-eux dans l'étude de relation structure/activité autour du composé **III.30 F** pour valider la nécessité de  $R^5 \neq H$ .

Les tests enzymatiques ont été réalisés avec une concentration d'inhibiteurs de 30  $\mu M$  sur les sPLA<sub>2</sub> hGV et hGX qui sont utilisées respectivement à des concentrations de 1 nM et de 0,2 nM dans le tampon (100 mM Tris, pH 8.0, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1% d'albumine de sérum bovin) (**diagramme VI.1**). Lorsque plusieurs tests ont été effectués, une barre d'erreur est visible sur le graphique.

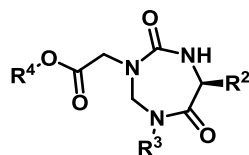


**Diagramme VI.1** : Inhibition des sPLA<sub>2</sub> hGV et hGX en présence de 1,3,5-triazépane-2,6-diones issues de la chimiothèque et testées à une concentration de 30  $\mu$ M

Les composés **VI.7** et **VI.8** sont plus actifs que le composé **VI.1** donc la présence d'un groupement important sur les positions R<sup>3</sup> et R<sup>4</sup> est favorable à l'inhibition. Concernant la différence entre les composés **VI.7** et **VI.8**, la sPLA<sub>2</sub> hGV semble avoir une préférence pour le fluor plutôt que pour le cyclohexyle. Le composé **VI.9** n'est pas actif sur la sPLA<sub>2</sub> hGV mais il possède une activité faible sur la sPLA<sub>2</sub> hGX au contraire de composé **VI.1**. La présence du carbonyle et du cycle aromatique à une position plus éloignée du cycle du composé **VI.1** est favorable à l'inhibition ce qui laisse supposer la formation de nouvelles interactions avec la protéine hGX. Cette observation est confirmée par la bonne activité du composé **VI.10** sur les deux enzymes. Les composés **VI.11** et **VI.12** ne sont pas du tout actifs. Le composé **VI.12** est un analogue du composé **III.30 F** mais avec R<sup>5</sup> = H au lieu du groupement acétate de tertiobutyle, la présence de ce groupement semble donc nécessaire à l'inhibition.

### II.1.b. Composés issus de la chimiothèque de 1,3,5-triazépane-2,6-dione *N*-monoalkylées : analogues du composé III.30 F

De même les composés de la chimiothèque de 1,3,5-triazépane-2,6-diones *N*-monoalkylés ont été testés. Ces composés peuvent être considérés comme des analogues directs du composé III.30 F (tableau VI.2).

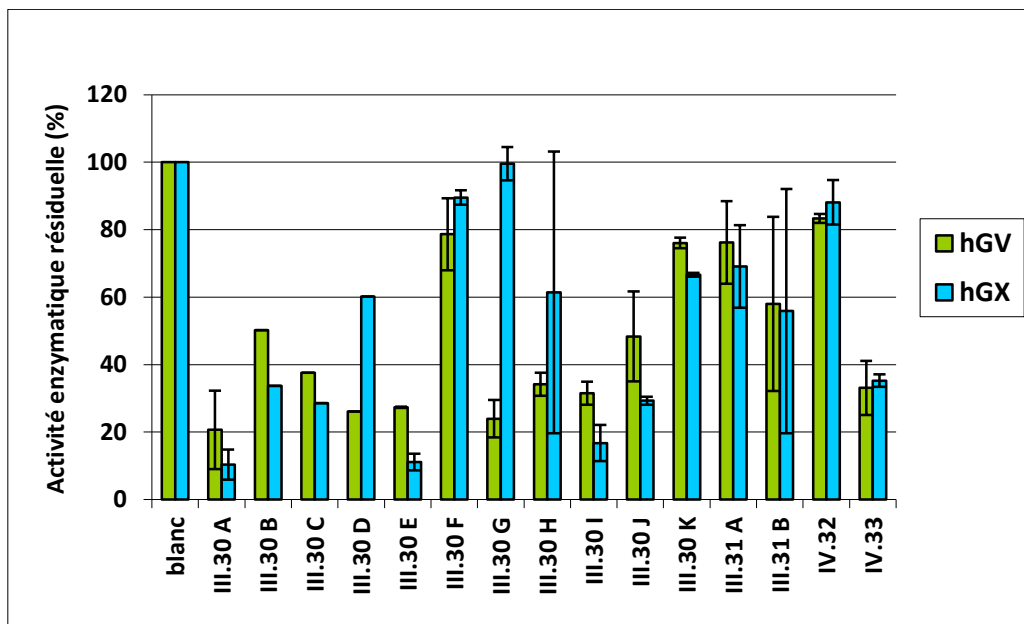
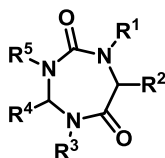


Composé	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	Composé	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>
III.30 A	<i>i</i> Bu	Me	<i>t</i> Bu	III.30 H	Phe	<i>i</i> Pr	<i>t</i> Bu
III.30 B	Phe	Me	<i>t</i> Bu	III.30 I	<i>i</i> Bu	<i>i</i> Pr	<i>t</i> Bu
III.30 C	<i>t</i> Bu	Me	<i>t</i> Bu	III.30 J	<i>i</i> Bu	cyclohexyl	<i>t</i> Bu
III.30 D	<i>i</i> Pr	<i>i</i> Pr	<i>t</i> Bu	III.30 K	<i>i</i> Pr	cyclohexyl	<i>t</i> Bu
III.30 E	<i>i</i> Bu	-(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> )-	<i>t</i> Bu	III.31 A	<i>i</i> Pr	Me	H
III.3 G	<i>n</i> Bu	Me	<i>t</i> Bu	III.31 B	<i>i</i> Pr	<i>i</i> Pr	H

**Tableau VI.2** : composés analogues au composé III.30 F testés comme inhibiteurs de sPLA<sub>2</sub>

Pour compléter cette relation structure/activité autour du composé III.30 F, les composés thionylés IV.32 (thioamide et urée) et IV.33 (amide et thiourée) sont ajoutés à la série de tests. Les tests enzymatiques ont été réalisés avec une concentration d'inhibiteurs de 30 μM sur les sPLA<sub>2</sub> hGV et hGX qui sont utilisées respectivement à des concentrations de 1 nM et de 0,2 nM dans le tampon (diagramme VI.2).





**Diagramme VI.2** : activité enzymatique résiduelle de hGV et hGX en présence d'analogues du composé **III.30 F** testés à une concentration de 30 µM

Le composé de référence **III.30 F** utilisé lors de ce test correspond à un nouveau lot préparé par mes soins en 2012. Les résultats présentés sur le **diagramme VI.2** indique que l' $IC_{50}$  de ce composé est supérieure à 30 µM pour les deux protéines alors qu'une valeur de 12 µM avait été calculée en 2006. Cette variation d'activité observée pour des lots de composés **III.30 F** et **VI.6** issus de différentes synthèses sera discutée ultérieurement dans la section III de ce chapitre.

Le remplacement du groupement isopropyle en position  $R^2$  par un groupement isobutyle améliore nettement l'activité des inhibiteurs (**III.30 A** vs **III.30 F** et **III.30 J** vs **III.30 K**) sauf lorsque  $R^3$  est un isopropyle. Dans ce cas, le gain d'activité obtenu lors du remplacement de l'isopropyle par un isobutyle en position  $R^2$  (composés **III.30 I** et **III.30 D**) n'est important que sur la sPLA<sub>2</sub> hGX.

La présence d'un groupement cyclohexyle (plus volumineux qu'un méthyle ou un isopropyle) en position  $R^3$  n'est pas favorable à l'inhibition (**III.30 J** vs **III.30 A**) Le dérivé acide carboxylique (**III.31 A**) analogue du composé **III.30 F** n'est pas plus actif que ce dernier, en

revanche, l'acide (**III.31 B**) correspondant au composé **III.30 D** possède la même activité que l'ester sur la sPLA<sub>2</sub> hGX mais a perdu l'activité sur la sPLA<sub>2</sub> hGV. Donc il semblerait que l'enzyme hGV soit sensible à la présence de l'ester de *tert*-butyle en position R<sup>5</sup>.

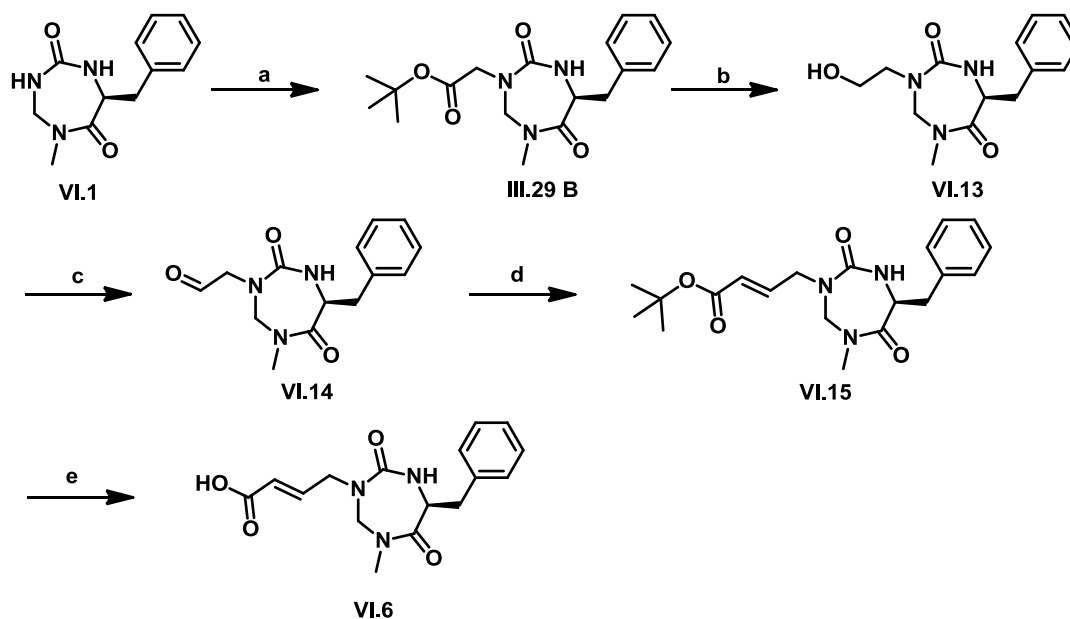
Le composé présentant une thiourée (**IV.33**) est plus actif que son analogue avec la fonction urée (**III.30 F**) mais le composé possédant la fonction thioamide (**IV.32**) à la place de l'amide n'est pas actif. Pour finir, le composé **III.30 G** est un inhibiteur spécifique de la sPLA<sub>2</sub> hGV.

Les composés **III.30 A**, **III.30 B**, **III.30 C**, **III.30 E**, **III.30 I** et **IV.33** sont actifs sur la sPLA<sub>2</sub> hGV avec une IC<sub>50</sub> inférieure à 30 µM et les composés **III.30 A**, **III.30 C**, **III.30 D**, **III.30 E**, **III.30 G**, **III.30 H**, **III.30 I** et **IV.33** sont actifs sur la sPLA<sub>2</sub> hGX avec une IC<sub>50</sub> inférieure à 30 µM.

## II.2. Optimisation de l'inhibition par introduction de groupements susceptibles de complexer le calcium des sites actifs des sPLA<sub>2</sub>

### II.2.a. Analogues de VI.6

Lors des travaux de thèse de Gersande Léna, le composé **VI.6** a été conçu par modélisation moléculaire en utilisant la structure cristallographique de la sPLA<sub>2</sub> hGX. La longue chaîne alkyle en position R<sup>5</sup> terminée par un groupement acide carboxylique avait pour but de lier le calcium de même que la fonction urée du cycle. Le composé **VI.6** (**figure VI.2**, page 184) s'était révélé être un des composés les plus actifs parmi les dérivés 1,3,5-triazépane-2,6-diones testés pendant cette période. La synthèse de ce composé mise au point par Gersande Léna, est réalisée en cinq étapes à partir de l'hétérocycle **cyclo(Phe-gSar-CO)** (**VI.1**) (**schéma VI.1**).

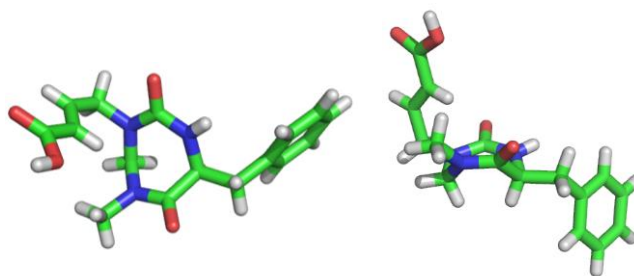


a)  $\text{KF}/\text{Al}_2\text{O}_3$  40 % wt (10 éq.), bromure de *tert*-butyle acétate (2 éq.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 40°C, 24h; b) (i) TFA, 0°C, 30 min, (ii) *i*BuOCOCl (1,05 éq.), NMM (1,2 éq.), THF, -15°C, 30 min, (iii)  $\text{NaBH}_4$  (3 éq.),  $\text{H}_2\text{O}$ , 0°C, 15h; c)  $(\text{COCl}_2)_2$  (1,5 éq.), DMSO (3 éq.), DIEA (6 éq.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , -20°C, 1h10; d)  $(\text{Ph})_3\text{P}=\text{COOtBu}$  (1,5 éq.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , TA, 5h; e) TFA, 0°C, 30 min

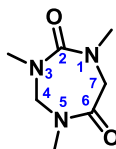
### Schéma VI.1 : synthèse du dérivé VI.6

La quantité restante de ce composé dans les stocks du laboratoire s'étant réduite, j'ai reproduit les dernières étapes de la synthèse de ce composé afin d'avoir un point de comparaison lors de l'inhibition des sPLA<sub>2</sub> par de nouvelles molécules. Après avoir réalisé la *N*-monoalkylation sélective par le bromure de *tert*-butyle acétate du cycle VI.1 grâce au  $\text{KF}/\text{Al}_2\text{O}_3$ , le groupement *tert*-butyle du composé III.29 B est éliminé par le TFA. L'acide carboxylique correspondant est activé sous forme d'anhydride mixte par action du chloroformiate d'isobutyle en présence de *N*-méthylmorpholine puis cet anhydride est transformé en alcool VI.13 par le borohydrure de sodium avec un rendement de 55 % sur les deux étapes. L'alcool VI.13 est oxydé en aldéhyde VI.14 par *oxydation de Swern* qui est réalisée par le chlorure d'oxalyle en présence de DMSO et de DIEA. Cet aldéhyde est directement engagé dans une réaction de *Wittig* avec l'ylure de phosphore  $(\text{Ph})_3\text{P}=\text{COOtBu}$  pour donner le composé VI.15 avec un rendement de 23 % (depuis l'alcool VI.13). Puis la dernière étape qui consiste en l'élimination du groupement *tert*-butyle par le TFA est réalisée à température ambiante, cette étape est quantitative. A l'issue de cette dernière étape, le composé VI.6 est purifié par précipitation dans un mélange  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Et}_2\text{O}$ .

Le composé **VI.6** a pu être cristallisé et sa structure résolue (**figure VI.5**). Ce composé sera également utilisé dans des tests de co-cristallisation avec la protéine sPLA<sub>2</sub> hGX (section IV de ce chapitre).



VI.6

**Figure VI.5** : structure du composé **VI.6**

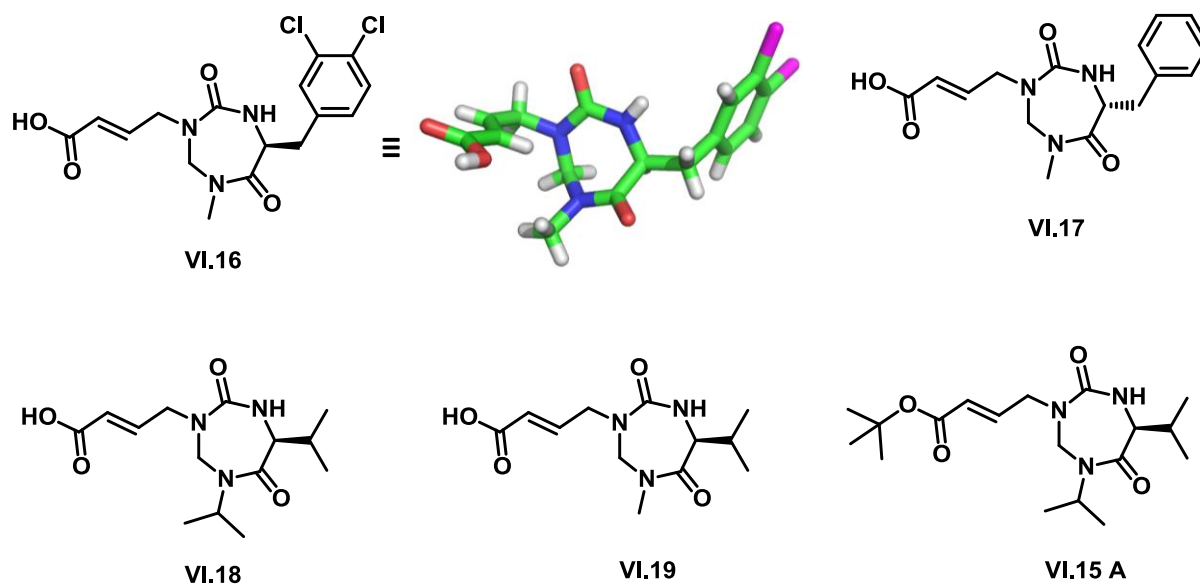
	groupe d'espace	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>6</sub>	T <sub>7</sub>	α (°)
<b>VI.6</b>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	2,39	1,18	55,30	-71,36	0,48	66,68	-58,68	117,5

T1-7 angles de torsion associés aux séquences C7-N1-C2-N3, N1-C2-N3-C4, C2-N3-C4-N5, N3-C4-N5-C6, C4-N5-C6-C7, N5-C6-C7-N1, C6-C7-N1-C2

**Tableau VI.3** : données cristallographiques du composé **VI.6**

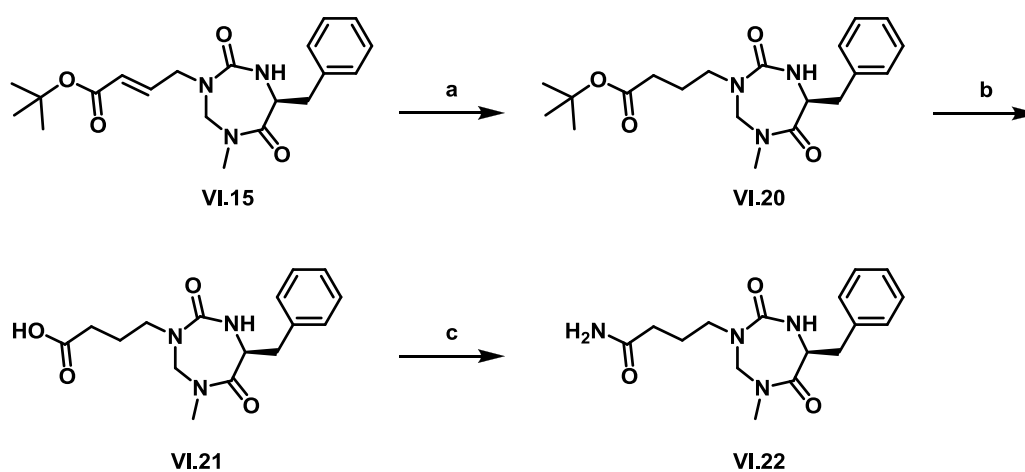
D'après les mesures des angles de torsion T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> et T<sub>5</sub>, l'urée et l'amide de l'hétérocycle sont plans. L'angle α entre ces plans est de 117,5° et le groupement benzyle adopte une position pseudo-équatoriale. Ces trois éléments sont caractéristiques de la conformation A décrite dans le chapitre III.

Plusieurs analogues du composé **VI.6** ont été synthétisés dans le but de réaliser une étude de relation structure/fonction. Certains de ces analogues sont diversifiés en R<sup>2</sup> et R<sup>3</sup> (**figure VI.6**). La voie générale d'accès à ces composés est identique à celle décrite sur le **schéma VI.1**. La structure cristallographique du composé **VI.16** a été obtenue et est montrée sur la **Figure VI.6**, les composés **VI.6** et **VI.16** adoptent la même conformation.



**Figure VI.6 :** analogues du composé **VI.6** présentant des modifications en R<sup>2</sup> et R<sup>3</sup>

D'autres en revanche comme **VI.21** et **VI.22** ont subi des modifications sur la chaîne en R<sup>5</sup> (schéma VI.2). Ces analogues de **VI.6** dérivent tous de **VI.15**.



a) Pd/C (10%), H<sub>2</sub>, EtOH, TA, 16h; b) TFA, TA, 30 min; c) BOP (1,05 éq.), HOBT (1,05 éq.), DIEA (3,15 éq.), résine Sieber (1,5 éq.), DMF, TA, 1h30min, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TFA (9/1), TA, 40 min

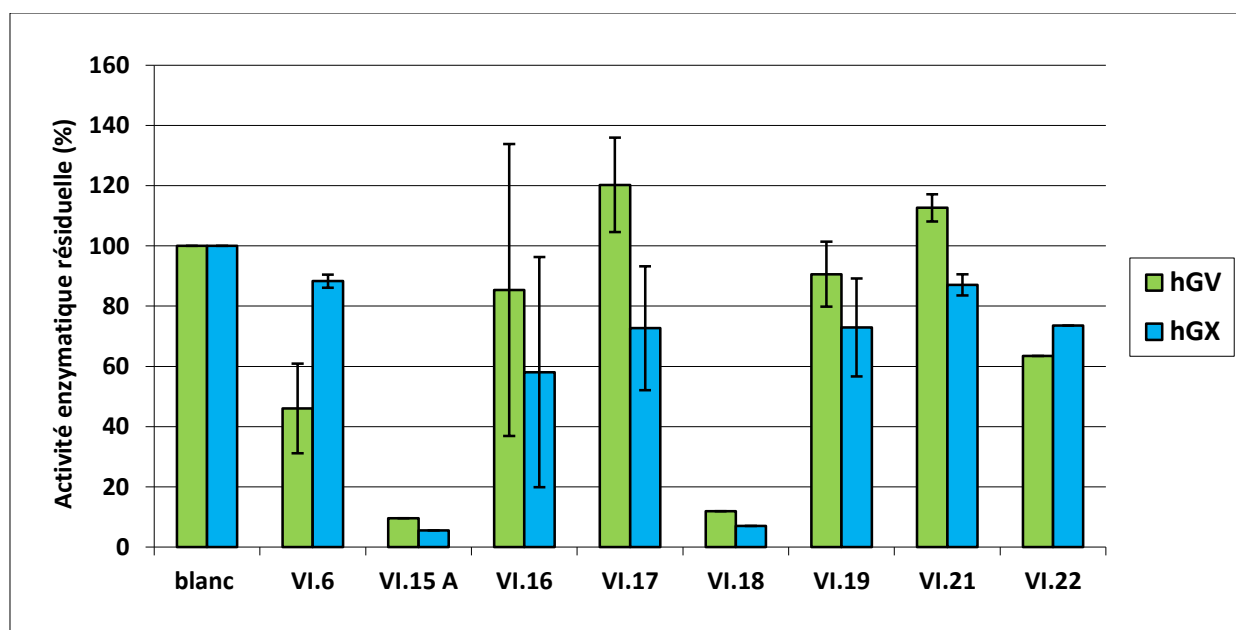
**Schéma VI.2 :** analogues de **VI.6** présentant une variation sur la chaîne R<sup>5</sup>

Après hydrogénation de la double liaison du composé **VI.15** sous atmosphère d'hydrogène en présence d'une quantité catalytique de palladium sur charbon, le groupement *tert*-butyle du composé obtenu **VI.20** est éliminé par l'action du TFA pour donner le composé **VI.21** avec un rendement de 53 % (sur les deux étapes). Une dernière diversification peut être réalisée

en transformant l'acide carboxylique du composé **VI.21** en amide terminal en utilisant la résine *Sieber*. Le groupement protecteur Fmoc présent sur la fonction amine de la résine *Sieber* est éliminé par une solution de pipéridine dans le DMF puis le composé **VI.21** est couplé sur la résine en présence de HOBt, de DIC et de DIEA dans le DMF. Le composé amide **VI.22** est obtenu avec un rendement de 68 %.

### II.2.b. Evaluation biologique des analogues du composé VI.6

Comme précédemment, les composés **VI.6**, **VI.16**, **VI.17**, **VI.18**, **VI.19**, **VI.21** et **VI.22** ont été testés à une concentration de 30  $\mu\text{M}$  sur les sPLA<sub>2</sub> hGV et hGX qui sont utilisées à des concentrations de 1 nM et de 0,2 nM respectivement (**diagramme VI.3**). Lors de ce test, le composé **VI.15 A** qui est l'ester de *tert*-butyle correspondant à **VI.18** a également été testé.



**Diagramme VI.3** : évaluation biologique des composés analogues du composé **VI.6**

Comme lors des tests des analogues du composé **III.30 F** (**diagramme VI.2**), le lot de composé **VI.6** utilisé dans ce test correspond au nouveau lot produit en 2012 au cours de ce travail de thèse. En 2006, l'IC<sub>50</sub> du composé **VI.6** était de 10  $\mu\text{M}$  sur la sPLA<sub>2</sub> hGV et de 20  $\mu\text{M}$  sur la hGX ce qui ne correspond pas aux valeurs obtenues lors de ce test avec le nouveau lot. De manière surprenante, le lot du composé **VI.6** préparé en 2012 ne présente plus d'activité inhibitrice sur la sPLA<sub>2</sub> hGX mais semble toujours actif bien qu'à un degré moindre sur la

sPLA<sub>2</sub> hGV. Les différences d'activités des composés **III.30 F** et **VI.6** entre 2006 et 2012 seront analysées et discutées ultérieurement dans la section III de ce chapitre.

Le composé **VI.17** qui est l'énantiomère de **VI.6** est totalement inactif sur la sPLA<sub>2</sub> hGV mais semble posséder une faible activité inhibitrice sur la sPLA<sub>2</sub> hGX comparable à celle de **VI.6**. Donc il semblerait que la sPLA<sub>2</sub> hGV soit sensible à la stéréochimie de la chaîne R<sup>2</sup> de l'inhibiteur contrairement à la sPLA<sub>2</sub> hGX.

L'activité inhibitrice du composé **VI.16** possède une très grande barre d'erreur et donc il reste difficile à ce jour de conclure sur le rôle des deux chlores présents sur le phényle.

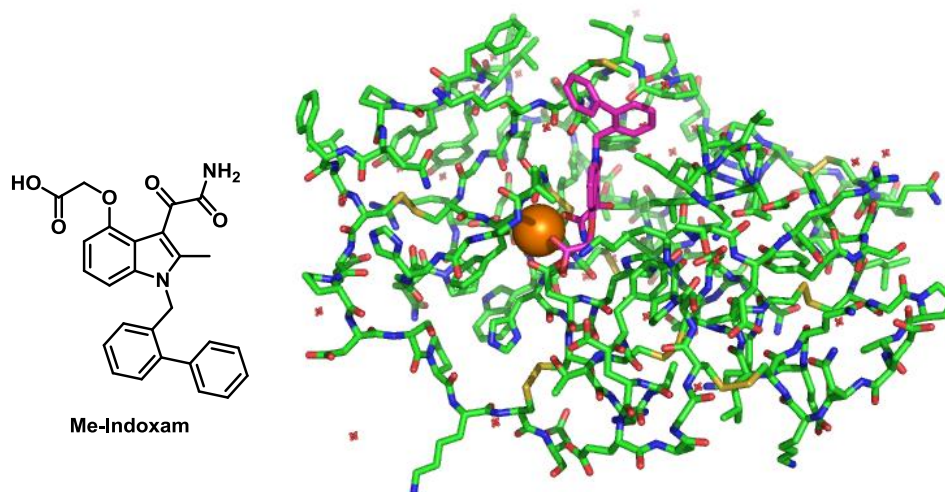
La disparition de la double liaison du composé **VI.6** entraîne une perte d'activité sur la sPLA<sub>2</sub> hGV (composé **VI.21**) mais ne modifie pas l'activité sur la sPLA<sub>2</sub> hGX. Ce qui tend à supposer que les interactions en jeu lors de l'inhibition sont différentes pour hGV et hGX. Mais le remplacement de la fonction acide carboxylique par un amide (composé **VI.22**) permet de regagner un peu d'activité sur la sPLA<sub>2</sub> hGV.

Le composé **VI.19** possède un isopropyle à la place du benzyle, il est donc un analogue des deux composés de référence (composés **VI.6** et **III.30 F**) mais il n'est actif sur aucune des enzymes. En revanche, le composé analogue **VI.18** et son précurseur **VI.15 A** (**figure VI.6**) sont tous les deux très actifs sur les deux enzymes. Ces deux composés possèdent un isopropyle en position R<sup>3</sup>. Cette observation rappelle les résultats obtenus avec les analogues du composé **III.30 F** (**diagramme VI.2**) pour lesquels il a également été noté un gain d'activité pour les composés possédant une chaîne isopropyle en R<sup>3</sup> (composés **III.30 D**, **H**, et **I**). Cette série de tests a mis en évidence la spécificité du composé **VI.6** de 2012 envers la sPLA<sub>2</sub> hGV. Le rôle de l'isopropyle en position R<sup>3</sup> n'est pas clairement défini, de nouveaux tests sont nécessaires pour s'assurer de l'activité des composés **VI.15 A** et **VI.18**.

### II.2.c. Création d'une pince sur l'urée des 1,3,5-triazépane-2,6-diones par *N,N'*-dialkylation

Comme cela a été discuté dans la partie introductive de ce travail, de nombreux inhibiteurs de sPLA<sub>2</sub> possèdent des pharmacophores complexant le calcium. Parmi les fonctions chimiques connues pour complexer le calcium, on peut citer les acides carboxyliques,<sup>87</sup> les amides,<sup>75</sup> les glyoxamides (oxoamide), ou encore les acides hydroxamiques.<sup>254</sup> Ces fonctions ont été utilisées lors de la synthèse d'inhibiteurs très puissants tels que le **Me-Indoxam**

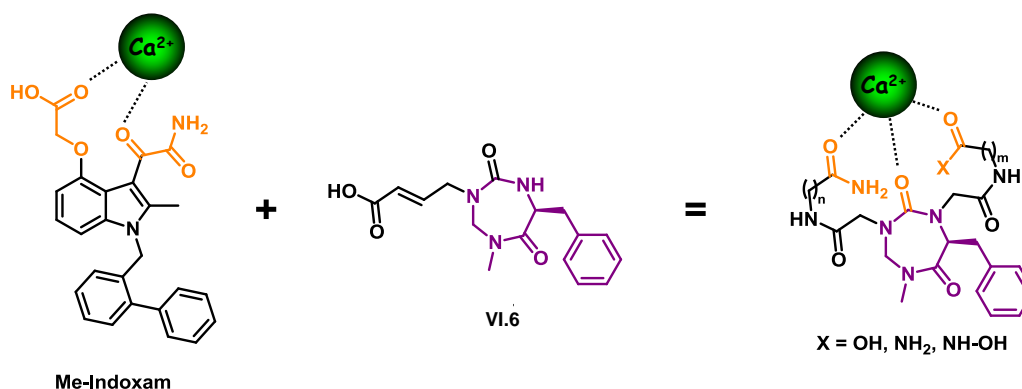
(figure VI.7).<sup>100c</sup> La structure cristallographique du complexe **Me-Indoxam**/hGX à 1.97 Å a été obtenue par le groupe de Mike Gelb à l'Université de Washington (Seattle, USA) mais n'est pas déposée dans la base de données pdb. Des essais précédents de co-cristallisation de la sPLA<sub>2</sub> hGX (PDB : 1LE6 et 1LE7) n'avaient pas permis d'observer un inhibiteur puissant de type lipidique (MJ33) pourtant utilisé à une concentration saturante dans le site actif.<sup>255</sup>



**Figure VI.7** : structure cristallographique du complexe formé entre la sPLA<sub>2</sub> hGX et le Me-Indoxam<sup>112</sup>

Le groupement acide et le groupement oxoamide du **Me-Indoxam** forme une pince qui piège le calcium ce qui est en grande partie responsable de la forte activité inhibitrice du **Me-Indoxam**.

Nous avons pensé créer un système équivalent en utilisant le squelette 1,3,5-triazépanediones et en greffant un ou plusieurs groupements capables de complexer le calcium sur les azotes de l'urée (figure VI.8).



**Figure VI.8** : exemple de création d'une pince pour complexer le calcium à partir des urées du châssis 1,3,5-triazépane-2,6-dione

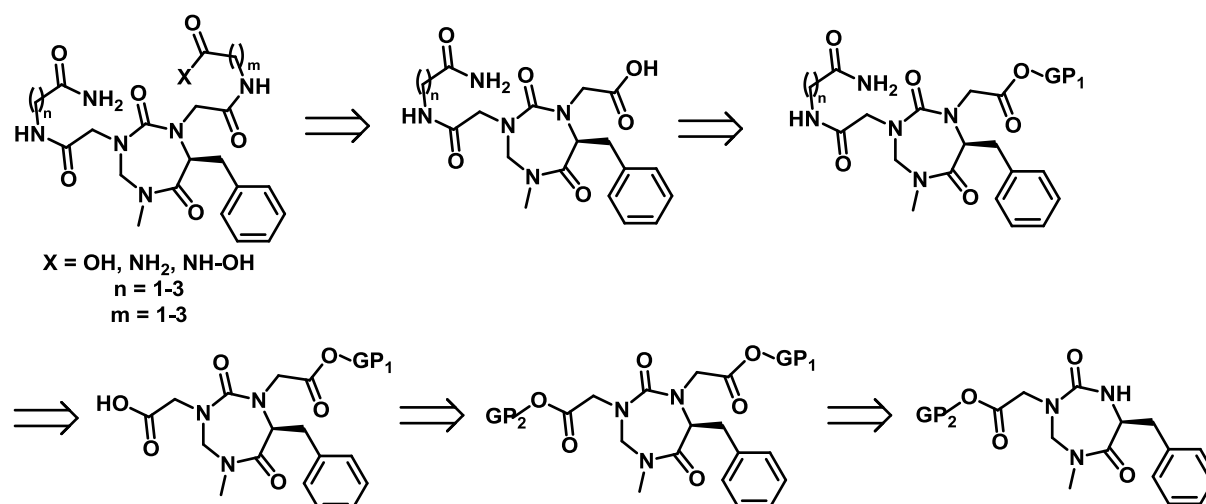


Ne connaissant pas la position du ligand dans le site actif des enzymes, plusieurs pinces ont été synthétisées. La pince possède deux degrés de liberté : la longueur du lien après l'amide ( $m$  et  $n$ , **figure VI.8**) et la nature du groupement terminal ( $X$ , **figure VI.8**)

- les liens comporteront entre 0 et 3 carbones,
- les groupements terminaux seront soit un amide, soit un acide carboxylique, soit un acide hydroxamique.

Les pinces synthétisées pourraient permettre de réaliser une étude de relation structure/activité afin de connaître quelle longueur de pince et quel groupement sont préférables pour que la molécule se lie au calcium à l'intérieur du site actif.

La synthèse de ce type de dérivés peut être réalisée en six étapes à partir du dérivé  $N^3$ -monoalkylé (**schéma VI.3**)

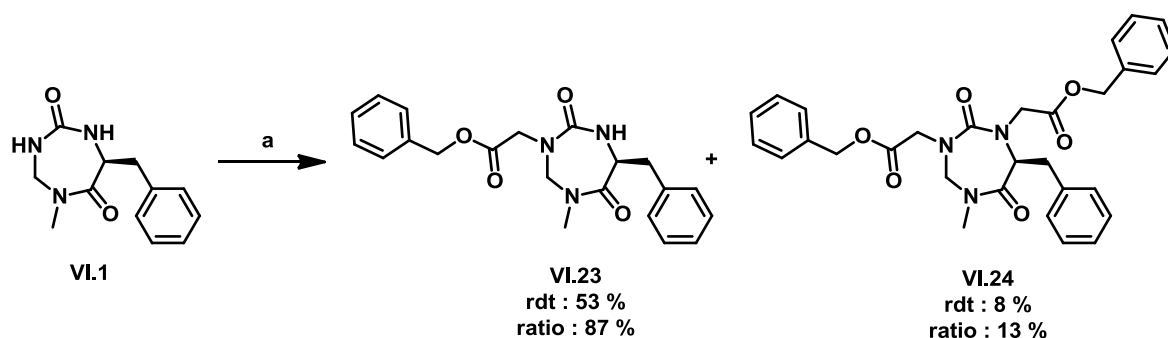


**Schéma VI.3** : rétrosynthèse des triazépanediones  $N,N'$ -dialkylées

### II.2.c.1. Dialkylation sélective

Cette synthèse nécessite une désymétrisation sélective des azotes urée lors des étapes d'alkylation. Les groupements protecteurs  $\text{GP}_1$  et  $\text{GP}_2$  doivent être orthogonaux et pour des raisons de simplification de synthèse, il a été décidé que les groupements protecteurs seraient le groupement benzyle et le groupement *tert*-butyle

La première étape est la *N*-monoalkylation sélective de l'urée en position R<sup>5</sup> qui peut être réalisée en présence de KF/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (chapitre III). Dans certains cas, le KF/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> n'est pas une base suffisamment forte pour permettre une conversion complète de l'hétérocycle en dérivé monoalkylé, principalement lorsque l'électrophile est encombré. Par exemple, un premier essai de *N*-monoalkylation du composé **VI.1** par le bromure de phénylacétate en présence de KF/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ne conduit qu'à un taux de conversion de 3 % en 3 jours alors qu'il est de 60 % dans les mêmes conditions avec le bromure de *tert*-butylacétate. Ainsi, la *N*-monoalkylation du composé **VI.1** par le bromure de phénylacétate nécessite l'emploi de trois équivalents de NaH et trois équivalents d'agent alkylant (**schéma VI.4**). La *N*-monoalkylation est alors moins sélective et l'emploi de NaH conduit également à la formation du dérivé *N,N*-dialkylé.



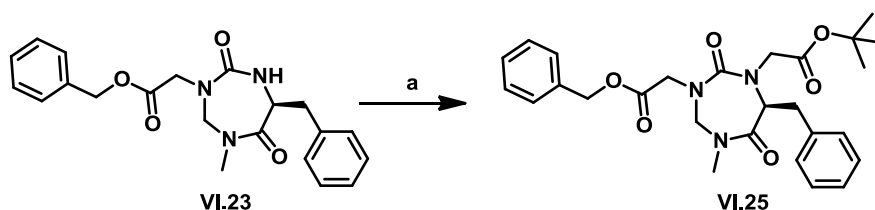
a) NaH (3 éq.), BrCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Bn (3 éq.), THF, TA, 30h

**Schéma VI.4:** Alkylation du composé **VI.1** par le bromoactétate de benzyle en présence de NaH

Le composé *N*-monoalkylé **VI.23** est ainsi isolé avec un rendement de 53 % et le composé *N,N*-dialkylé **VI.24** correspondant est obtenu avec un rendement de 8 %. L'utilisation de NaH lors de cette réaction de *N*-monoalkylation conduit à la formation d'un taux plus élevé de produit *N,N*-dialkylé (13,5 %) par rapport au KF/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> avec lequel les taux de dialkylation sont en général inférieurs à 5 %.

L'étape suivante consiste à introduire le groupement acétate de *tert*-butyle sur le deuxième azote de l'urée de **VI.23**. Compte tenu des conditions pour réaliser la première étape de monoalkylation, l'emploi d'une base plus forte que NaH paraissait nécessaire pour obtenir un rendement correct pour cette deuxième réaction d'alkylation.

Plusieurs bases fortes non ou peu nucléophiles ont été évaluées. L'emploi d'une base de type phosphazène (*tert*-Butylimino-tri(pyrrolidino)phosphorane, BTPP) et du bis(triméthylsilyl)amidure de sodium (NaHMDS) n'a pas conduit au produit d'alkylation attendu. Seul l'utilisation du bis(triméthylsilyl)amidure de lithium (LiHMDS) a permis l'obtention du composé désiré **VI.25** avec un rendement correct (**schéma VI.5**).



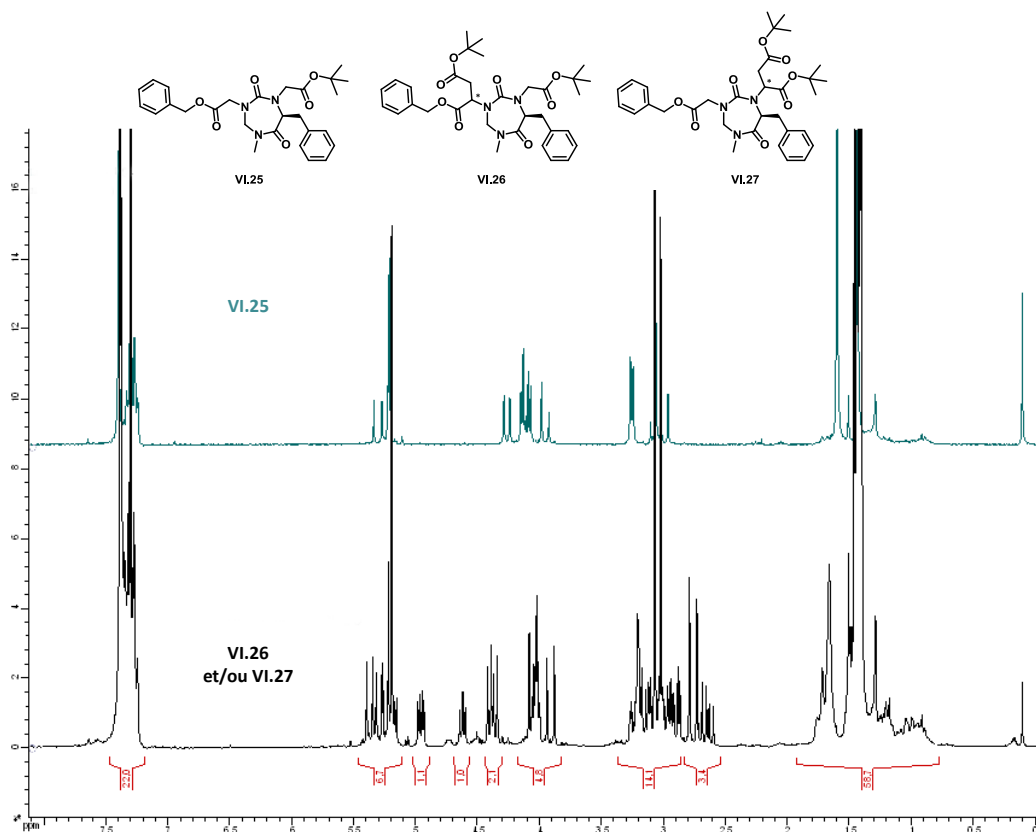
a) bromure de tertbutyle acétate (1,5 éq.), LiHMDS (1,5 éq.), THF, -78°C, 12h

**Schéma VI.5** : *N,N'*-dialkylation du châssis 1,3,5-triazépane-2,6-dione

Le composé **VI.23** est dissout dans le THF anhydre sous atmosphère inerte puis le mélange est refroidi à -78°C et le LiHMDS est ajouté au goutte-à-goutte. Après une heure à -78°C, le dérivé bromé est additionné lentement et la réaction reste à -78°C pendant une nuit. Après purification par colonne chromatographique sur gel de silice, le composé **VI.25** est obtenu avec un rendement de 46 %.

Les deux réactifs NaHMDS et LiHMDS ont une réactivité différente puisque contrairement au NaHMDS, le LiHMDS a permis la dialkylation. La seule différence entre ces bases forte est la nature du contre ion, il est donc possible que le sodium, plus volumineux, empêche l'attaque nucléophile de l'azote sur le dérivé bromé.

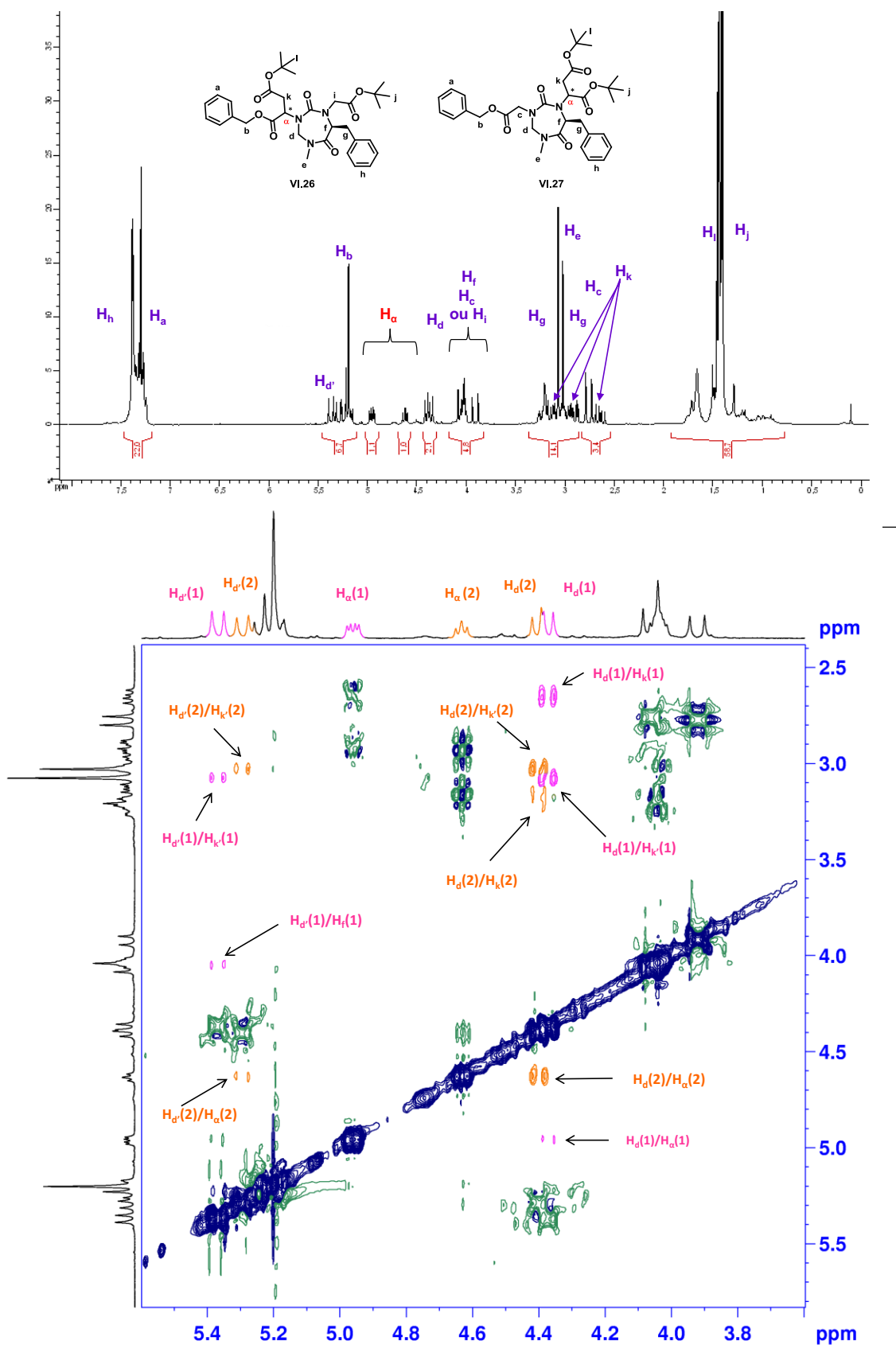
Un trop grand excès de base (2,5 éq.) et de dérivé bromé (4 éq.) conduit à la formation conjointe d'un composé dérivé de 1,3,5-triazépane-2,6-dione de masse moléculaire  $[M + Na]^+ = 632,1$  g/mol. Le LiHMDS est une base suffisamment forte pour arracher un proton d'un carbone en alpha d'un ester et conduire à l'énolate de lithium correspondant. Ce dernier peut réagir sur l'électrophile présent dans le milieu, il est donc fort possible qu'un seconde alkylation ait eu lieu (**figure VI.9**).



**Figure VI.9** : spectres RMN du composé N,N'-dialkylés (bleu) et du composé ayant subi une alkylation supplémentaire (en noir) (300 MHz, 298K, 10 mg.ml<sup>-1</sup>, CDCl<sub>3</sub>).

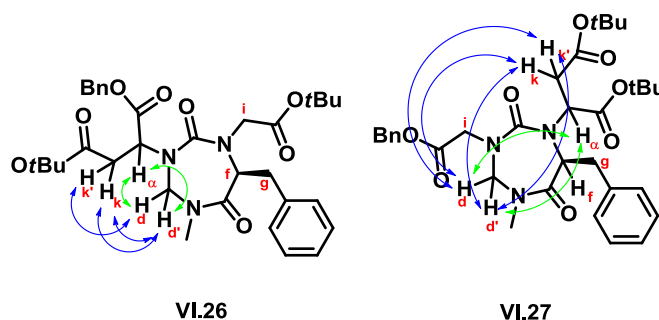
Il est clair que deux composés sont présents d'après le spectre RMN noir (**figure VI.9**). Ce spectre peut résulter soit d'un mélange de **VI.26** et **VI.27** soit d'un mélange de deux diastéréoisomères de **VI.26** ou **VI.27**.

Dans l'hypothèse d'une double alkylation, les deux pics à 4,62 et 4,96 ppm non présents dans **VI.25** peuvent être attribué aux protons CH<sub>α</sub> (appelé H<sub>α</sub> sur la **figure VI.10**) du nouveau résidu aspartate créé. L'intégration de ces pics nous révèle un ratio 1 :1 de chaque composé. Une expérience RMN NOESY (**figure VI.10**) a été menée pour faciliter l'attribution des différents protons et valider l'une des hypothèses. Sur le spectre NOESY, une des molécules est appelée molécule 1 (rose) et la seconde est appelée molécule 2 (orange).



**Figure VI.10** : spectre RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, 298 K,  $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ) et détail du spectre NOESY du composé ayant subi une alkylation supplémentaire (400 MHz, 298 K,  $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $\text{CDCl}_3$ )

D'après le spectre NOESY, pour les deux composés, il existe une corrélation entre les protons  $H_\alpha$  et les protons de la *gem*-diamine  $H_d$  (vers 4,4 ppm) et  $H_{d'}$  (vers 5,3 ppm). On remarque également que les couplages entre les protons  $H_d$  et les protons  $H_\alpha$  sont plus important qu'entre les protons  $H_{d'}$  et les protons  $H_\alpha$ . Les protons de la *gem*-diamine  $H_d$  sont également couplés aux protons  $H_k$  pour les deux composés. Les composés 1 et 2 ont les mêmes corrélations, il s'agit donc très certainement de deux distéréoisomères de la même molécule. Les corrélations décrites ci-dessus sont représentées sur la **figure VI.11**.

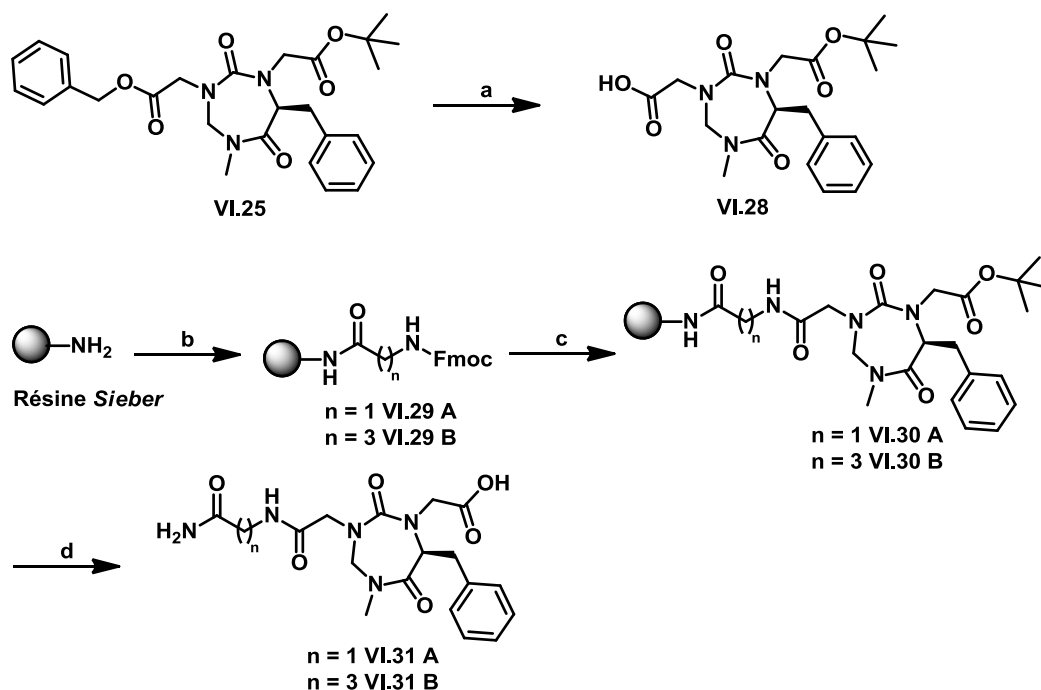


**Figure VI.11** : représentation des effets NOE pour les composés **VI.26** et **VI.27**

Dans l'hypothèse que le composé tri-alkylé serait le composé **VI.27**, une corrélation entre le proton  $H_\alpha$  et le proton  $H_f$  est attendue or sur le spectre NOESY, il est clair qu'il n'y a aucun couplage entre ces deux protons. Il y a donc une forte probabilité pour que les composés formés soit les deux distéréoisomères du composé **VI.26**.

### II.2.c.2 Introduction de la première chaîne carboxamide sur l'azote du résidu *gem*-diamino

La fonction amide de la pince est introduite directement sur support solide en utilisant la résine *Sieber* (**schéma VI.6**). Le choix de la synthèse sur support solide repose sur la facilité de mise en œuvre, et sur la possibilité de travailler sur de petites échelles.

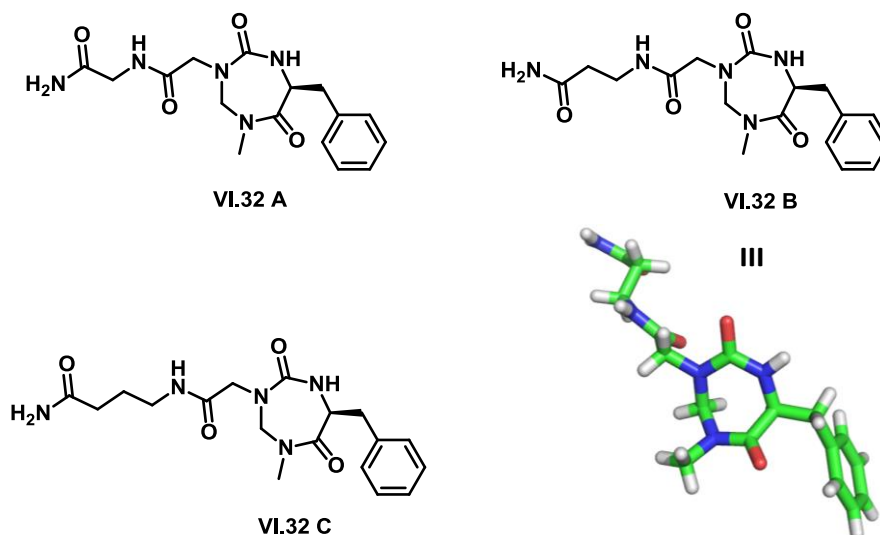


a)  $H_2$ , Pd/C (10%), EtOH, TA, 2h; b) N-fmoc-aminoacide (2 éq.), DIC (2 éq.), HOBT (2 éq.), DMF, 2h; c) (i) pipéridine/DMF (1:4), 2 x 20 min; (ii) **VI.28** (1,3 éq.), DIC (2 éq.), HOBT (2 éq.), DMF, 3h; d) TFA/ $CH_2Cl_2$  (1:4), 10 x 2 min

**Schéma VI.6** : Introduction d'une fonction carboxamide portée par un bras de taille variable sur l'azote du résidu gem-diamine.

L'hydrogénation catalytique de **VI.25** sous atmosphère d'hydrogène et en présence de palladium sur charbon permet la déprotection de l'acide carboxylique porté par l'azote *gem*-diamino de l'urée. Puis, après avoir déprotégé l'amine présente sur la résine *Sieber* par une solution de pipéridine, l'acide aminé Fmoc-Gly-OH ( $n = 1$ ) ou bien Fmoc-GABA-OH ( $n = 3$ ) est couplé en présence de DIC et de HOBT. Le groupement Fmoc est éliminé en présence de pipéridine puis le cycle **VI.28** est couplé en présence de DIC. La dernière étape consiste au clivage du composé de la résine *Sieber*, l'utilisation d'une solution à 20 % de TFA dans le  $CH_2Cl_2$  permet le clivage de la résine mais également l'élimination du groupement *tert*-butyle. Les cycles **VI.31 A** et **VI.31 B** sont obtenus avec des rendements de l'ordre de 80 % après précipitation dans  $Et_2O$ . La pureté HPLC est estimée à 97 %.

La même méthodologie a été appliquée au composé *N*-monoalkylé **VI.23**, les dérivés amides correspondant (**figure VI.12**) servant à évaluer l'influence d'un second site de complexation du calcium sur l'activité inhibitrice des 1,3,5-triazépane-2,6-diones.



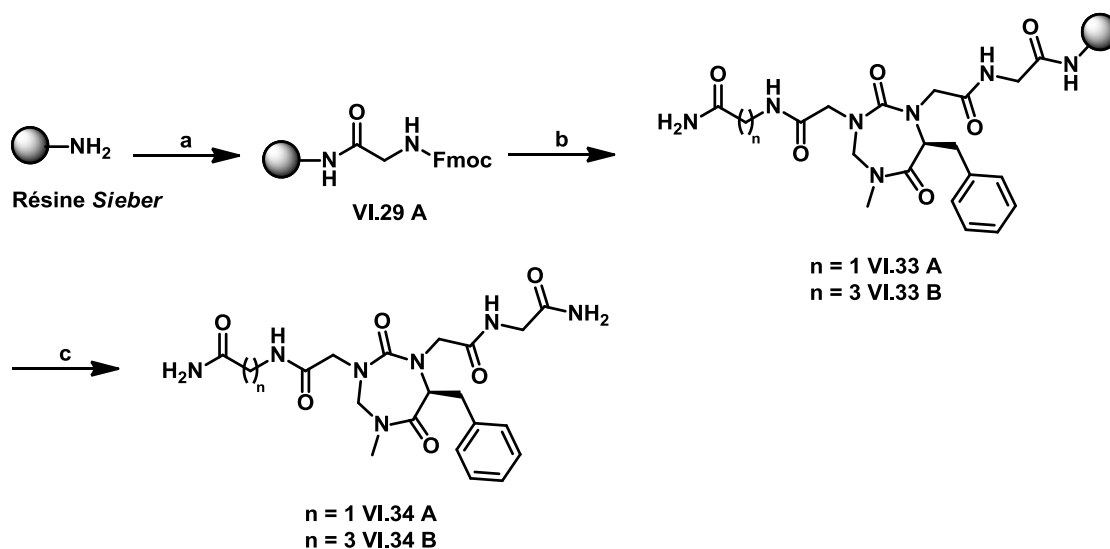
**Figure VI.12** : hétérocycles porteur d'une fonction carboxamide issus du dérivé monoalkylé **VI.23**

De même que pour les composés **VI.31**, les cycles **VI.32 A**, **VI.32 B** et **VI.32 C** ont été obtenus avec un bon rendement de l'ordre de 90 % après précipitation dans Et<sub>2</sub>O. La pureté HPLC est estimée à 97 %. Le composé **VI.32 B** a été cristallisé et sa structure est présentée sur la **figure VI.12**. Il adopte la même conformation A que le composé **VI.6** mais cristallise dans un groupe d'espace différent (P2<sub>1</sub> contre P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub> pour **VI.6**).

### II.2.c.3 fonctionnalisation du deuxième azote de l'urée

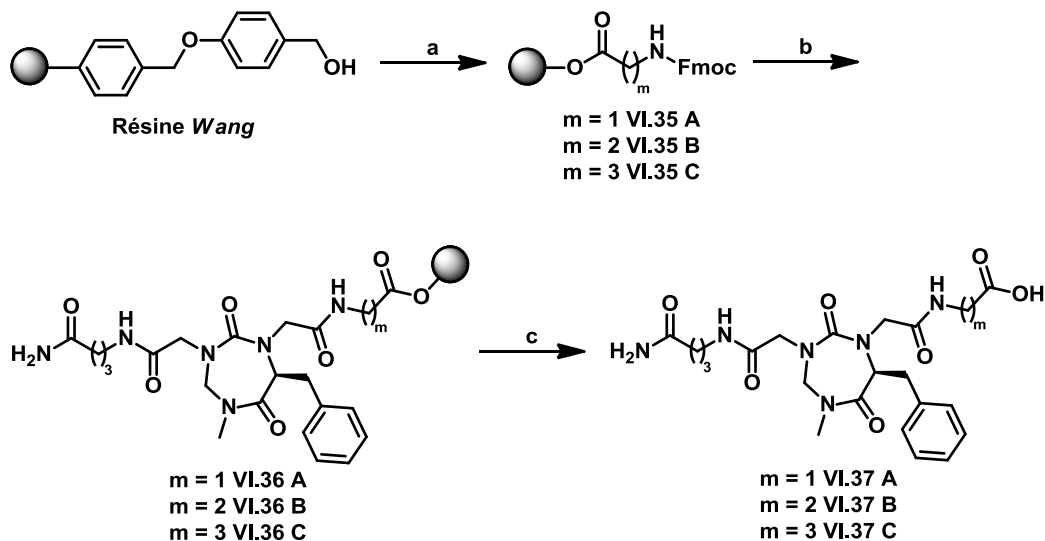
La fonctionnalisation de l'acide carboxylique des composés **VI.31 A** et **VI.31 B** pour générer la deuxième partie des pinces à calcium a été réalisée sur support solide d'une manière similaire à l'introduction des chaînes carboxamide sur la terminaison acide du composé **VI.28**. Trois résines ont été utilisées : la résine *Sieber* pour obtenir une fonction amide (**schéma VI.7**), la résine *Wang*<sup>256</sup> pour générer une fonction acide carboxylique (**schéma VI.8**), et la résine 2-chlorotryl *N*-Fmoc-hydroxylamine<sup>257</sup> pour la fonction acide hydroxamique (**schéma VI.9**).





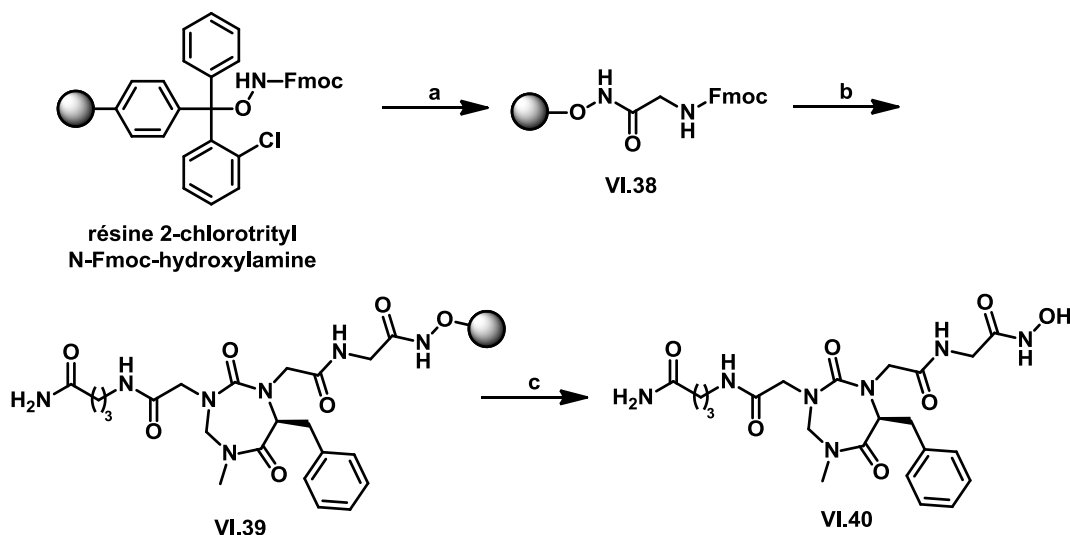
a) Fmoc-Gly-OH (2 équ.), DIC (2 équ.), HOBT (2 équ.), DMF, TA, 2h; b) (i) pipéridine/DMF (1:4), TA, 2 x 20 min; (ii) VI.31 A ou VI.31 B (1,3 équ.), DIC (2 équ.), HOBT (2 équ.), DMF, TA, 3h; c) TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:4), TA, 10 x 2 min

**Schéma VI.7** : synthèse des hétérocycles *N,N'*-dialkylés possédant deux fonctions amides terminales



a) (i) *N*-Fmoc-aminoacide (10 équ.), DIC (5 équ.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C 30 min, (ii) DMAP (0,1 équ.), DMF, TA, 3h; b) (i) DBU/DMF (2 : 98), TA, 30 min; (ii) VI.31 B (1,3 équ.), BOP (2 équ.), DIEA (6 équ.), DMF, TA, 1h; c) TFA/H<sub>2</sub>O/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (95 : 2,5 : 2,5), TA, 2h.

**Schéma VI.8** : synthèse des hétérocycles *N,N'*-dialkylés possédant une fonction amide et une fonction acide carboxylique terminale

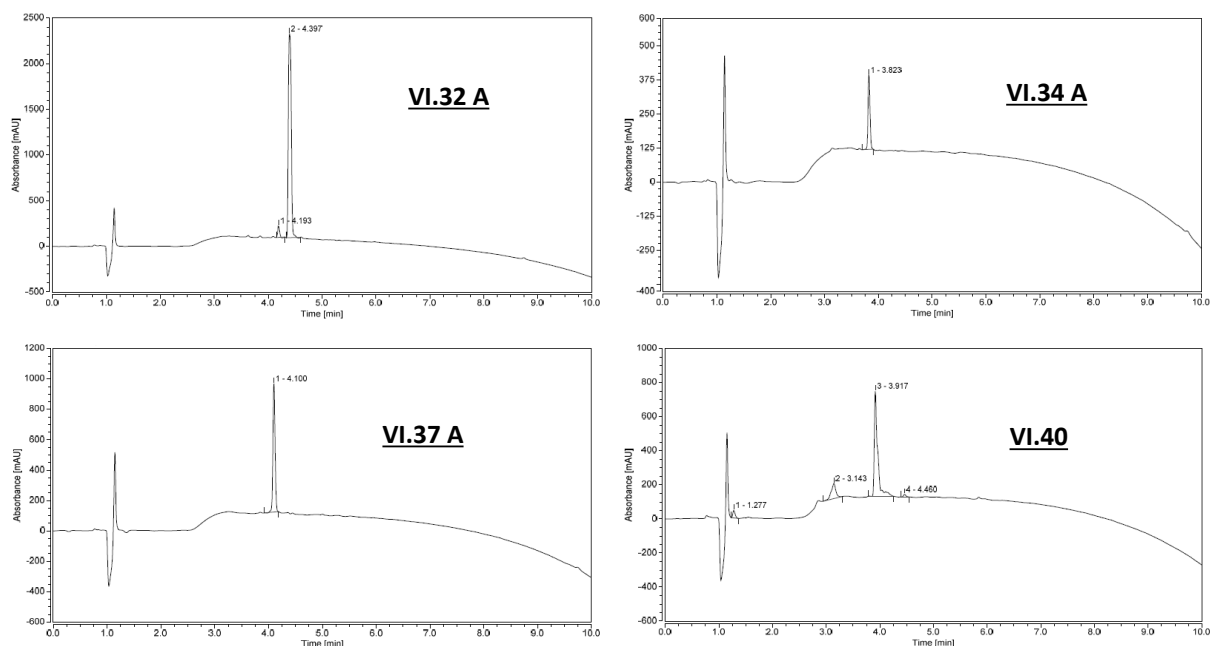


a) (i) DBU/DMF (2 : 98), TA, 30 min; (ii) Fmoc-Gly-OH (2 éq.), DIC (2 éq.), HOBt (2 éq.), DMF, TA, 2h; b) (i) DBU/DMF (2 : 98), TA, 30 min; (ii) **VI.31 B** (1,5 éq.), DIC (2 éq.), HOBt (2 éq.), DMF, TA, 3h; c) TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 : 99), TA, 10 x 2 min.

**Schéma VI.9** : synthèse d'un hétérocycle *N,N'*-dialkylé possédant une fonction amide et une fonction acide hydroxamique terminale

Les conditions de couplage du premier acide aminé (Fmoc-Gly-OH) sur la résine 2-chlorotrytyl hydroxylamine sont identiques à celles employées pour le couplage sur la résine Sieber (**schéma VI.7** et **VI.8**). En revanche, pour les dérivés acides **VI.37**, les *N*-Fmoc acides aminés sont activés sous forme d'anhydrides avec du DIC en présence de DMAP avant d'être ajoutés à la résine *Wang*. Les étapes suivantes sont identiques à celles décrites pour les composés **VI.34**, le composé **VI.31 B** étant couplé sur la résine en présence de DIC, d'HOBt, et de DIEA comme précédemment.

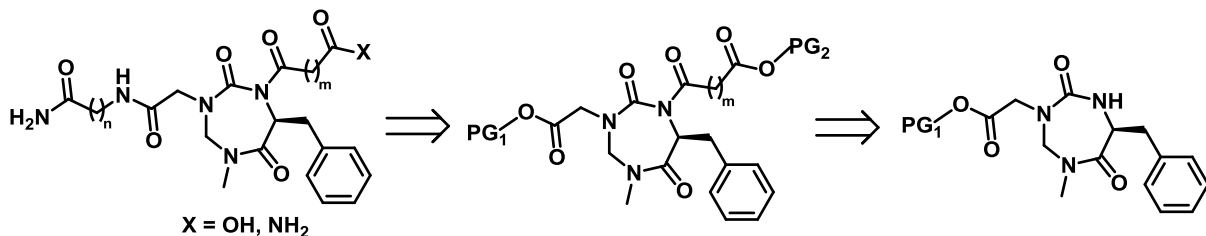
Au total, onze composés ont été synthétisés (**VI.31 A**, **VI.31 B**, **VI.32 A**, **VI.32 B**, **VI.32 C**, **VI.34 A**, **VI.34 B**, **VI.37 A**, **VI.37 B**, **VI.37 C**, **VI.40**) dans cette série, possédant des longueurs de chaînes différentes et des extrémités variées. Les puretés HPLC de tous les composés sont supérieures à 97 % à l'exception du composé **VI.40** où elle est de 80 % (**figure VI.13**).



**Figure VI.13** : chromatogrammes HPLC des produits **VI.32 A**, **VI.34 A**, **VI.37 A** et **VI.40** après précipitation dans l'éther ( $C_{18}$ -HPLC, A : 0.1% TFA in  $H_2O$ , B : 0.1% TFA in  $CH_3CN$ , 10-100% B, 1 mL/min, 10 min)

#### II.2.d. Essai de d'élaboration d'une pince sur l'urée des 1,3,5-triazépane-2,6-diones par réaction d'acylation

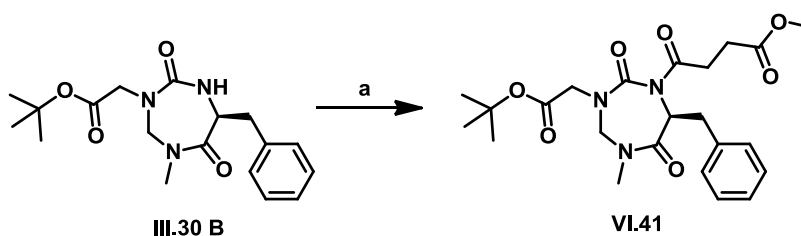
La réactivité des azotes de la fonction urée permet également de réaliser des réactions d'acylation. La réaction d'acylation est intéressante pour la diversification des cycles et dans la recherche de nouveaux inhibiteurs de sPLA<sub>2</sub> puisqu'elle permet de modifier localement la géométrie de l'urée et d'introduire un groupe accepteur de liaisons hydrogène supplémentaire. De nouvelles pinces ont donc été conçues en exploitant cette possibilité (**schéma VI.10**).



**Schéma VI.10** : rétro-synthèse de la formation de la nouvelle pince formée par une *N*-alkylation et une *N*-acylation

La première étape de la synthèse de ce nouveau type de pince est l'acylation d'une urée *N*-mono-alkylée. Les réactions d'acylation d'urées décrites dans la littérature sont généralement réalisées par réaction d'un halogénure d'acyle et d'une base (par exemple LiHMDS<sup>258</sup>, *n*-BuLi,<sup>259</sup> NaH<sup>260</sup> ou encore pyridine<sup>261</sup>). Il a été montré précédemment au laboratoire que les 1,3,5-triazépane-2,6-diones peuvent être mono-acylées sélectivement sur l'azote en position N1 en utilisant la 2,4,6-collidine, le K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, la DMAP ou la pyridine, les meilleurs résultats en terme de rendement étant obtenus avec la 2,4,6-collidine. .

Comme dans le cas des pinces obtenues par *N,N'*-dialkylation, les groupements protecteurs GP<sub>1</sub> et GP<sub>2</sub> doivent être orthogonaux. Le méthyl-4-chloro-4-oxybutyrate a donc été choisi comme halogénure d'acyle pour acyler le composé **III.30 B** (schéma VI.11).



a) 2,4,6-collidine (2 équ.), méthyl-4-chloro-4-oxybutyrate (2 équ.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 40°C, 24h

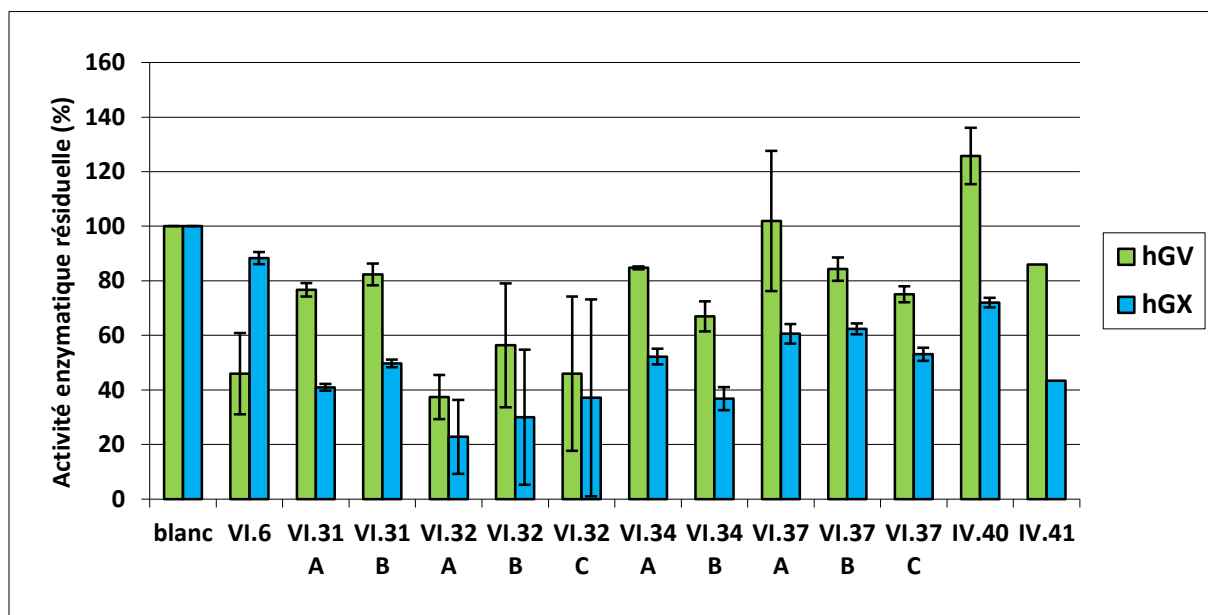
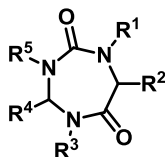
**Schéma VI.11** : réaction d'acylation de l'urée *N*-monoalkylée **III.30 B**

Après dissolution du composé **III.30 B** dans le dichlorométhane, la 2,4,6-collidine est ajoutée ainsi que le méthyl-4-chloro-4-oxybutyrate. Le milieu réactionnel est agité 24h à 40°C, puis le composé désiré **VI.41** est obtenu après purification par colonne chromatographique sur gel de silice avec un rendement de 63 %. Toutefois, ce produit n'est pas stable dans les conditions acides ou basiques nécessaires pour l'élimination des groupes protecteurs et donc cette approche n'a pas été poursuivie pour l'élaboration de composés présentant deux pinces pour complexer le calcium.

**II.2.e. Evaluation biologique des composés conçus pour se lier au calcium**

De même que pour les autres évaluations biologiques, les composés **VI.31 A**, **VI.31 B**, **VI.32 A**, **VI.32 B**, **VI.32 C**, **VI.34 A**, **VI.34 B**, **VI.37 A**, **VI.37 B**, **VI.37 C**, **VI.40** et **VI.41** ont été testés à

une concentration de 30  $\mu\text{M}$  sur les sPLA<sub>2</sub> hGV et hGX (utilisées à des concentrations de 1 nM et de 0,2 nM respectivement) (**diagramme VI.4**).



**Diagramme VI.4** : évaluation des composés conçus pour lier le calcium du site actif des enzymes

Les composés les plus actifs de cette série sont les composés **VI.32 A**, **VI.32 B** et **VI.32 C** qui sont les composés *N*-monoalkylés. L'ajout de la seconde chaîne fonctionnalisée en position  $R^1$  a un effet négatif sur l'inhibition et donc l'hypothèse de la formation d'une pince pour lier le calcium à l'intérieur du site est remise en question. Néanmoins, il est possible que la taille des pinces soit trop importante par rapport à la taille du site actif et donc que ces dernières gênent l'entrée de l'inhibiteur à l'intérieur du site actif. On peut cependant également imaginer que dans le cas des composés monoalkylés **VI.32 A**, **VI.32 B** et **VI.32 C**, les deux groupes carbonyles le long de la chaîne carboxamide puissent être impliqués dans une complexation au calcium, créant un effet de pince.

La taille de la chaîne  $R^5$  ne semble pas jouer un rôle essentiel dans l'activité inhibitrice mesurée puisque **VI.31 A** et **B** ont la même activité. Ces deux composés sont plus actifs sur la sPLA<sub>2</sub> hGX que sur la sPLA<sub>2</sub> hGV contrairement au composé **VI.6**. Il en est de même pour les composés **VI.34 A** et **VI.34 B**. Les composés **VI.34 A** et **VI.34 B** possèdent la même chaîne  $R^1$

mais des longueurs de chaînes  $R^5$  différentes (6 atomes pour **VI.34 A** et 8 atomes pour **VI.34 B**). L'activité de **VI.34 B** est légèrement meilleure, il possède une  $IC_{50}$  inférieure à  $30 \mu\text{M}$  sur la  $sPLA_2$  hGX contrairement à **VI.34 A**.

Les composés **VI.34 B**, **VI.37 A** et **VI.40** ont la même chaîne  $R^5$  et la même longueur de chaîne  $R^1$  mais avec des fonctionnalités différentes, la comparaison des activités de ces composés montre une meilleure activité sur les deux enzymes pour le composé possédant une fonction amide en  $R^1$ .

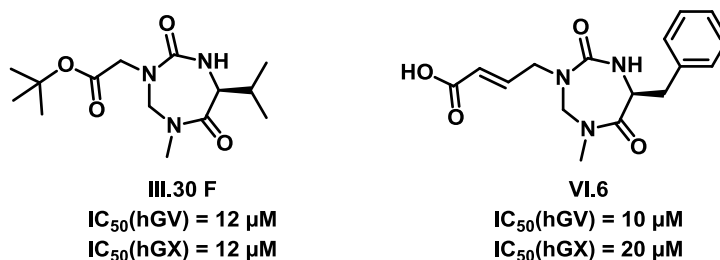
La comparaison des activités des composés **VI.37** qui possèdent la même chaîne  $R^5$  et la même fonctionnalité (acide carboxylique) mais des longueurs différentes de la chaîne  $R^1$  montre une préférence pour un chaîne  $R^1$  courte en ce qui concerne la  $sPLA_2$  hGV. En revanche il n'y a pas d'influence de la longueur de la chaîne  $R^1$  concernant la  $sPLA_2$  hGX.

Le composé acylé **VI.41** possède une activité très comparable aux autres composés  $N,N'$ -dialkylés.

Cette série de tests a infirmé l'hypothèse de la formation d'une pince autour du calcium présent dans le site actif des enzymes. En revanche, ces tests ont mis en évidence une série de trois composés actifs (**VI.32 A**, **B** et **C**) malgré la présence d'une barre d'erreur très importante.

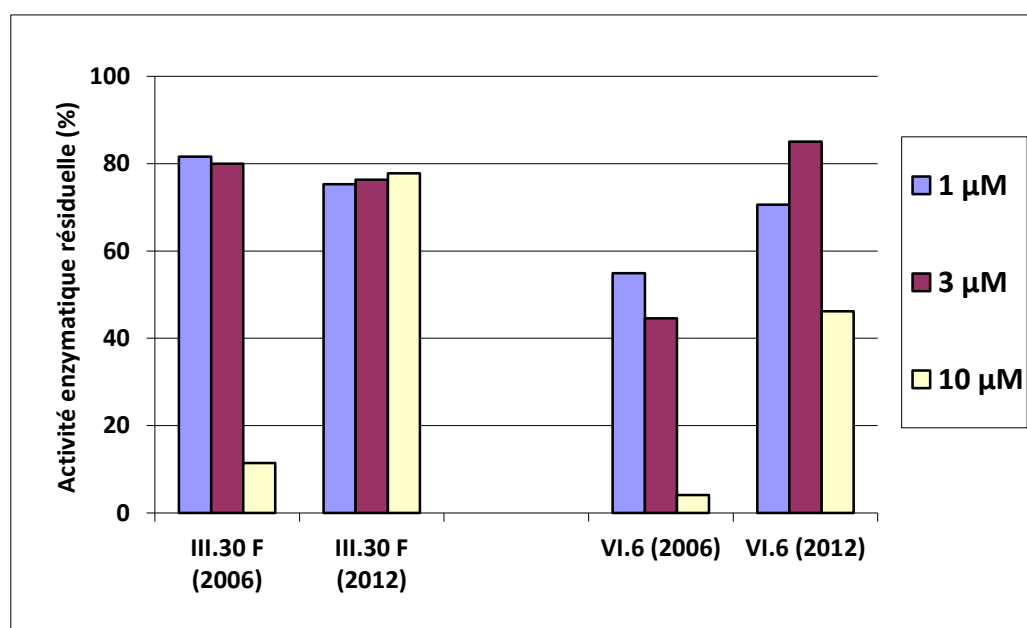
### III. Comparaison des différents lots des composés III.30 F et VI.6

Les composés **III.30 F** et **VI.6** (figure VI.14) avaient été identifiés comme les composés les plus actifs parmi la première série de 1,3,5-triazépane-2,6-diones testée pour l'activité et la spécificité à l'encontre des  $sPLA_2$  hGV et hGX.



**Figure VI.14** : composés les plus actifs à l'issu des premiers tests enzymatiques réalisés en 2006

Ces composés ont été utilisés comme références dans la plupart des études qui ont suivies notamment celles réalisées au cours de mon travail de thèse. Pendant plusieurs années, les IC<sub>50</sub> ainsi que tous les tests enzymatiques ont été réalisés avec les mêmes lots de composés datant de 2006. Lors de l'étude de relation structure/fonction effectuée à la fin de l'année 2012, de nouveaux lots de ces composés préparés par mes soins en 2012 ont été testés et ont montré pas ou peu d'activité sur les sPLA<sub>2</sub>. Dans le but d'expliquer ce résultat, l'activité des lots de 2006 et de 2012 a été comparée sur la sPLA<sub>2</sub> hGX (**diagramme VI.5**).



**Diagramme VI.5** : comparaison de l'activité des lots de **III.30 F** et **VI.6** préparés en 2006 et 2012 sur la sPLA<sub>2</sub> hGX

D'après ce diagramme, il est évident que les composés de 2012 sont peu ou pas actifs comparés à ceux de 2006 notamment à une concentration de 10 µM. Lors de ce test, les composés de 2006 semblent trop actifs. Les IC<sub>50</sub> calculées en 2006 étaient de 12 µM pour le composé **III.30 F** et de 20 µM pour le composé **VI.6** or d'après ce test on peut estimer les IC<sub>50</sub> à une valeur inférieure à 10 µM pour **III.29 F (2006)** et aux environs de 3 µM pour le composé **VI.6 (2006)**.

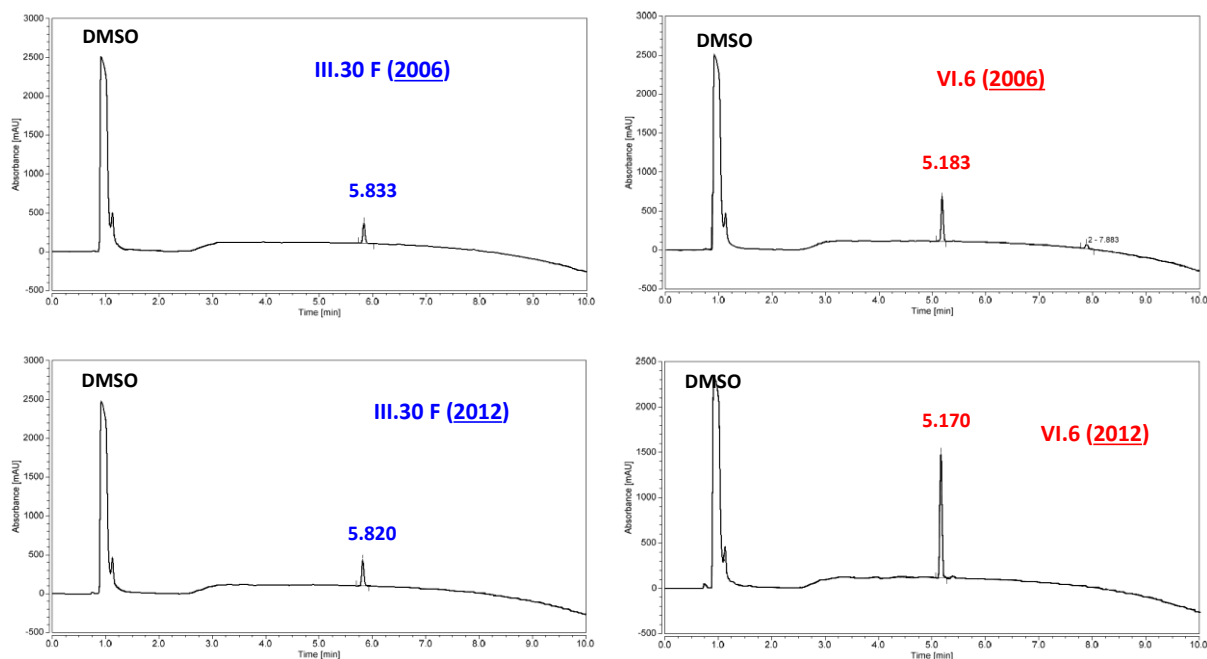
Le manque d'activité des composés de 2012 et la plus grande activité des composés de 2006 soulèvent des questions :

- les produits se sont-ils dégradés au cours du temps ? Si oui, un produit de dégradation serait-il à l'origine de l'activité ?

- existait-t-il une impureté dans les lots datant de 2006 absente des lots de 2012 responsable de l'activité observée ?

### III.1. Etude de la stabilité des hétérocycles

En vue des tests enzymatiques, les produits sont conservés sous forme de solutions stocks dans le DMSO à des concentrations de 10 mM. Il est donc possible que les hétérocycles se soient dégradés dans ces solutions stocks. Mais les analyses HPLC (C<sub>18</sub>-HPLC, A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 10-100% B, 1 mL/min, 10 min) (**figure VI.15**) de ces solutions stocks révèlent la présence des mêmes produits dans les solutions datant de 2006 et dans celles de 2012.



**Figure VI.15** : Chromatogramme des solutions stock des différents lots de **III.30 F** et **VI.6** (C<sub>18</sub>-HPLC, A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 10-100% B, 1 mL/min, 10 min, détection à 200 nm)

D'après ces chromatogrammes, les composés **III.30 F** et **VI.6** ne semblent pas dégradés dans les solutions stocks, et aucune impureté majeure n'est détectée à 200 nm.



La présence d'une faible quantité du composé **VI.6** encore en poudre datant de 2006 dans le laboratoire a permis de réaliser un nouveau test enzymatique avec cette poudre (**VI.6 poudre 2006**). Les tests enzymatiques ont été effectués sur la sPLA<sub>2</sub> hGX avec une concentration de 30 µM d'inhibiteurs (**tableau VI.4**). Les valeurs du tableau représentent les activités enzymatiques résiduelles de la protéine en présence de l'inhibiteur.

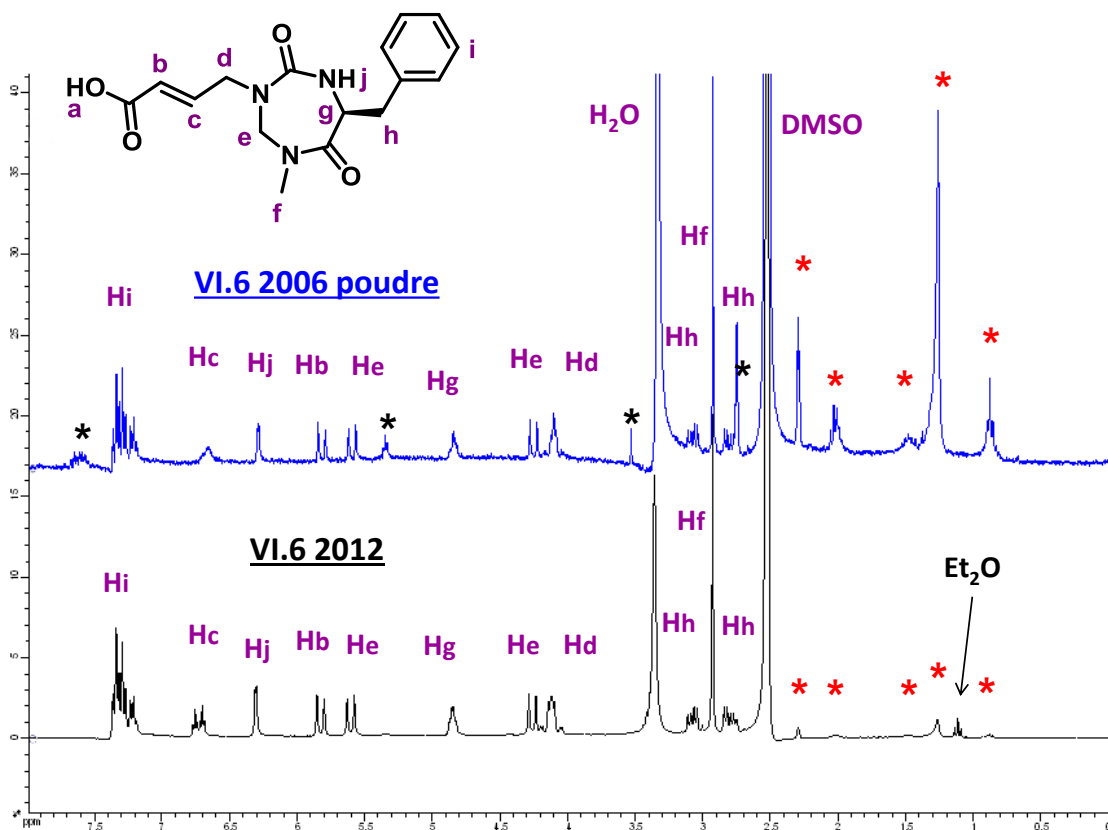
	VI.6 (2006) <sup>a</sup>	VI.6 (2006) <sup>b</sup>	VI.6 2006 poudre <sup>b</sup>	VI.6 (2012) <sup>b</sup>
hGX (%)	24	4	9	78

a) test réalisé en 2006, b) test réalisé en 2013

**Tableau VI.4** : activités enzymatiques résiduelles de la sPLA<sub>2</sub> hGX en présence de différents lots de **VI.6**

La différence d'activité entre les trois lots de **VI.6** datant de 2006 (colonnes 1, 2 et 3, **tableau VI.4**) n'est pas significative puisque les tests n'ont été réalisés qu'une seule fois, une barre d'erreur n'a donc pas pu être calculée. D'après les résultats de ce tableau, il semblerait que les solutions stocks ne soient pas responsables des différences d'activité puisque la poudre de 2006 est aussi active que la solution stock dans le DMSO (colonnes 2 et 3, **tableau VI.4**).

La stabilité au cours du temps du petit échantillon de poudre daté de 2006 a également été vérifiée par spectroscopie RMN (**figure VI.16**).



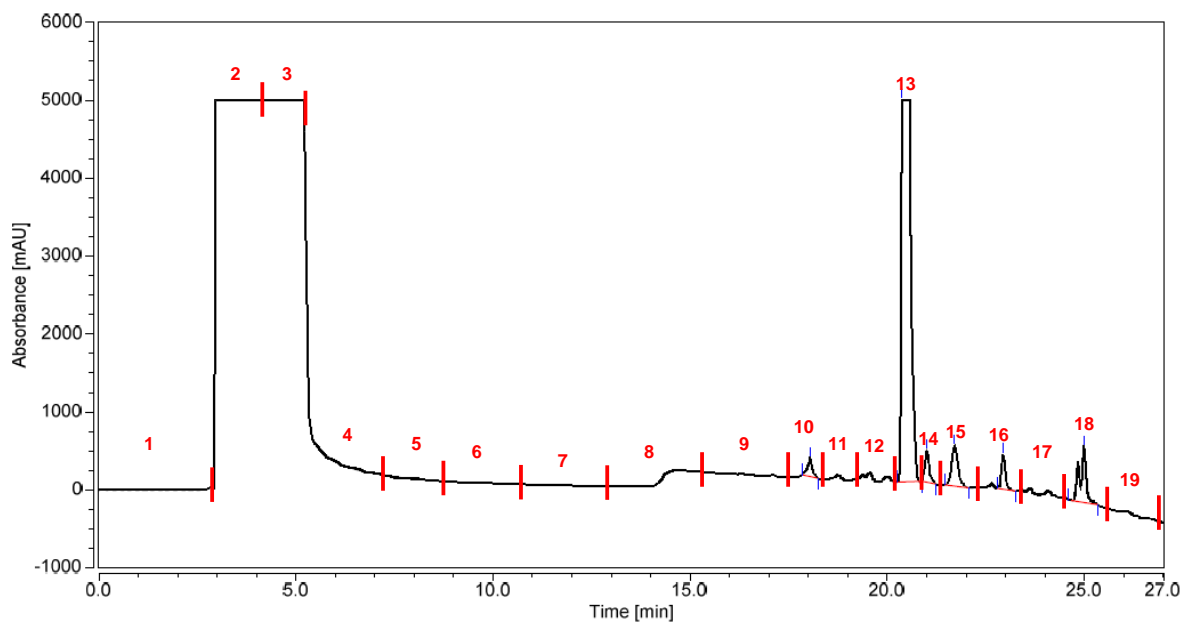
\* : pics non identifiés présents sur les deux spectres RMN, \* : pics non identifiés seulement présents sur le spectre RMN de **VI.6 poudre 2006**.

**Figure VI.16** : spectres RMN (300 MHz, 298 K) du composé **VI.6** poudre de 2006 (bleu, concentration  $< 1 \text{ mg.ml}^{-1}$ , DMSO- $d_6$ ) et du composé **VI.6** de 2012 (noir, concentration =  $5 \text{ mg.ml}^{-1}$ , DMSO- $d_6$ )

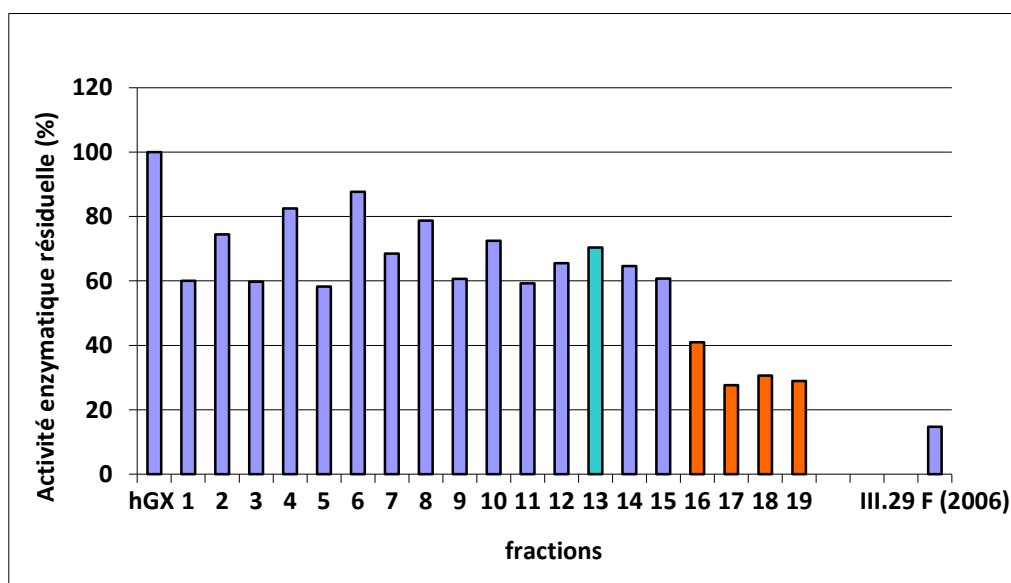
D'après les spectres RMN de la **figure VI.16**, le composé **VI.6** est bien présent dans les lots de **2006** et **2012**. Toutefois, si les deux composés présentent un même profil d'impuretés, leur quantité est plus importante dans le lot de 2006 que dans celui de 2012.

### III.2. Identification des composés responsables de l'inhibition

Une fraction de solution (0,4 ml d'une solution à 10 mM) de composé **III.30 F** dans le DMSO datant de 2006 a été purifiée par HPLC préparative en phase inverse ( $C_{18}$ -HPLC, A : 0.1% TFA in  $H_2O$ , B : 0.1% TFA in  $CH_3CN$ , 65-100% B, 4 mL/min, 10 min) (**figure VI.17**) et toutes les fractions obtenues ont été testées sur la  $sPLA_2$  hGX (**diagramme VI.6**).



**Figure VI.17** : chromatogramme de l'HPLC préparative du composé **III.30 F** datant de 2006 (conditions, voir texte, détection à 205 nm)



**Diagramme VI.6** : activités inhibitrices des fractions du composé **III.30 F** de 2006 (la fraction **13** contient le pic correspondant au produit).

Les fractions isolées par HPLC préparative ont été lyophilisées puis mis en solution dans 400  $\mu$ L de DMSO. La fraction contenant le composé **III.30 F** (fraction 13, **diagramme VI.6**) n'est pas active au contraire des fractions de fin de purification. Sur le chromatogramme HPLC avec la détection à 205 nm, certaines de ces fractions actives ne montrent aucune absorption (**figure VI.17**).

Les composés actifs présents dans les fractions 16 à 19 (éluées à fort pourcentage de MeCN) sont donc des composés lipophiles n'absorbant pas ou peu à 205 nm. Des résidus hydrophobes (provenant des solvants de purifications ?) ou des graisses pouvant mimer les phospholipides substrats naturels des sPLA<sub>2</sub> pourraient être responsables de l'activité observées dans ces fractions mais pour l'instant, les preuves sont manquantes.

## IV. Etude structurale des sPLA<sub>2</sub> secrétées

Pour essayer de clarifier le rôle des 1,3,5-triazépane-2,6-diones dans l'inhibition des sPLA<sub>2</sub> hGV et hGX, une étude de co-cristallisation du composé **VI.6** avec la sPLA<sub>2</sub> hGX a été menée (avant la mise en évidence de la perte d'activité sur ce composé). Cette étude avait pour but d'identifier le site de liaison de l'inhibiteur ainsi que les éventuelles interactions entre l'inhibiteur et sa cible.

### IV.1. Mise au point des conditions de cristallisation de la sPLA<sub>2</sub>

#### hGX

Les premières structures cristallographiques des sPLA<sub>2</sub> qui ont été publiées sont celles issues des venins de serpents ou d'abeilles dans les années 1980.<sup>262</sup> Au début des années 1990, Sigler et son équipe ont publié des structures de la sPLA<sub>2</sub> issue du venin de cobra *Naja naja naja*<sup>263</sup> et celle issue du venin d'abeille en présence d'un inhibiteur analogue de l'état de transition.<sup>264</sup> A ce jour, parmi les enzymes d'origine humaine, seules les structures des sPLA<sub>2</sub> hGIB<sup>4</sup>, hGIIA<sup>76, 265</sup> et hGX<sup>255</sup> ont été publiées.

Dans le cas de l'étude de l'inhibition des sPLA<sub>2</sub> hGV et hGX par les 1,3,5-triazépane-2,6-diones, l'obtention d'une structure cristallographique de protéine en présence d'un hétérocycle aurait deux avantages :

- connaître le mode d'inhibition des sPLA<sub>2</sub> par les 1,3,5-triazépane-2,6-diones,
- permettre la synthèse de nouveaux inhibiteurs plus puissants par une approche rationnelle aujourd'hui difficile.

Devant les problèmes de solubilité de la sPLA<sub>2</sub> hGV, les premiers efforts de cristallisation ont été employés pour la sPLA<sub>2</sub> hGX. Les échantillons de ces deux enzymes nous ont été donnés

par Gérard Lambeau. Les tests de cristallisation ont été initiés avec l'aide de Brice Kauffmann de la plateforme de biologie structurale de l'Institut et ont ensuite été largement repris par Gavin Collie un chercheur post-doctoral dans l'équipe de Gilles Guichard.

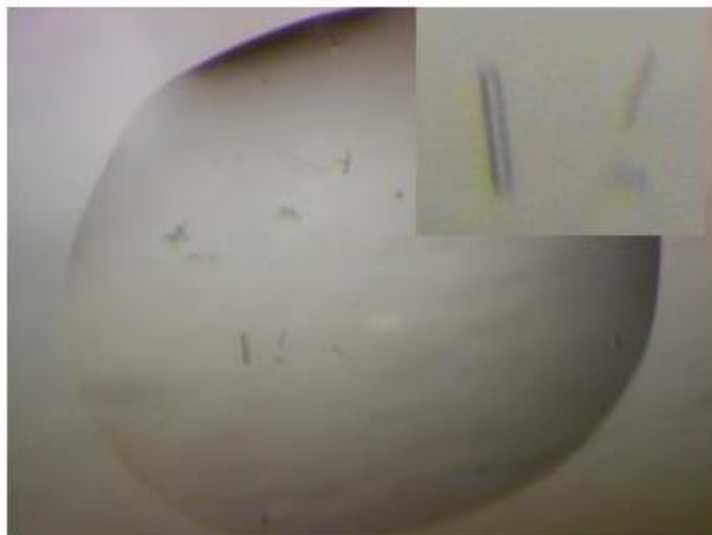
La mise au point des conditions de cristallisation de la protéine a été réalisée en deux parties : dans un premier temps, un screening a été réalisé grâce à différents kits commerciaux dans le but de trouver une condition donnant des cristaux puis dans un deuxième temps, les conditions de cristallisation ont été affinées afin d'obtenir des cristaux de tailles suffisantes pour l'analyse de diffraction des rayons X.

La présence de calcium étant nécessaire pour réaliser la cristallisation de la protéine,<sup>255</sup> la sPLA<sub>2</sub> hGX a été dissoute dans une solution aqueuse contenant 20 mM de CaCl<sub>2</sub> jusqu'à obtention d'une concentration de protéine de 15 mg/ml, puis deux kits de cristallisation ont été testés (Kit généraliste JCSG + et Jena Bioscience (Kit MPD 7 et 8)) à 4°C et à température ambiante.

Deux conditions du kit de Jena Bioscience (Kit MPD 7 et 8) ont permis l'obtention de cristaux mais de petites tailles : Kit JBS 7 condition C5 (30 % w/v MPD, 10 % w/v PEG 4000, 100 mM Imidazole-HCl, pH = 8) et Kit JBS 8 condition A3 (50 % w/v MPD, 100 mM Tris-HCl, pH = 8,5, 100 mM Ammonium dihydrogen Phosphate). A partir de ces données préliminaires, Gavin Collie a identifié de nouvelles conditions de cristallisation conduisant à l'obtention de monocristaux de tailles suffisantes pour permettre l'analyse par diffraction des rayons X : 30-35 % MPD (2-Méthyl-2,4-Pentanediol), 10 % PEG 3350/4000, 5-17 % glycérol, imidazole pH 8.0, protéine 2-10 mg/ml et 3 équivalents d'inhibiteur (composé **VI.6**). Ces tests de co-cristallisation ont été effectués avant la remise en question de l'activité du composé **VI.6**.

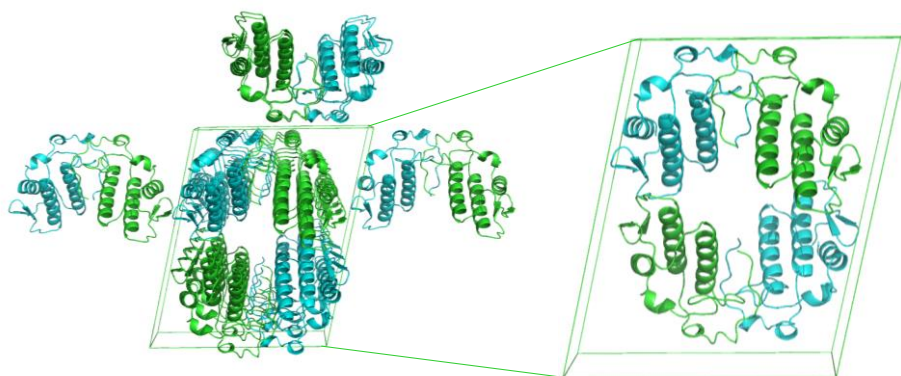
## IV.2. Structures de la sPLA<sub>2</sub> hGX sous forme apo

Les cristaux obtenus sont sous forme de baguettes de 50x20x20 µm (**figure VI.18**) et les données collectées au synchrotron ESRF (Grenoble, source ID 23-2).



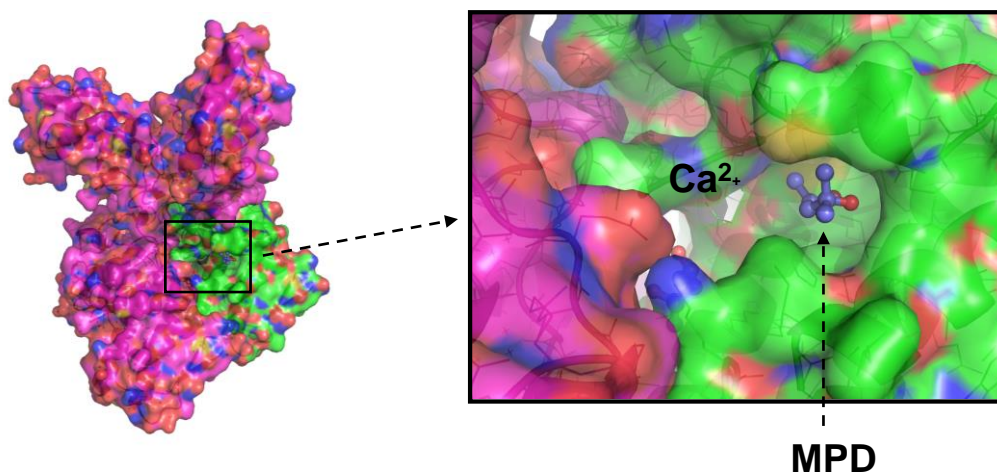
**Figure VI.18** : photos de la goutte (1 $\mu$ L) contenant les cristaux de sPLA<sub>2</sub> hGX (protéine : 2 mg/ml)

La structure a ensuite été résolue par Gavin Collie en utilisant le remplacement moléculaire et avec une résolution de 1,8 Å. D'après l'analyse de la diffraction de rayons X, la sPLA<sub>2</sub> hGX cristallise dans le groupe d'espace P2<sub>1</sub>, ce groupe d'espace avait été identifié par Pan et coll.<sup>255</sup> La maille élémentaire (a = 61 Å, b = 29 Å, c = 77 Å,  $\alpha$  = 90°,  $\beta$  = 102°,  $\gamma$  = 90°) contient deux unités asymétriques qui sont chacune constituée de deux protéines liées par un axe de rotation non-cristallographique (**figure VI.19**).



**Figure VI.19** : maille cristallographique de sPLA<sub>2</sub> hGX constituée de deux unités asymétriques

Le site actif de l'enzyme se trouve à proximité de l'interface de deux protéines formant une unité asymétrique (**figure VI.20**).



**Figure VI.20** : localisation du site actif d'une protéine à l'intérieur de la maille.

Bien que trois équivalents de composé **VI.6** soient présents dans la solution de cristallisation le site actif est en fait occupé par une molécule de MPD. Ceci est expliqué par la grande quantité de MPD présente dans les solutions de cristallisation (entre 30 et 35 %). En comparaison, la condition de cristallisation développée par Pan et coll. ne contient que 10 % de MPD.<sup>255</sup> Mais, les tentatives de réduction de la quantité de MPD dans ces solutions ont entraîné une perte de la cristallisation.

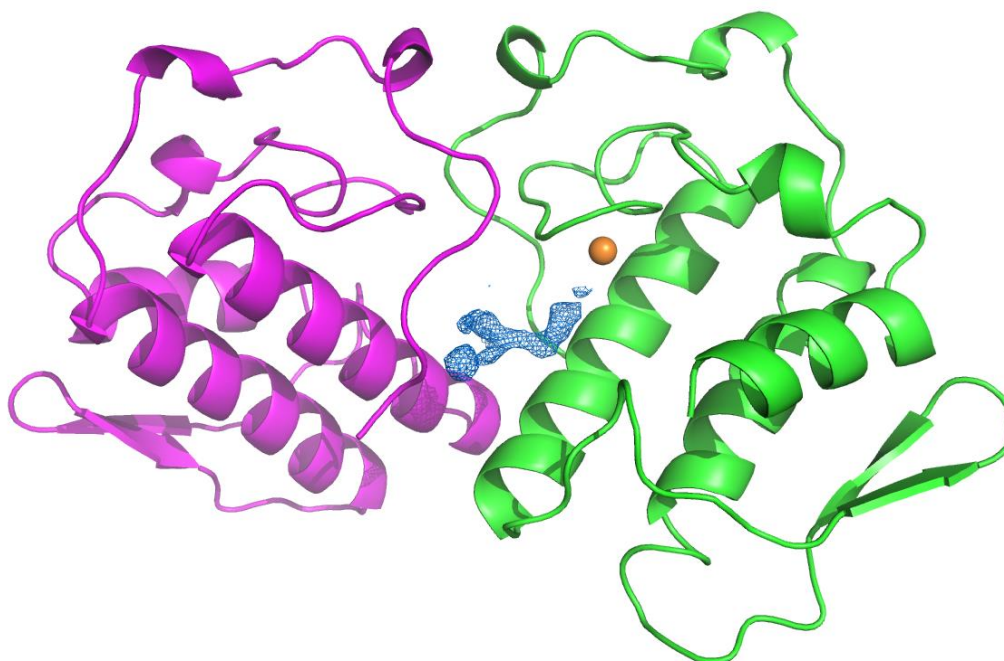
### IV.3. Co-cristallisation de sPLA<sub>2</sub> hGX avec VI.6

Il existe deux méthodes pour obtenir une structure cristalline de protéine liée à un ligand :

- la co-cristallisation : le ligand et la protéine sont tous les deux mis en solution dans la solution de cristallisation initiale,
- le soaking : un cristal de protéine déjà formé est plongé dans une solution de cristallisation contenant le ligand.

Comme il a été montré au paragraphe précédent, le site actif de la protéine est occupé par une molécule de MPD bien que l'inhibiteur soit présent dans la solution de cristallisation. Les cristaux de protéines ont donc été plongés dans une solution de cristallisation contenant dix équivalents du composé **VI.6**.

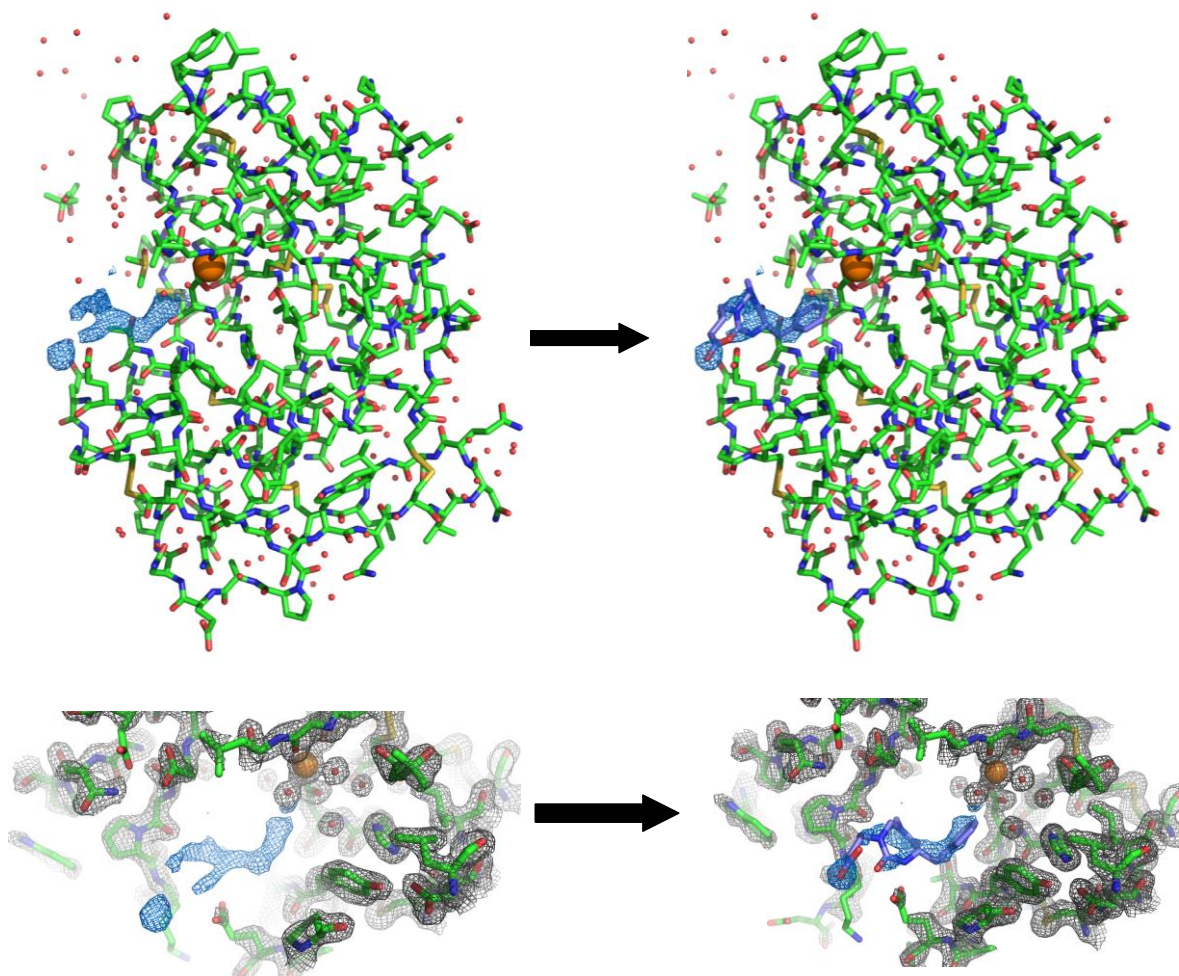
Les données obtenues par diffraction des rayons X (structure résolue à 1,8 Å) ont mis en évidence la présence d'une densité électronique se trouvant à l'interface des deux protéines de l'unité asymétrique (**figure VI.21**).



**Figure VI.21** : position de la densité électronique (bleu) à l'interface des deux enzymes de l'unité asymétrique

Il semblerait donc que deux protéines se partagent la densité électronique additionnelle. Mais cette densité semble être proche du site actif d'une seule protéine, le site actif de la seconde protéine se trouvant à l'opposé de la densité électronique additionnelle. L'analyse de la position de la densité électronique par rapport à une seule protéine montre que celle-ci est positionnée à la sortie du site actif (**figure VI.22**).



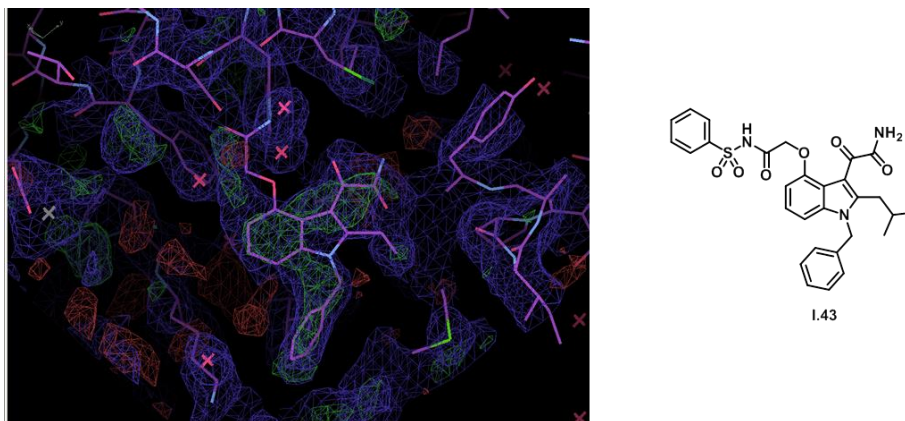


**Figure VI.22** : densité électronique existante à proximité du site actif de sPLA<sub>2</sub> hGX et tentative de modélisation de VI.6.

Cette densité électronique (**figure VI.22** à gauche) ne correspond en aucun cas à une molécule de MPD en revanche, elle pourrait correspondre au composé VI.6 (**figure VI.22**, à droite). Si cette hypothèse est validée cela pourrait expliquer la faible activité du composé VI.6 vis-à-vis de la sPLA<sub>2</sub> hGX. En effet, le composé VI.6 ne ferait aucune interaction ni avec le calcium ni avec aucun acide aminé du site actif, en revanche, de par son positionnement, il pourrait gêner l'entrée du phospholipide dans le site actif ou bien la sortie des produits issus de l'hydrolyse.

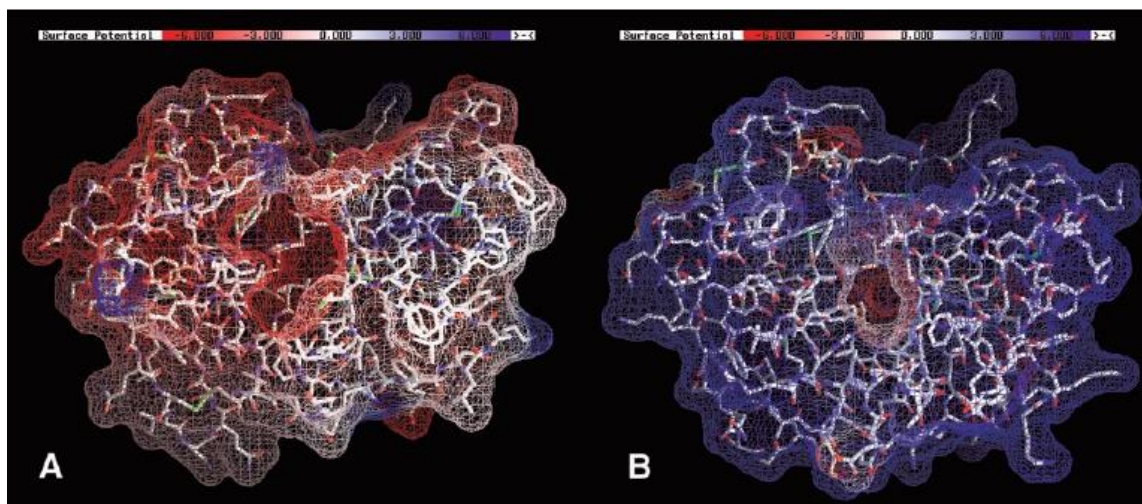
Au cours des essais de cristallisation, Gavin Collie a utilisé un inhibiteur de sPLA<sub>2</sub> très puissant (composé I.43, **figure I.25**, **chapitre I**, IC<sub>50</sub> = 21,7 nM) afin de visualiser de la densité électronique de cette molécule dans le site actif de la sPLA<sub>2</sub> hGX et avoir une structure de

référence. Des cristaux ont été obtenus par co-cristallisation et la structure a été résolue après collecte au synchrotron Soleil (ligne PX1). Mais même si dans ce cas favorable, il est possible de détecter une densité électronique dans le site actif (**figure VI.23**), la modélisation de la structure de l'inhibiteur reste difficile.



**Figure VI.23** : densité électronique à l'intérieur du site actif de hGX suite à la cocrystallisation avec l'inhibiteur **I.43**

Dans la base de donnée PDB, il existe huit structures de la sPLA<sub>2</sub> hGIIA avec ou sans inhibiteurs (code pdb : 3U8B,<sup>266</sup> 3U8D,<sup>266</sup> 1KQU,<sup>77</sup> 1N28,<sup>267</sup> 1N29,<sup>267</sup> 1N1A,<sup>77</sup> 1POE,<sup>76</sup> 1POD<sup>76</sup>) mais seulement deux structures de la sPLA<sub>2</sub> hGX sous forme apo, obtenues en 2002 (code pdb 1LE6 et 1LE7) par Pan et collaborateurs.<sup>255</sup> La structure du complexe entre la sPLA<sub>2</sub> hGX et le **Me-indoxam** décrite par le groupe de Mike Gelb en 2004 n'apparaît pas dans la pdb.<sup>112</sup> Dans leurs travaux, Pan et son équipe ont étudié les différences entre les structures sPLA<sub>2</sub> hGIIA et hGX (**figure VI.23**).<sup>255</sup>



**Figure VI.24** : structures cristallographiques de hGX (A, code pdb : 1LE6)<sup>255</sup> et hGIIA (B, code pdb = 1POD)<sup>76</sup>

Les sites actifs des enzymes sont visibles au centre de chaque structure. Le site actif de la sPLA<sub>2</sub> hGX (**figure VI.24**, à gauche) est plus ouvert et plus grand que celui de la sPLA<sub>2</sub> hGIIA (**figure VI.24**, à droite). Cette différence de taille entre les sites actifs peut expliquer les difficultés rencontrées pour obtenir des co-cristaux de qualité et pour identifier la densité électronique au sein du site actif de la sPLA<sub>2</sub> hGX. En effet, si le site actif est très ouvert, l'inhibiteur peut être davantage mobile et donc la densité électronique globale, qui est une moyenne des densités électroniques dans la protéine, est faible.

Le recours à la cristallographie pour optimiser de manière rationnelle les inhibiteurs de sPLA<sub>2</sub> hGX restant à ce jour difficile, un criblage virtuel d'une partie de notre collection de 1,3,5-triazépane-2,6-diones sur la sPLA<sub>2</sub> hGX a été effectué en collaboration avec Jean Dessolin (Equipe modélisation, laboratoire de Chimie et Biologie des membranes et des Nano-objet, Pessac) pour essayer d'identifier de nouveaux inhibiteurs.

## V. Criblage virtuel sur la sPLA<sub>2</sub> hGX : recherche de nouveaux inhibiteurs de sPLA<sub>2</sub>

### V.1. Généralités

Le criblage virtuel à haut débit a pour but soit d'identifier une cible biologique pour des molécules, ce qui a permis l'identification des sPLA<sub>2</sub> comme cibles potentielles des 1,3,5-triazépane-2,6-diones,<sup>148</sup> soit de découvrir de nouveaux composés actifs, pour une cible connue, à partir d'une chimiothèque ou d'une base de données.<sup>268</sup>

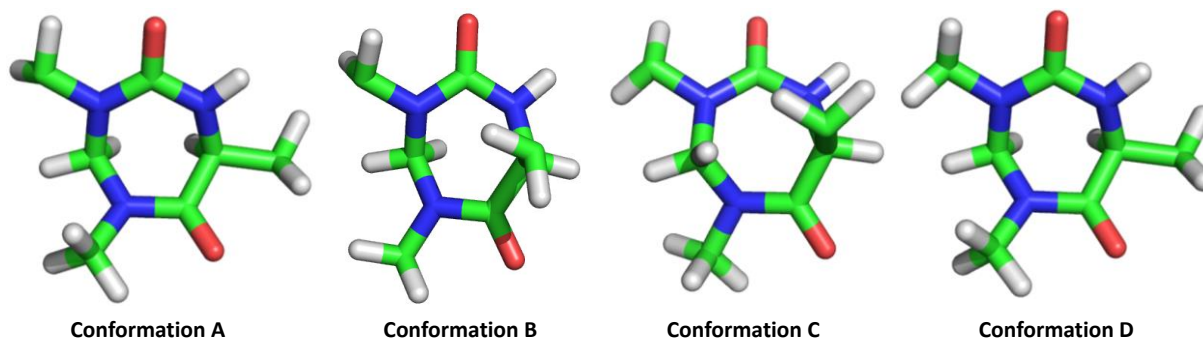
Lorsque la structure tridimensionnelle de la cible biologique est connue, une approche dite "structure based" peut être envisagée (cela signifie que l'on se base sur la connaissance du site actif de la cible protéique, donc de ses coordonnées tridimensionnelles). Lors de cette approche, les différentes interactions susceptibles de se former entre la cible et son ligand peuvent être déterminées ce qui entraîne la classification des ligands en fonction de leur capacité à s'arrimer à la cible biologique, on parle dans ce cas de "docking" moléculaire.

Une fois le criblage terminé, les composés ayant les meilleures affinités sont sélectionnés comme étant prometteurs (ces composés sont appelés "hits") puis une nouvelle sélection amène aux molécules tête de série (appelées "leads"). Une molécule est considérée comme un véritable "lead" après avoir fait preuve d'une activité biologique lors de tests *in-vitro*. Ces molécules "leads" serviront de point de départ pour la conception de nouveaux composés lors d'une étape appelée "drug design".

Lors d'une expérience de "docking", la position du ligand au sein du site actif de la cible est prédit puis la stabilité ainsi que la conformation du complexe ligand/cible sont évaluées. Des algorithmes permettent de simuler les interactions recréant une approche dynamique du ligand à l'intérieur du site actif et ceci afin d'explorer les conformations possibles lors de l'arrimage. A chaque complexe ligand/récepteur est associé un "score" qui est obtenu par une fonction de scoring et qui s'apparente à une énergie définissant la stabilité du complexe (K<sub>d</sub>, K<sub>a</sub>, K<sub>i</sub>).

## V.2. Criblage de la chimiothèque de 1,3,5-triazépane-2,6-diones

La chimiothèque virtuelle de 1,3,5-triazépane-2,6-diones qui a été utilisée pour les études de docking est constituée de 117 hétérocycles qui ont été synthétisés et qui sont disponibles au laboratoire. Une étude conformationnelle des hétérocycles a été réalisée grâce au logiciel MacroModel et à un algorithme de Monte-Carlo (algorithme appliquant un ensemble de rotations et de translations de façon aléatoire et mesurant la stabilité de la nouvelle conformation par rapport à la précédente). Le but de cette étude était de fixer la conformation du cycle à 7 chaînons afin de réaliser les expériences de docking. Quatre conformations ont été identifiées comme étant les plus stables et donc représentatives de l'ensemble des conformations possibles du squelette triazépanedione. Et parmi elles, trois sont superposables avec les conformations observées par cristallographie (géométries A, B et C précédemment décrites) (**figure VI.25**). La dernière conformation (D) possède un angle  $\alpha$  entre les plans de l'urée et de l'amide de  $128^\circ$  et le groupement  $R^2$  en position pseudo-équatorial.



**Figure VI.25** : conformations du cycle à sept chaînons identifiées comme stables

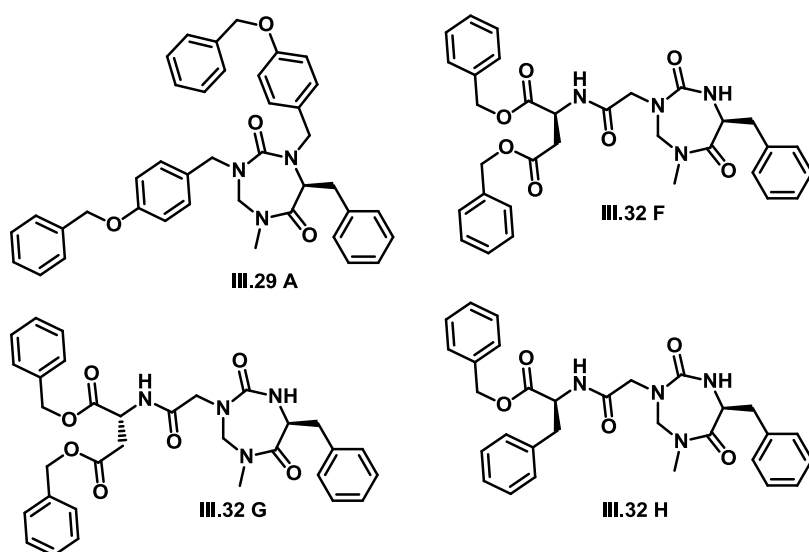
La conformation D est une conformation intermédiaire entre la conformation A ( $\alpha = 115^\circ$  et  $R^2$  en position pseudo-équatoriale) et la conformation C ( $\alpha = 127^\circ$  et  $R^2$  en position pseudo-axiale).

La cible utilisée pour ce criblage est la protéine sPLA<sub>2</sub> hGX puisque sa structure cristallographique *apo* (sans ligand) a été publiée dans la base de données PDB (code 1LE6) et a été déterminée à nouveau au laboratoire. Dans un premier temps, la cible est préparée, c'est-à-dire que les molécules d'eau sont éliminées à l'exception des deux molécules

présentes dans le site actif puis le ligand Me-Indoxam est positionné manuellement à l'intérieur du site actif de façon à reproduire la pose obtenue en cristallographie<sup>112</sup> ceci afin de poser les limites du site actif utilisé lors du docking.

Trois programmes de docking ont été sélectionnés et comparés à l'aide d'un ensemble d'inhibiteurs connus et très actifs : les dérivés indoles et indolizines proposés par Gelb et son équipe.<sup>113</sup> Les programmes CDOCKER, Vina et Gold n'ont pas permis de corrélérer les résultats obtenus par le docking aux résultats des tests enzymatiques. Il s'est avéré que le principal problème de ces études était la présence du calcium à l'intérieur du site actif. En effet, les interactions électrostatiques entre le ligand et le calcium n'étaient pas toujours pris en compte dans les fonctions de scoring alors qu'il s'agit d'un élément essentiel de l'inhibition. Néanmoins, les poses proposées par Gold étant les plus vraisemblables, ce programme a été choisi pour une étude de rescoring et de consensus. Les scores ont été recalculés par d'autres fonctions de score puis un consensus a été appliqué. Ce dernier est une combinaison de deux ou trois fonctions de score indépendantes permettant l'élimination des "faux-positifs". A la suite de cette étude, la combinaison des meilleures fonctions de score a été déterminée et utilisée lors du criblage de la chimiothèque de triazépanedione. Le résultat complet du criblage virtuel réalisé par M<sup>elle</sup> Marie-France Bakai et M<sup>r</sup> Rémy Bailli dans le cadre de leurs stages de fin d'étude n'est pas détaillé ici.

Sur les 117 composés dockés, quatre ont été sélectionnés pour des tests enzymatiques (figure VI.26).

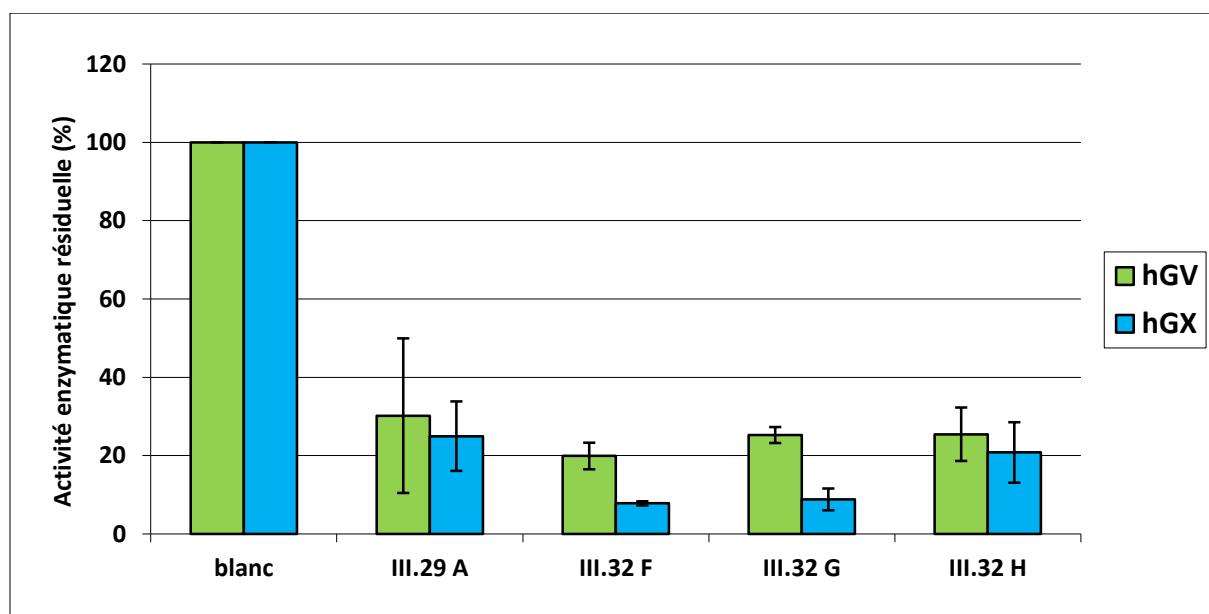


**Figure VI.26** : composés de la chimiothèques sélectionnés par criblage virtuel sur sPLA<sub>2</sub> hGX

Ces composés ont tous été préparé dans le cadre de la création des chimiothèques (chapitre III, section III). Le composé **III.29 A** a été purifié par colonne chromatographique sur gel de silice et les composés **III.32** ont tous été purifiés une première fois par colonne chromatographique puis par précipitation dans un mélange dichlorométhane/hexane. Il est intéressant de noter que les composés **III.32 F**, **III.32 G** et **III.32 H** sont similaires, les deux premiers étant diastéréomères.

### V.3. Evaluation biologique des composés sélectionnés

Les molécules sélectionnées disponibles dans la chimiothèque ont été testées à une concentration de 30  $\mu\text{M}$  sur les sPLA<sub>2</sub> hGV (1 nM) et hGX (0,2 nM) (**diagramme VI.7**).



**Diagramme VI.7** : Tests enzymatiques réalisés avec les composés sélectionnés par simulation moléculaire

D'après le **diagramme VI.5**, les composés issus du criblage virtuel semblent actifs sur les deux enzymes avec des IC<sub>50</sub> inférieurs à 30  $\mu\text{M}$ . Mais la barre d'erreur est importante pour le composé **III.29 A**. Ce composé a été testé une première fois après purification sur colonne de gel de silice et s'est révélé très actif, puis il a été repurifié par RP-HPLC préparative (C<sub>18</sub>-HPLC, A : 0.1% TFA dans H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA dans CH<sub>3</sub>CN, 65-100% B, 4 mL/min, 10 min) et la fraction contenant le produit s'est révélée moins active (**tableau VI.6**). Les pourcentages

présentés dans le **tableau VI.5** représentent l'activité inhibitrice résiduelle des enzymes en présence de 30  $\mu$ M du composé **III.29 A**.

	<b>III.29 A après purification par chromatographie colonne</b>	<b>III.29 A après repurification par HPLC préparative</b>
<b>hGV (%)</b>	16 %	58 %
<b>hGX (%)</b>	18 %	37 %

**Tableau VI.5** : comparaison des activités inhibitrices du composé **III.29 A** à 30  $\mu$ M sur les sPLA<sub>2</sub> hGV et hGX après purification par chromatographie éclair sur gel de silice et après repurification par RP-HPLC préparative

Sur la sPLA<sub>2</sub> hGV, l'activité enzymatique résiduelle passe de 16 % à 58 % après la purification par HPLC préparative. La différence d'activité est plus faible sur la sPLA<sub>2</sub> hGX puisque l'activité enzymatique résiduelle est passée de 18 % à 37 %. Lors de la discussion sur la différence d'activité entre les lots de composés **III.30 F** et **VI.6**, l'hypothèse d'existence de d'impuretés hydrophobes (graisses ?, résidus de solvants ?) avait été émise pour expliquer la forte inhibition des lots de 2006. Cette hypothèse peut être de nouveau formulée dans le cas du composé **III.29 A** mais également dans le cas du composé **VI.15 A (diagramme VI.3)**. En effet, ce dernier a perdu toute activité inhibitrice après repurification par RP-HPLC préparative.

Etant donné la perte d'activité partielle ou totale des composés purifiés par RP-HPLC préparative, les fortes activités des composés **III.32 F, G** et **H** sont donc à analyser avec précaution. Néanmoins, le composé **III.29 A** est tout de même actif sur la sPLA<sub>2</sub> hGX avec une IC<sub>50</sub> en dessous de 30  $\mu$ M, donc la simulation moléculaire a permis de sélectionner au moins un composé actif sur les deux sPLA<sub>2</sub>. Aucun de ces composés ne présente d'activité sur les sPLA<sub>2</sub> hGIB et hGIIA.

## VI. Conclusion

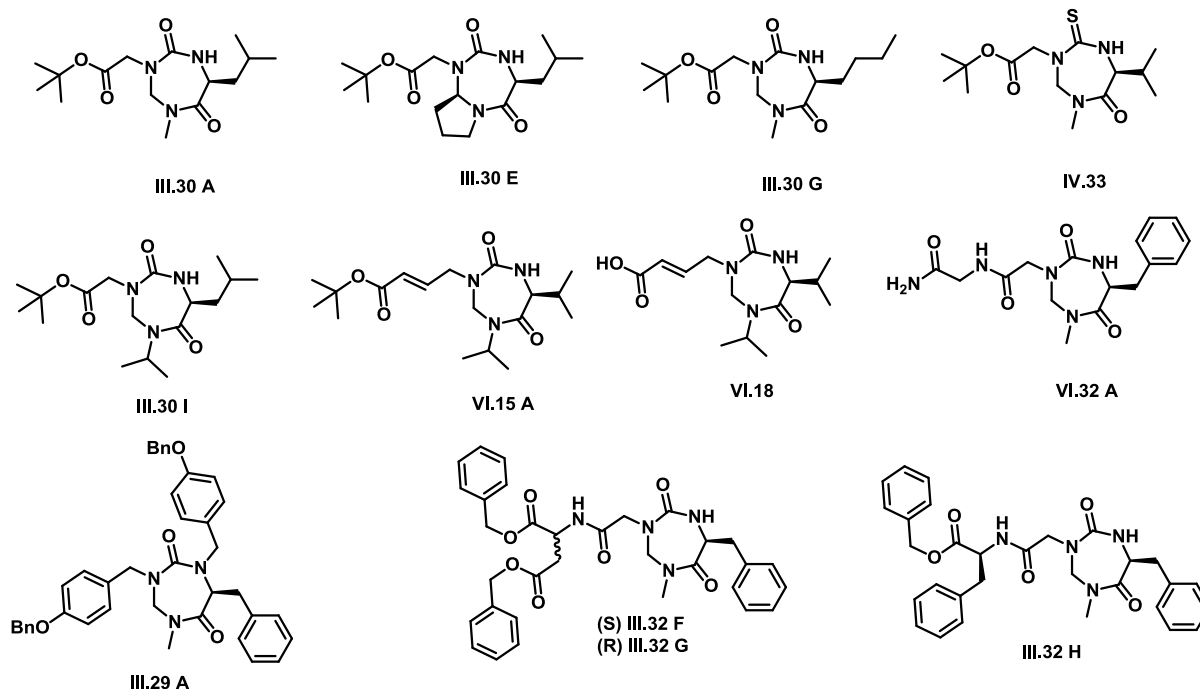
Les composés **III.30 F** et **VI.6** sont deux composés de référence issus d'un premier travail de criblage des 1,3,5-triazépane-2,6-diones sur les sPLA<sub>2</sub>s démarré avant mon arrivée en thèse. Ces composés ont démontré une activité plus spécifique sur les phospholipases A<sub>2</sub> sécrétées



humaines des groupes V et X avec des  $IC_{50}$  compris entre 10 et 20  $\mu M$ . Afin de reconstituer les stocks, ces molécules de référence ont été re-synthétisés dans le cadre de ma thèse mais les nouveaux lots se sont avérés non-actifs pour une raison encore inconnue (présence de micro impuretés dans les lots de 2006 ?).

Néanmoins, plusieurs nouveaux analogues de ces composés **III.30 F** et **VI.6** ont été synthétisés et testés sur les sPLA<sub>2</sub> hGV et hGX à une concentration de 30  $\mu M$ . Sur les 37 composés testés, 8 présentent une  $IC_{50}$  inférieure à 30  $\mu M$  (**figure VI.27**). Aucun de ces analogues n'est actif sur les sPLA<sub>2</sub> hGIB et hGIIA. Néanmoins, un doute persiste sur l'activité des composés **VI.15 A** et **VI.18** puisque **VI.15 A** a perdu son activité inhibitrice après re-purification par HPLC préparative en phase inverse.

Le recours à la cristallographie pour comprendre le mode d'action du composé **VI.6** sur la sPLA<sub>2</sub> hGX n'a pas permis à ce jour d'obtenir de résultat probant. En revanche, le criblage virtuel de la chimiothèque des 1,3,5-triazépane-2,6-diones disponible au laboratoire a conduit à la découverte de nouvelles molécules actives : **III.29 A**, **III.32 F**, **III.32 G** et **III.32 H** (**figure VI.27**).

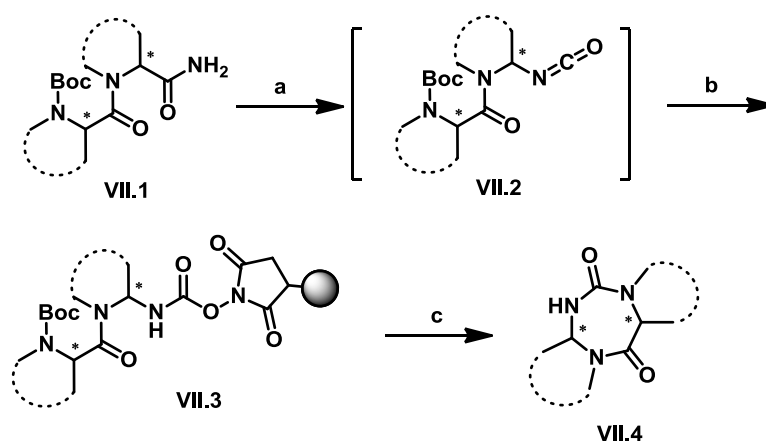


**Figure VI.27** : composés présentant une activité sur les sPLA<sub>2</sub> hGV et hGX

Il ressort de cette étude que le test d'activité inhibitrice sur les sPLA<sub>2</sub> de groupe V et X humaine est très sensible à la qualité des composés testés et est potentiellement générateur de faux positifs. Malgré la robustesse de la voie de synthèse parallèle mise au point pendant ma thèse et la bonne pureté des cycles obtenus après cyclo-clivage et précipitation dans l'éther, le criblage direct des 1,3,5-triazépane-2,6-diones préparées par les techniques de synthèse parallèle semble délicat et nous devons garder un regard critique sur tous les résultats positifs obtenus. Il en est également de même pour un certain nombre de composés purifiés par chromatographie sur gel de silice. Face à cette difficulté, nous pouvons proposer deux approches à mettre en place de manière systématique pour garantir la fiabilité des résultats obtenus. La purification HPLC sur phase inverse semble être la seule manière d'obtenir de manière reproductible les composés avec un degré de pureté suffisant. Il conviendrait donc soit de purifier au préalable tous les produits à tester par HPLC en phase inverse, soit d'effectuer un premier crible avec des produits de moindre qualité et de systématiquement repurifier les composés actifs en vue d'un deuxième test de confirmation.

## Conclusion générale

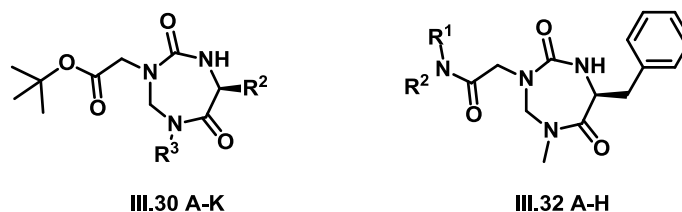
L'un des objectifs de ma thèse était la mise en place d'une synthèse en parallèle sur support solide de 1,3,5-triazépane-2,6-diones permettant la création d'une chimiothèque aussi diversifiée que possible. L'étape clé de cette synthèse est *le réarrangement d'Hofmann* permettant la formation d'un isocyanate. Ce dernier est ensuite piégé par la résine *N*-hydroxysuccinimide donnant le carbamate activé supporté. Puis l'hétérocycle est obtenu par un simple cyclo-clivage (**schéma VII.1**).



a) PIFA (0,8 éq.), pyridine (1,7 éq.), THF, TA, 1h; b) PS-SuOH (0,2 éq.), TA, THF, 4h; c) (i) TFA/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1), TA, 2 x 25 min, (ii) DIEA (2 éq.), THF, 35°C, 4h

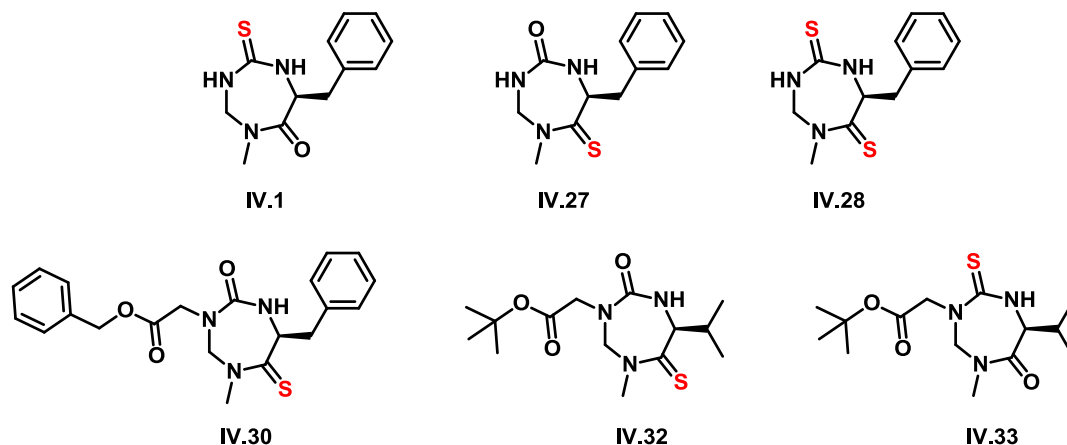
### **Schéma VII.1** : réarrangement de Hofmann et cyclo-clivage

Cette voie de synthèse a permis la constitution d'une chimiothèque de 109 composés. Quelques composés de cette chimiothèque ont été utilisés afin de créer deux nouvelles petites chimiothèques par *N*-mono-alkylation de l'urée : la chimiothèque des composés *N*-mono-alkylés par un groupement acétate de tertio-butyle (composés **III.30**) et la chimiothèque des composés *N*-mono-alkylés présentant une fonction amide (composés **III.32**) (**figure VII.1**).



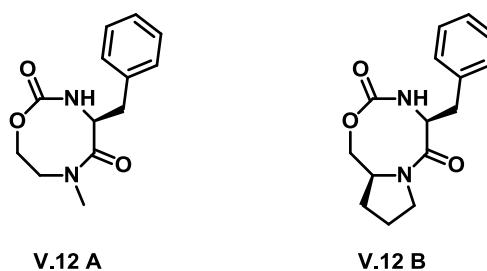
**Figure VII.1** : structures générales des composés **III.30** et **III.32**

Nous avons également montré la possibilité d'augmenter la diversité moléculaire du squelette 1,3,5-triazépane-2,6-dione en remplaçant une fonction carbonyle par une fonction thiocarbonyle (**figure VII.2**) ou bien en augmentant la taille du cycle.



**Figure VII.2** : analogues des 1,3,5-triazépane-2,6-diones présentant une fonction thiocarbonyle

En ce qui concerne la taille de l'hétérocycle, nous avons démontré l'impossibilité d'obtenir un cycle à 8 chaînons possédant une fonction urée et une fonction amide mais nous avons réussi à synthétiser des cycles à huit chaînons en remplaçant la fonction urée par une fonction carbamate (**figure VII.3**).

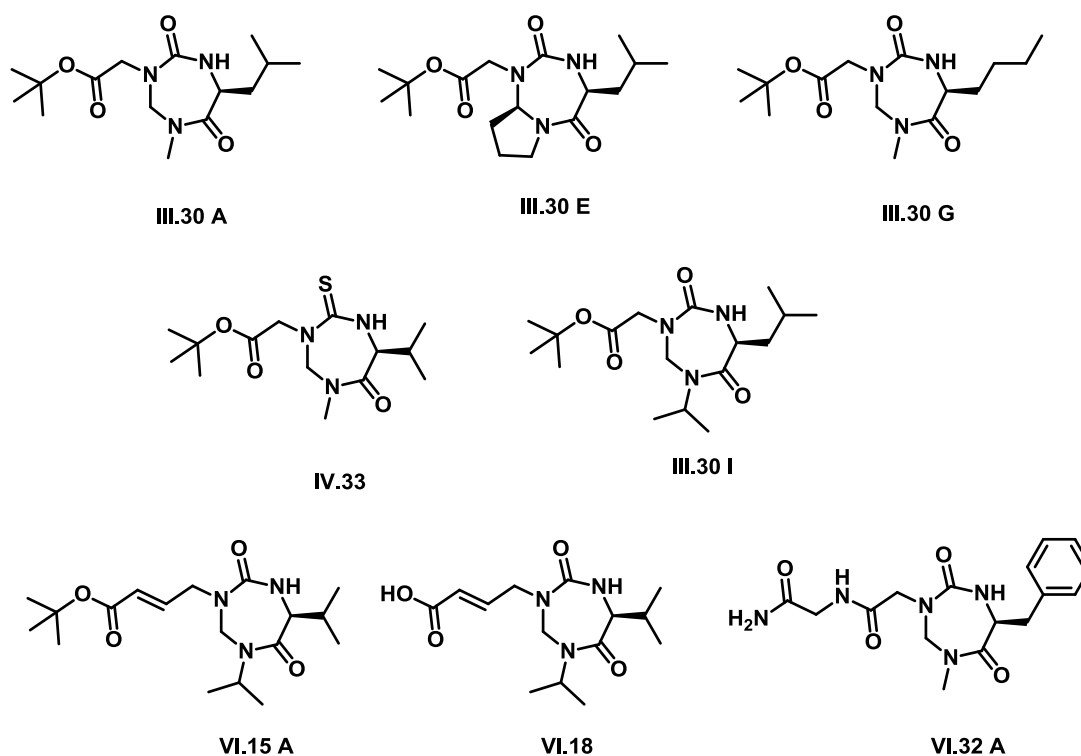


**Figure VII.3** : hétérocycles à huit chaînons possédant une fonction carbamate

Il avait été montré, lors de travaux précédents en collaboration avec le groupe de Gérard Lambeau à l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, que les composés de type 1,3,5-triazépane-2,6-diones étaient des inhibiteurs modestes mais spécifiques de phospholipases A<sub>2</sub> sécrétées humaines des groupes V et X. Les composés de référence (**III.30**

**F** et **VI.6**) avaient des  $IC_{50}$  compris entre 10 et 20  $\mu M$  mais de nouveaux tests enzymatiques ont remis en cause ces activités.

De nouveaux composés analogues à **III.30 F** et **VI.6** ont été synthétisés afin de réaliser une étude de relation structure/activité. Cette étude a permis de découvrir de nouvelles molécules actives (**figure VII.4**).

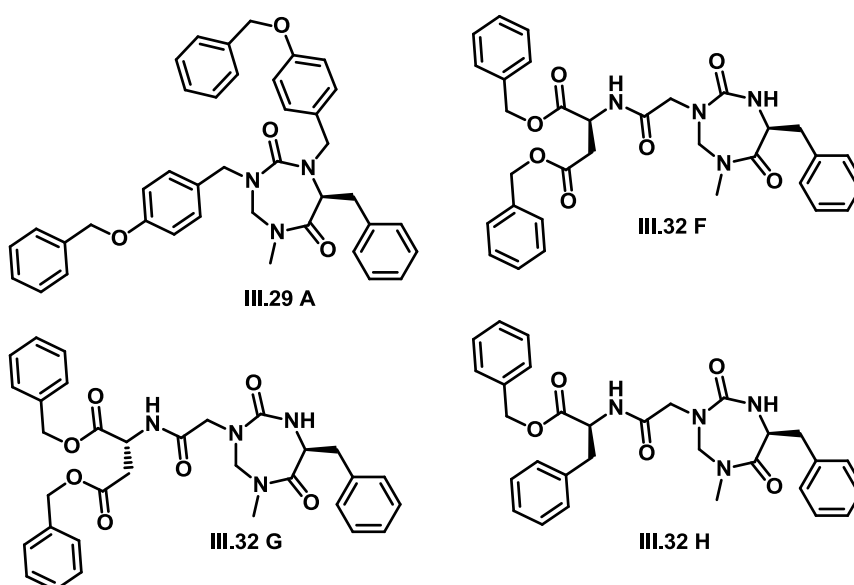


**Figure VII.4** : composés ayant une activité inhibitrice sur les sPLA<sub>2</sub> hGV et hGX

Ces composés ont été sélectionnés puisqu'ils présentent une  $IC_{50}$  inférieure à 30  $\mu M$  néanmoins, la purification par HPLC de **VI.15 A** qui pourtant avait été purifié au préalable par chromatographie sur silice l'a rendu inactif donc des doutes peuvent être émis quant aux autres composés. Seul la molécule **IV.33** a été purifié par HPLC avant le test enzymatique donc nous pouvons être davantage confiants quant à son activité inhibitrice. Ces travaux montrent la sensibilité des tests d'activité enzymatique sur les sPLA<sub>2</sub> ainsi que le risque associé de détection de faux positifs. Ceci impose un cahier des charge extrêmement précis concernant la pureté des composés à tester réduisant l'intérêt de campagnes de cribles (même préliminaires) sur de larges chimiothèques issues de la synthèse parallèle dont les composés n'ont pas fait l'objet de purifications poussées.

Pour nous aider dans la recherche de nouveaux composés actifs et dans l'étude de relation structure/fonction, nous avons mené une campagne de co-cristallisation de l'enzyme sPLA<sub>2</sub> hGX en présence du composé **VI.6** (travail en collaboration avec Gavin Collie un chercheur post-doctoral dans le groupe). Nous avons obtenu plusieurs structures de la forme apo de l'enzyme avec une bonne résolution mais sans parvenir à obtenir une structure de l'enzyme en présence de l'inhibiteur.

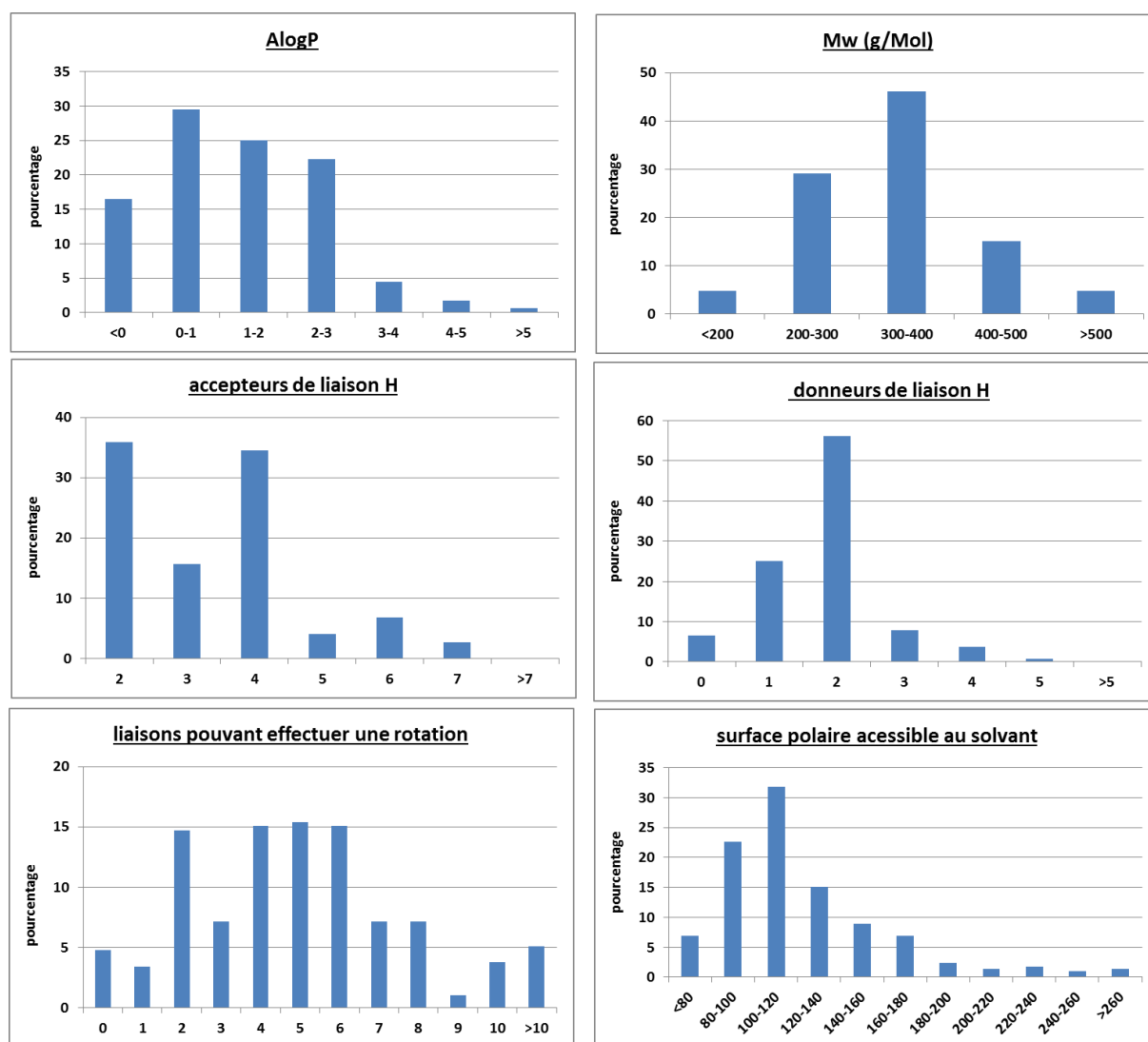
Nous avons également eu recours à des expériences de simulation moléculaire afin de "docking" les dérivés 1,3,5-triazépane-2,6-diones dans le site actif de la sPLA<sub>2</sub> hGX (collaboration avec Jean Dessolin au sein de l'unité). Sur les 117 molécules dockées, quatre ont été sélectionnées (**figure VII.5**) et se sont avérées actives sur les sPLA<sub>2</sub> hGV et hGX avec une IC<sub>50</sub> inférieure à 30 µM.



**Figure VII.5** : composés sélectionnés par criblage virtuel et actifs sur les sPLA<sub>2</sub> hGV et hGX

Grâce à ces travaux, le nombre de dérivés 1,3,5-triazépane-2,6-diones maintenant disponibles dans notre laboratoire est de 292 molécules. Une grande partie a été mise en plaque (solutions stock dans le DMSO à 2 mM) en vue de possibles campagnes de criblage.

En utilisant le logiciel Accelrys de Discovery studio, les calculs de propriétés moléculaires (AlogP, masse moléculaire, nombre d'accepteurs et de donneurs de liaisons H, surface polaire accessible au solvant et nombre de liaisons pouvant effectuer des rotations)<sup>212a, 269</sup> ont été effectués sur ses 292 hétérocycles afin de déterminer le nombre de molécules présentant un profil pharmacologique intéressant (**figure VII.6**).



**Figure VII.6 :** propriétés moléculaires des 1,3,5-triazépane-2,6-diones disponibles dans le laboratoire



Des composés actifs ont plus de chance de devenir des molécules à visée thérapeutique s'ils respectent la "règle des 5" décrite par Lipinski<sup>212a</sup> :

- $\log P < 5$
- $M_w < 500 \text{ g.mol}^{-1}$
- nombre de donneurs de liaison H  $< 5$
- nombre d'accepteurs de liaison H  $< 10$

Cette règle empirique permet d'évaluer l'adsorption orale d'un médicament ainsi que sa capacité à pénétrer dans les cellules. Une molécule respectant la "règle des 5" aura plus de chance de pénétrer l'organisme par voie orale ainsi que le milieu intracellulaire. En plus de des critères décrits par Lipinski, le nombre de liaisons pouvant faire des rotations (moins de 10) ainsi que la surface polaire accessible au solvant (inférieure à  $140 \text{ \AA}^2$ ) sont deux éléments jouant un rôle dans la biodisponibilité des molécules actives.<sup>269</sup>

D'après les diagrammes de la **figure VII.6**, 99 % des dérivés 1,3,5-triazépane-2,6-dione synthétisés dans le groupe ont un AlogP inférieur ou égal à 5, 95 % ont une masse molaire inférieure à  $500 \text{ mol.g}^{-1}$ , tous ont moins de dix accepteurs de liaisons hydrogène, 90 % ont au maximum cinq donneurs de liaisons hydrogène. Donc au total, 95 % des composés de type 1,3,5-triazépane-2,6-dione respectent la règle des 5 de Lipinski. En prenant en compte les deux autres critères : surface polaire accessible au solvant et nombre de liaisons pouvant effectuer une rotation, 76 % des composés ont une surface polaire accessible au solvant inférieure à  $140 \text{ \AA}^2$  et 95 % ont moins de dix liaisons pouvant effectuer une rotation. Donc en prenant en compte tous les critères définis ci-dessus, 71 % des composés de notre chimiothèque de 1,3,5-triazépane-2,6-diones sont des molécules pouvant être considérées comme "drug-like".

Ce résultat permet d'envisager la recherche de nouvelles cibles biologiques pour les dérivés de 1,3,5-triazépane-2,6-diones.

## Références

1. (a) Schaloske, R. H.; Dennis, E. A., *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1761* (11), 1246-1259; (b) Lambeau, G.; Gelb, M. H., *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 495-520.
2. Finzel, B. C.; Ohlendorf, D. H.; Weber, P. C.; Salemme, F. R., *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci* **1991**, *47* ( Pt 4), 558-559.
3. Sekar, K.; Eswaramoorthy, S.; Jain, M. K.; Sundaralingam, M., *Biochemistry* **1997**, *36* (46), 14186-14191.
4. Xu, W.; Yi, L.; Feng, Y.; Chen, L.; Liu, J., *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (24), 16659-16666.
5. Scott, D. L.; White, S. P.; Browning, J. L.; Rosa, J. J.; Gelb, M. H.; Sigler, P. B., *Science* **1991**, *254* (5034), 1007-1010.
6. Pan, Y. H.; Yu, B.-Z.; Singer, A. G.; Ghomashchi, F.; Lambeau, G.; Gelb, M. H.; Jain, M. K.; Bahnson, B. J., *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (32), 29086-29093.
7. (a) Berg, O. G.; Gelb, M. H.; Tsai, M.-D.; Jain, M. K., *Chem. Rev.* **2001**, *101* (9), 2613-2654; (b) Winget, J. M.; Pan, Y. H.; Bahnson, B. J., *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1761* (11), 1260-1269.
8. (a) Verger, R.; Mieras, M. C. E.; De Haas, G. H., *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 4023; (b) Jain, M. K.; Rogers, D. V.; Jahagirdar, J. F.; Marecek, F. R., *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *860*, 435; (c) Jain, M. K.; Berg, G., *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *1002*, 127-156.
9. Ramirez, F.; Jain, M. K., *Proteins* **1991**, *9*, 229-239.
10. (a) Lin, Y.; Nielsen, R.; Murray, D.; Mailer, C.; Hubbell, W. L.; *et al.*, *Science* **1998**, *279*, 1925-1929; (b) Canaan, S.; Nielsen, R.; Ghomashchi, F.; Robinson, B. H.; Gelb, M. H., *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 30984-30990; (c) Hendrickson, H. S.; Dennis, E. A., *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 5740-44.
11. (a) Singer, A. G.; Ghomashchi, F.; Le Calvez, C.; Bollinger, J.; Bezzine, S.; Rouault, M.; Sadilek, M.; Nguyen, E.; Lazdunski, M.; Lambeau, G.; Gelb, M. H., *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 48535-48549; (b) Bezzine, S.; Koduri, R. S.; Valentin, E.; Murakami, M.; Kudo, I.; Ghomashchi, F.; Sadilek, M.; Lambeau, G.; Gelb, M. H., *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 3179-3191.
12. Scott, D. L.; White, S. P.; Otwinowski, Z.; Yuan, W.; Gelb, M. H.; Sigler, P. B., *Science* **1990**, *250*, 1541-1546.
13. Jain, M. K.; Berg, G., *Current Opinion in Chemical Biology* **2006**, *10* (5), 473-479.
14. (a) Seilhamer, J. J.; Pruzanski, W.; Vadas, P.; Plant, S.; Miller, J. A.; Kloss, J.; Johnson, L. K., *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 5335-5338 ; (b) Pruzanski, W.; Vadas, P.; Browning, J., *J. Lipid. Mediat.* **1993**, *8*, 161-167.
15. Boilard, E.; Lai, Y.; Larabee, K.; Balestrieri, B.; Ghomashchi, F.; Fujioka, D.; Gobezie, R.; Coblyn, J. S.; Weinblatt, M. E.; Massarotti, E. M.; Thornhill, T. S.; Divangahi, M.; Remold, H.; Lambeau, G.; Gelb, M. H.; Arm, J. P.; Lee, D. M., *EMBO Mol. Med.* **2010**, *2*, 172.
16. (a) Mounier, C.; Ghomashchi, F.; Lindsay, M. R.; James, S.; Singer, A. G. e. a., *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 25024-25038 ; (b) Han, W. K.; Sapirstein, A.; Hung, C. C.; Alessandrini, A.; Bonventre, J. V., *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 24153-24163 ; (c) Kim, Y. J.; Kim, K. P.; Han, S. K.; Munoz, N. M.; Zhu, X. e. a., *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 36479-36488 ; (d) Muñoz, N. M.; Kim, Y. J.; Meliton, A. Y.; Kim, K. P.; Han, S.-K. et. al., *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 38813-38820.
17. Boilard, E.; Lai, Y.; Larabee, K.; Balestrieri, B.; Ghomashchi, F.; Fujioka, D.; Gobezie, R.; Coblyn, J. S.; Weinblatt, M. E.; Massarotti, E. M.; Thornhill, T. S.; Divangahi, M.; Remold, H.; Lambeau, G.; Gelb, M. H.; Arm, J. P.; Lee, D. M., *EMBO Mol. Med.* **2010**, *2* (5), 172-187.
18. Kim, D. K.; Fukuda, T.; Thompson, B. T.; Cockrill, B.; Hales, C.; Bonventre, J. V., *Am. J. Physiol.* **1995**, *269*, L109.
19. Touqui, L.; Arbibe, L., *Mol. Med. Today* **1999**, *5* (6), 244-249.
20. Henderson, W. R. J.; Chi, E. Y.; Bollinger, J. G.; Tien, Y. T.; Ye, X.; Castelli, L.; Rubtsov, Y. P.; Singer, A. G.; Chiang, G. K.; Nevalainen, T.; Rudensky, A. Y.; Gelb, M. H., *J. Exp. Med.* **2007**, *204*, 865-877.
21. Munoz, N. M.; Meliton, A. Y.; Arm, J. P.; Bonventre, J. V.; Cho, W.; Leff, A. R., *J. Immunol.* **2007**, *179*, 4800-4807.

22. Hallstrand, T. S.; Chi, E. Y.; Singer, A. G.; Gelb, M. H.; Henderson, W. R. J., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2007**, *176*, 1072-1078.
23. Webb, N. R., *Curr. Opin. Lipidol.* **2005**, *16*, 341-344
24. Kimura-Matsumoto, M.; Ishikawa, Y.; Komiyama, K.; Tsuruta, T.; Murakami, M. et. al., *Atherosclerosis* **2008**, *196*, 81-91.
25. Hsieh, C. C.; Yen, M. H.; Liu, H. W.; Lau, Y. T., *Atherosclerosis* **2000**, *151*, 481.
26. (a) Kugiyama, K.; Ota, Y.; Takazoe, K.; Moriyama, Y.; Kawano, H. e. a., *Circulation* **1999**, *100*, 1280-1284 ; (b) Mallat, Z.; Benessiano, J.; Simon, T.; Ederhy, S.; Sebella-Arguelles, C. et. al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2007**, *27*, 1177-1183.
27. Ivandic, B.; Castellani, L. W.; Wang, X. P.; Qiao, J. H.; Mehrabian, M. et. al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **1999**, *19*, 1284-1290.
28. (a) Hanasaki, K.; Yamada, K.; Yamamoto, S.; Ishimoto, Y.; Saiga, A., *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 29116-29124; (b) Pruzanski, W.; Lambeau, G.; Lazdunski, M.; Cho, W.; Kopilov, J.; Kuksis, A., *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1736*, 38-50; (c) Gesquiere, L.; Cho, W.; Subbaiah, P. V., *Biochemistry* **2002**, *41*, 4911-4920.
29. Bostrom, M. A.; Boyanovsky, B. B.; Jordan, C. T.; Wadsworth, M. P.; Taatjes, D. J.; de Beer, F. C.; Webb, N. R., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2007**, *27*, 600.
30. Weinrauch, Y.; Elsbach, P.; Madsen, L. M.; Foreman, A.; Weiss, J., *J. Clin. Invest.* **1996**, *97*, 250.
31. Harwig, S. S.; Tan, L.; Qu, X. D.; Cho, Y.; Eisenhauer, P. B.; Lehrer, R. I., *J. Clin. Invest.* **1995**, *95*, 603.
32. Gronroos, J. O.; Laine, V. J.; Nevalainen, T. J., *J. Infect. Dis.* **2002**, *185*, 1767.
33. Nevalainen, T. J.; Graham, G. G.; Scott, K. F., *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1781* (1-2), 1-9.
34. (a) Grass, D. S.; Felkner, R. H.; Chiang, M. Y.; Wallace, R. E.; Nevalainen, T. J.; Bennett, C. F.; Swanson, M. E., *J. Clin. Invest.* **1996**, *97*, 2233-2241; (b) Laine, V. J.; Grass, D. S.; Nevalainen, T. J., *J. Immunol.* **1999**, *162*, 7402.
35. (a) Koprivnjak, T.; Peschel, A.; Gelb, M. H.; Liang, N. S.; Weiss, J. P., *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 47636-47644; (b) Koduri, R. S.; Gronroos, J. O.; Laine, V. J.; Le Calvez, C.; Lambeau, G. et. al., *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 5849-5857.
36. Elsbach, P.; Weiss, J.; Levy, O., *Trends Microbiol.* **1994**, *2*, 324-328.
37. (a) Mitsuishi, M.; Masuda, S.; Kudo, I.; Murakami, M., *Biochem. J.* **2006**, *393*, 97; (b) Mitsuishi, M.; Masuda, S.; Kudo, I.; Murakami, M., *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1771*, 1389.
38. (a) Fenard, D.; Lambeau, G.; Maurin, T.; Lefebvre, J. C.; Doglio, A., *Mol. Pharmacol.* **2001**, *60*, 341-347; (b) Kim, J. O.; Chakrabarti, B. K.; Guha-Niyogi, A.; Louder, M. K.; Mascola, J. R.; Ganesh, L.; Nabel, G. J., *J. Virol.* **2007**, *81*, 1444-1450; (c) Kim, J.-O.; Chakrabarti, B. K.; Guha-Niyogi, A.; Louder, M. K.; Mascola, J. R.; Ganesh, L.; Nabel, G. J., *J. Virol.* **2007**, *81* (3), 1444-1450.
39. Deregnaucourt, C.; Schrevel, J., *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 39973-39980.
40. (a) Richmond, B. L.; Boileau, A. C.; Zheng, S.; Huggins, K. W.; Granholm, N. A.; Tso, P.; Hui, D. Y., *Gastroenterology* **2001**, *120*, 1193-1202; (b) Huggins, K. W.; Boileau, A. C.; Hui, D. Y., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2002**, *283*, E994-E1001; (c) Labonte, E. D.; Kirby, R. J.; Schildmeyer, N. M.; Cannon, A. M.; Huggins, K. W.; Hui, D. Y., *Diabetes* **2006**, *55*, 935-941.
41. (a) Mounier, C. M.; Bon, C.; Kini, R. M., *Haemostasis* **2001**, *31*, 279-287; (b) Mounier, C. M.; Luchetta, P.; Lecut, C.; Koduri, R. S.; Faure, G.; Lambeau, G.; Valentin, E.; Singer, A.; Ghomashchi, F.; Beguin, S.; Gelb, M. H.; Bon, C., *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 4960-4969.
42. Sved, P.; Scott, K. F.; McLeod, D.; King, N. J.; Singh, J.; Tsatralis, T.; Nikolov, B.; Boulas, J.; Nallan, L.; Gelb, M. H.; Sajinovic, M.; Graham, G. G.; Russell, P. J.; Dong, Q., *Cancer Res.* **2004**, *64*, 6934.
43. Buhmeida, A.; Bendardaf, R.; Hilska, M.; Laine, J.; Collan, Y.; Laato, M.; Syrjanen, K.; Pyrhonen, S., *Ann. Oncol.* **2009**, *20*, 1230.
44. Laye, J. P.; Gill, J. H., *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 710.
45. Haas, U.; Podda, M.; Behne, M.; Gurrieri, S.; Alonso, A. e. a., *J. Investig. Dermatol.* **2005**, *124*, 204-211.

46. Sato, H.; Taketomi, Y.; Isogai, Y.; Miki, Y.; Yamamoto, K.; Masuda, S., *J. Clin. Invest.* **2010**, *120*, 1400-1414.
47. Escoffier, J.; Jemel, I.; Tanemoto, A.; Taketomi, Y.; Payre, C.; Coatrieux, C.; Sato, H.; Yamamoto, K.; Masuda, S.; Pernet-Gallay, K.; Pierre, V.; Hara, S.; Murakami, M.; De Waard, M.; Lambeau, G.; Arnoult, C., *J Clin Invest* **2010**, *120* (5), 1415-1428.
48. (a) Yano, T.; Fujioka, D.; Saito, Y.; Kobayashi, T.; Nakamura, T.; Obata, J. E.; Kawabata, K.; Watanabe, K.; Watanabe, Y.; Mishina, H.; Tamaru, S.; Kugiyama, K., *Cardiovasc. Res.* **2011**, *90*, 335-343; (b) Fujioka, D.; Saito, Y.; Kobayashi, T.; Yano, T.; Tezuka, H.; Ishimoto, Y.; Suzuki, N.; Yokota, Y.; Nakamura, T.; Obata, J. E.; Kanazawa, M.; Kawabata, K.; Hanasaki, K.; Kugiyama, K., *Circulation* **2008**, *117*, 2977-2985.
49. Murakami, M.; Lambeau, G., *Biochimie* **2013**, *95*, 43-50.
50. (a) Kini, R. M.; Evans, H. J., *Toxicon* **1989**, *27*, 613-635; (b) Gutierrez, J. M.; Lomonte, B., *Toxicon* **1995**, *33*, 1405-1424.
51. (a) Lambeau, G.; Lazdunski, M., *Trends Pharmacol. Sci.* **1999**, *20* (4), 162-170; (b) Lambeau, G.; Barhanin, J.; Schweitz, H.; Qar, J.; Lazdunski, M., *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 11503-11510; (c) Lambeau, G.; Schmid-Alliana, A.; Lazdunski, M.; Barhanin, J., *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 9526-9532.
52. Lambeau, G.; Lazdunski, M.; Barhanin, J., *Neurochem. Res.* **1991**, *16*, 651-658.
53. Nicolas, J. P., *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 7173-7181.
54. (a) Hanasaki, K.; Arita, H., *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 6414-6420; (b) Ancian, P.; Lambeau, G.; Mattei, M. G.; Lazdunski, M., *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 8963-8970.
55. (a) Ohara, O.; Ishizaki, J.; Arita, H., *Prog. Lipid Res.* **1995**, *34*, 117-138; (b) Arita, H., *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 19139-19141; (c) Kundu, G. C.; Mukherjee, A. B., *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 2346-2353; (d) Kishino, J.; Ohara, O.; Nomura, K.; Kramer, R. M.; Arita, H., *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 5092-5098.
56. Chabot, S.; Koumanov, K.; Lambeau, G.; Gelb, M. H.; Chignard, M., et al, *J. Immunol.* **2003**, *171*, 995-1000.
57. Marcussi, S.; Sant'Ana, C. D.; Oliveira, C. Z.; Rueda, A. Q.; Menaldo, D. L., et al., *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, *7*, 743-756.
58. Yu, L.; Deems, R. A.; Hajdu, J.; Dennis, E. A., *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 2657.
59. Davidson, F. F.; Hajdu, J.; Dennis, E. A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986**, *137*, 587.
60. Yu, L.; Dennis, E. A., *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8757.
61. Renetseder, R.; Brunie, S.; Dijkstra, B. W.; Drenth, J.; Sigler, P. B., *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 11627-11634.
62. (a) Dennis, E. A., In *The Enzymes*, Academic Press: New York, 1983; Vol. 16; (b) Dennis, E.; Darke, P.; Deems, R.; Kensil, C.; Plückerthun, A., *Mol Cell Biochem* **1981**, *36* (1), 37-45.
63. De Haas, G. H.; Dijkman, R.; Ransac, S.; Verger, R., *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1046*, 249-257.
64. Bennion, C.; Connolly, S.; Gensmantel, N. P.; Hallam, C.; Jackson, C. G.; Primrose, W. U.; Roberts, G. C. K.; Robinson, D. H.; Slaich, P. K., *J. Med. Chem.* **1992**, *35* (16), 2939-2951.
65. Schramm, V. L., *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 693-720.
66. Gelb, M. H.; Svaren, J. P.; Abeles, R. H., *Biochemistry* **1985**, *24* (8), 1813-1817.
67. Gelb, M. H., *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108* (11), 3146-3147.
68. Yuan, W.; Berman, R. J.; Gelb, M. H., *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109* (26), 8071-8081.
69. Yuan, W.; Gelb, M. H., *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110* (8), 2665-2666.
70. Yuan, W.; Quinn, D. M.; Sigler, P. B.; Gelb, M. H., *Biochemistry* **1990**, *29* (25), 6082-6094.
71. White, S.; Scott, D.; Otwinowski, Z.; Gelb, M.; Sigler, P., *Science* **1990**, *250* (4987), 1560-1563.
72. Washburn, W. N.; Dennis, E. A., *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112* (5), 2040-2041.
73. Washburn, W. N.; Dennis, E. A., *J. Biol. Chem.* **1991**, *266* (8), 5042-5048.
74. Beaton, H. G.; Bennion, C.; Connolly, S.; Cook, A. R.; Gensmantel, N. P.; Hallam, C.; Hardy, K.; Hitchin, B.; Jackson, C. G.; Robinson, D. H., *J. Med. Chem.* **1994**, *37* (5), 557-559.
75. Cha, S.-S.; Lee, D.; Adams, J.; Kurdyla, J. T.; Jones, C. S.; Marshall, L. A.; Bolognese, B.; Abdel-Meguid, S. S.; Oh, B.-H., *J. Med. Chem.* **1996**, *39* (20), 3878-3881.

76. Scott, D. L.; White, S. P.; Browning, J. L.; Rosa, J. J.; Gelb, M. H.; Sigler, P. B., *Science* **1991**, *254*, 1007-1010.
77. Hansford, K. A.; Reid, R. C.; Clark, C. I.; Tyndall, J. D. A.; Whitehouse, M. W.; Guthrie, T.; McGeary, R. P.; Schafer, K.; Martin, J. L.; Fairlie, D. P., *ChemBioChem* **2003**, *4* (2-3), 181-185.
78. Arumugam, T. V.; Arnold, N.; Proctor, L. M.; Newman, M.; Reid, R. C.; Hansford, K. A.; Fairlie, D. P.; Shiels, I. A.; Taylor, S. M., *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *140* (1), 71-80.
79. Antonopoulou, G.; Barbayianni, E.; Magrioti, V.; Cotton, N.; Stephens, D.; Constantinou-Kokotou, V.; Dennis, E. A.; Kokotos, G., *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16* (24), 10257-10269.
80. Jain, M. K.; Ghomashchi, F.; Yu, B. Z.; Bayburt, T.; Murphy, D.; Houck, D.; Brownell, J.; Reid, J. C.; Solowiej, J. E., *J. Med. Chem.* **1992**, *35* (19), 3584-3586.
81. Tramposch, K. M.; Steiner, S. A.; Stanley, P. L.; Nettleton, D. O.; Franson, R. C.; Lewin, A. H.; Ivy Carroll, F., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *189* (1), 272-279.
82. Burke, J. R.; Gregor, K. R.; Tramposch, K. M., *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 274-280.
83. Jain, M. K.; Yu, B.-Z.; Gelb, M. H.; Berg, O. G., *Mediators of inflammation* **1992**, *1*, 85-100.
84. Gelb, M. H.; Berg, O.; Jain, M. K., *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1991**, *1* (5), 836-843.
85. Springer, D. M.; Luh, B.-Y.; D'Andrea, S. V.; Bronson, J. J.; Mansuri, M. M.; Burke, J. R.; Gregor, K. R.; Stanley, P. L.; Tramposch, K. M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7* (7), 793-798.
86. Springer, D. M.; Luh, B.-Y.; Bronson, J. J.; McElhone, K. E.; Mansuri, M. M.; Gregor, K. R.; Nettleton, D. O.; Stanley, P. L.; Tramposch, K. M., *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8* (5), 1087-1109.
87. LeMahieu, R. A.; Carson, M.; Han, R. J.; Madison, V. S.; Hope, W. C.; Chen, T.; Morgan, D. W.; Hendrickson, H. S., *J. Med. Chem.* **1993**, *36* (20), 3029-3031.
88. Slotboom, A. J.; Verheij, H. M.; De Haas, G. H., *In Phospholipids*. Elsevier Biomedical Press: Amsterdam, 1982.
89. Mueller, K.; Ammann, H. J.; Doran, D. M.; Gerber, P.; Schrepfer, G., *In Innovative Approaches in Drug Research*. Elsevier: Amsterdam, 1988.
90. Yu, L.; Dennis, E. A., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**, *88* (20), 9325-9329.
91. Pisabarro, M. T.; Ortiz, A. R.; Palomer, A.; Cabre, F.; Garcia, L.; Wade, R. C.; Gago, F.; Mauleon, D.; Carganico, G., *J. Med. Chem.* **1994**, *37* (3), 337-341.
92. Marshall, L. A.; Hall, R. H.; Winkler, J. D.; Badger, A.; Bolognese, B.; Roshak, A.; Flamberg, P. L.; Sung, C. M.; Chabot-Fletcher, M.; Adams, J. L.; Mayer, R. J., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1995**, *274* (3), 1254-1262.
93. (a) Zhou, C.; Tang, C.; Chang, E.; Ge, M.; Lin, S.; Cline, E.; Tan, C. P.; Feng, Y.; Zhou, Y.-P.; Eiermann, G. J.; Petrov, A.; Salituro, G.; Meinke, P.; Mosley, R.; Akiyama, T. E.; Einstein, M.; Kumar, S.; Berger, J.; Howard, A. D.; Thornberry, N.; Mills, S. G.; Yang, L., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (3), 1298-1301; (b) Du, W.; Jewell, J. P.; Lin, L. S.; Colandrea, V. J.; Xiao, J. C.; Lao, J.; Shen, C.-P.; Bateman, T. J.; Reddy, V. B. G.; Ha, S. N.; Shah, S. K.; Fong, T. M.; Hale, J. J.; Hagmann, W. K., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (17), 5195-5199.
94. Kimura, H.; Yotsuya, S.; Yuki, S.; Sugi, H.; Shigehara, I.; Haga, T., *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*, 1696-1700
95. (a) Nakayama, H.; Morita, Y.; Kimura, H.; Ishihara, K.; Akiba, S.; Uenishi, J., *Chem. Pharma. Bull.* **2011**, *59* (6), 783-786 ; (b) Nakayama, H.; Ishihara, K.; Akiba, S.; Uenishi, J., *Chem. Pharma. Bull.* **2011**, *59* (6), 1069-1072.
96. (a) Kokotos, G.; Six, D. A.; Loukas, V.; Smith, T.; Constantinou-Kokotou, V.; Hadjipavlou-Litina, D.; Kotsovolou, S.; Chiou, A.; Beltzner, C. C.; Dennis, E. A., *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (14), 3615-3628; (b) Six, D. A.; Barbayianni, E.; Loukas, V.; Constantinou-Kokotou, V.; Hadjipavlou-Litina, D.; Stephens, D.; Wong, A. C.; Magrioti, V.; Moutevelis-Minakakis, P.; Baker, S. F.; Dennis, E. A.; Kokotos, G., *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (17), 4222-4235.
97. Antonopoulou, G.; Magrioti, V.; Stephens, D.; Constantinou-Kokotou, V.; Dennis, E. A.; Kokotos, G., *J. Pept. Sci.* **2008**, *14* (10), 1111-1120.
98. Mouchlis, V. D.; Magrioti, V.; Barbayianni, E.; Cermak, N.; Oslund, R. C.; Mavromoustakos, T. M.; Gelb, M. H.; Kokotos, G., *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19* (2), 735-743.

99. Kokotos, G.; Kotsovolou, S.; Six, D. A.; Constantinou-Kokotou, V.; Beltzner, C. C.; Dennis, E. A., *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (14), 2891-2893.
100. (a) Dillard, R. D.; Bach, N. J.; Draheim, S. E.; Berry, D. R.; Carlson, D. G.; Chirgadze, N. Y.; Clawson, D. K.; Hartley, L. W.; Johnson, L. M.; Jones, N. D.; McKinney, E. R.; Mihelich, E. D.; Olkowski, J. L.; Schevitz, R. W.; Smith, A. C.; Snyder, D. W.; Sommers, C. D.; Wery, J.-P., *J. Med. Chem.* **1996**, *39* (26), 5119-5136; (b) Dillard, R. D.; Bach, N. J.; Draheim, S. E.; Berry, D. R.; Carlson, D. G.; Chirgadze, N. Y.; Clawson, D. K.; Hartley, L. W.; Johnson, L. M.; Jones, N. D.; McKinney, E. R.; Mihelich, E. D.; Olkowski, J. L.; Schevitz, R. W.; Smith, A. C.; Snyder, D. W.; Sommers, C. D.; Wery, J.-P., *J. Med. Chem.* **1996**, *39* (26), 5137-5158; (c) Draheim, S. E.; Bach, N. J.; Dillard, R. D.; Berry, D. R.; Carlson, D. G.; Chirgadze, N. Y.; Clawson, D. K.; Hartley, L. W.; Johnson, L. M.; Jones, N. D.; McKinney, E. R.; Mihelich, E. D.; Olkowski, J. L.; Schevitz, R. W.; Smith, A. C.; Snyder, D. W.; Sommers, C. D.; Wery, J.-P., *J. Med. Chem.* **1996**, *39* (26), 5159-5175.
101. Elsbach, P.; Weiss, J., *Methods in Enzymology*. Academic Press: San Diego, 1991; Vol. 197.
102. Snyder, D. W.; Sommers, C. D.; Bobbitt, J. L.; Mihelich, E. D., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1993**, *266* (3), 1147-1155.
103. Smart, B. P.; Oslund, R. C.; Walsh, L. A.; Gelb, M. H., *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (10), 2858-2860.
104. Snyder, D. W.; Bach, N. J.; Dillard, R. D.; Draheim, S. E.; Carlson, D. G.; Fox, N.; Roehm, N. W.; Armstrong, C. T.; Chang, C. H.; Hartley, L. W.; Johnson, L. M.; Roman, C. R.; Smith, A. C.; Song, M.; Fleisch, J. H., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *288* (3), 1117-1124.
105. Tomita, Y.; Kuwabara, K.; Furue, S.; Tanaka, K.; Yamada, K.; Ueno, M.; Ono, T.; Maruyama, T.; Ajiki, T.; Onoyama, H.; Yamamoto, M.; Hori, Y., *J. Pharmacol. Sci.* **2004**, *96*, 144-154.
106. Abraham, E.; Naum, C.; Bandi, V.; Gervich, D.; Lowry, S. F.; Wunderink, R.; Schein, R. M.; Macias, W.; Skerjanec, S.; Dmitrienko, A.; Farid, N.; Fogue, S. T.; Jiang, F., *Crit. Care Med.* **2003**, *31*, 718-728.
107. Tomita, Y.; Jyoyama, H.; Kobayashi, M.; Kuwabara, K.; Furue, S.; Ueno, M.; Yamada, K.; Ono, T.; Teshirogi, I.; Nomura, K.; Arita, H.; Okayasu, I.; Hori, Y., *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, *472* (1-2), 147-158.
108. Bowton, D. L.; Dmitrienko, A. A.; Israel, E.; Zeiher, B. G.; Sides, G. D., *J. Asthma* **2005**, *42* (1), 65-71.
109. Shaposhnik, Z.; Wang, X.; Trias, J.; Fraser, H.; Lusic, A. J., *J. Lipid Res.* **2009**, *50* (4), 623-629.
110. Rosenson, R. S.; Hislop, C.; McConnell, D.; Elliott, M.; Stasiv, Y.; Wang, N.; Waters, D. D., *Lancet* **2009**, *373* (9664), 649-658.
111. Rosenson, R. S.; Hurt-Camejo, E., *European Heart Journal* **2012**, *33* (23), 2899-2909.
112. Smart, B. P.; Pan, Y. H.; Weeks, A. K.; Bollinger, J. G.; Bahnsen, B. J.; Gelb, M. H., *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12* (7), 1737-1749.
113. Oslund, R. C.; Cermak, N.; Gelb, M. H., *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (15), 4708-4714.
114. Zhou, L.; Fang, C.; Wei, P.; Liu, S.; Liu, Y.; Lai, L., *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (12), 3360-3366.
115. Potts, B. M.; Faulkner, D. J., *Journal of Natural Products* **1992**, *55*, 1701-1717.
116. de Silva, E. D.; Scheuer, P. J., *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21* (17), 1611-1614.
117. Lombardo, D.; Dennis, E. A., *J. Biol. Chem.* **1985**, *260* (12), 7234-40.
118. Glaser, K. B.; Jacobs, R. S., *Biochem. Pharmacol.* **1986**, *35* (3), 449-453.
119. Jacobson, P. B.; Marshall, L. A.; sung, A.; Jacobs, R. S., *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *39* (10), 1557-1564.
120. Potts, B. C. M.; Faulkner, D. J.; De Carvalho, M. S.; Jacobs, R. S., *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (13), 5093-5100.
121. Bianco, I. D.; Kelley, M. J.; Crowl, R. M.; Dennis, E. A., *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1250*, 197-203.
122. Kikuchi, H.; Tsukitani, Y.; Shimizu, I.; Kobayashi, M.; Kitagawa, I., *Chem. Pharm. Bull.* **1981**, *29* (5), 1492-1494.
123. Monti, M. C.; Casapullo, A.; Cavasotto, C. N.; Napolitano, A.; Riccio, R., *ChemBioChem* **2007**, *8* (13), 1585-1591.

124. (a) Dal Piaz, F.; Casapullo, A.; Randazzo, A.; Riccio, R.; Pucci, P.; Marino, G.; Gomez-Paloma, L., *ChemBioChem* **2002**, *3* (7), 664-671; (b) Monti, M. C.; Casapullo, A.; Riccio, R.; Gomez-Paloma, L., *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12* (6), 1467-1474.
125. Monti, M. C.; Casapullo, A.; Cavasotto, C. N.; Tosco, A.; Dal Piaz, F.; Ziemys, A.; Margarucci, L.; Riccio, R., *Chem.—Eur. J.* **2009**, *15* (5), 1155-1163.
126. Miyake, A.; Yamamoto, H.; Takebayashi, Y.; Imai, H.; Honda, K., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1992**, *263* (3), 1302-1307.
127. Miyake, A.; Yamamoto, H.; Kubota, E.; Hamaguchi, K.; Kouda, A.; Honda, K.; Kawashima, H., *Br. J. Pharmacol.* **1993**, *110* (1), 447-453.
128. Oslund, R. C.; Cermak, N.; Verlinde, C. L. M. J.; Gelb, M. H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (20), 5415-5419.
129. Lindahl, M.; Tagesson, C., *Inflammation* **1997**, *21* (3), 347-356.
130. Tanaka, K.; Matsutani, S.; Kanda, A.; Kato, T.; Yoshida, T., *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 631-638.
131. Teshirogi, I.; Matsutani, S.; Shirahase, K.; Fujii, Y.; Yoshida, T.; Tanaka, K.; Ohtani, M., *J. Med. Chem.* **1996**, *39* (26), 5183-5191.
132. Aitdafoun, M.; Mounier, C.; Heymans, F.; Binisti, C.; Bon, C.; Godfroid, J.-J., *J. Biochem. Pharmacol.* **1996**, *51* (6), 737-742.
133. Assogba, L.; Ahamada-Himidi, A.; Habich, N. M.-B.; Aoun, D.; Boukli, L.; Massicot, F.; Mounier, C. M.; Huet, J.; Lamouri, A.; Ombetta, J.-E.; Godfroid, J.-J.; Dong, C.-Z.; Heymans, F., *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40* (9), 850-861.
134. Unangst, P. C.; Shrum, G. P.; Connor, D. T.; Dyer, R. D.; Schrier, D. J., *J. Med. Chem.* **1992**, *35* (20), 3691-3698.
135. Dong, C.-Z.; Ahamada-Himidi, A.; Plocki, S.; Aoun, D.; Touaibia, M.; Meddad-Bel Habich, N.; Huet, J.; Redeuilh, C.; Ombetta, J.-E.; Godfroid, J.-J.; Massicot, F.; Heymans, F., *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13* (6), 1989-2007.
136. Touaibia, M.; Djimdé, A.; Cao, F.; Boilard, E.; Bezzine, S.; Lambeau, G.; Redeuilh, C.; Lamouri, A.; Massicot, F.; Chau, F.; Dong, C.-Z.; Heymans, F., *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (7), 1618-1626.
137. (a) Boukli, L.; Touaibia, M.; Meddad-Belhabich, N.; Djimdé, A.; Park, C.-H.; Kim, J.-J.; Yoon, J.-H.; Lamouri, A.; Heymans, F., *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16* (3), 1242-1253; (b) Meddad-Belhabich, N.; Aoun, D.; Djimdé, A.; Redeuilh, C.; Dive, G.; Massicot, F.; Chau, F.; Heymans, F.; Lamouri, A., *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18* (10), 3588-3600.
138. Martins, M. B.; Carvalho, I., *Tetrahedron* **2007**, *63* (40), 9923-9932.
139. (a) Nicholson, B.; Lloyd, G. K.; Miller, B. R.; Palladino, M. A.; Kiso, Y.; Hayashi, Y.; Neuteboom, S. T. C., *Anti-Cancer Drugs* **2006**, *17* (1), 25-31; (b) Kanoh, K.; Kohno, S.; Katada, J.; Takahashi, J.; Uno, I., *J. Antibiot.* **1999**, *52* (2), 134-141.
140. Sinha, S.; Srivastava, R.; De Clercq, E.; Singh, R. K., *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2004**, *23* (12), 1815-1824.
141. Fdhila, F.; Vázquez, V.; Sánchez, J. L.; Riguera, R., *J. Nat. Prod.* **2003**, *66* (10), 1299-1301.
142. Byun, H.-G.; Zhang, H.; Mochizuki, M.; Adachi, K.; Shizuri, Y.; Lee, W.-J.; Kim, S.-K., *J. Antibiot.* **2003**, *56* (2), 102-106.
143. Lam, P.; Jadhav, P.; Eyermann, C.; Hodge, C.; Ru, Y.; Bacheler, L.; Meek, J.; Otto, M.; Rayner, M.; Wong, Y.; et, a., *Science* **1994**, *263* (5145), 380-384.
144. Galembo Jr, R. A.; Wells, B. L.; Rossi, K. A.; Alexander, R. S.; Dominguez, C.; Maduskuie, T. P.; Stouten, P. F. W.; Wright, M. R.; Aungst, B. J.; Wong, P. C.; Knabb, R. M.; Wexler, R. R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10* (3), 301-304.
145. Martin, S. F.; Follows, B. C.; Hergenrother, P. J.; Franklin, C. L., *J. Org. Chem.* **2000**, *65* (15), 4509-4514.
146. (a) Lena, G.; Guichard, G., *Curr. org. chem.* **2008**, *12* (10), 813-835; (b) Lena, G.; Lallemand, E.; Gruner, A. C.; Boeglin, J.; Roussel, S.; Schaffner, A.-P.; Aubry, A.; Franetich, J.-F.; Mazier, D.; Landau, I.; Briand, J.-P.; Didierjean, C.; Rénia, L.; Guichard, G., *Chem. Eur. J.* **2006**, *12* (33), 8498-8512.
147. Paul, N.; Kellenberger, E.; Bret, G.; Müller, P.; Rognan, D., *Proteins* **2004**, *54* (4), 671-680.

148. Muller, P.; Lena, G.; Boilard, E.; Bezzine, S.; Lambeau, G.; Guichard, G.; Rognan, D., *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (23), 6768-6778.
149. Gund, P.; Veber, D. F., *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101* (7), 1885-1887.
150. Fischer, L.; Decossas, M.; Briand, J.-P.; Didierjean, C.; Guichard, G., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (9), 1625-1628.
151. Tzschucke, C. C.; Markert, C.; Bannwarth, W.; Roller, S.; Hebel, A.; Haag, R., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41* (21), 3964-4000.
152. Ostresh, J. M.; Husar, G. M.; Blondelle, S. E.; Dörner, B.; Weber, P. A.; Houghten, R. A., *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1994**, *91* (23), 11138-11142.
153. (a) DeGrado, W. F.; Kaiser, E. T., *J. Org. Chem.* **1980**, *45* (7), 1295-1300; (b) DeGrado, W. F.; Kaiser, E. T., *J. Org. Chem.* **1982**, *47* (17), 3258-3261.
154. Hamuro, Y.; Marshall, W. J.; Scialdone, M. A., *J. Comb. Chem.* **1999**, *1* (2), 163-172.
155. (a) Loudon, G. M.; Almond, M.; Jacob, J. N., *M. J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103* (15), 4508-4515; (b) Fischer, L.; Semetey, V.; Lozano, J.-M.; Schaffner, A.-P.; Briand, J.-P.; Didierjean, C.; Guichard, G., *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, *2007* (15), 2511-2525.
156. Hofmann, A. W., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1881**, *14* (2), 2725-2736.
157. (a) Radhakrishna, A. S.; Parham, M. E.; Riggs, R. M.; Loudon, G. M., *J. Org. Chem.* **1979**, *44* (10), 1746-1747; (b) Loudon, G. M.; Radhakrishna, A. S.; Almond, M. R.; Blodgett, J. K.; Boutin, R. H., *J. Org. Chem.* **1984**, *49* (22), 4272-4276; (c) Boutin, R. H.; Loudon, G. M., *J. Org. Chem.* **1984**, *49* (22), 4277-4284.
158. Pallai, P.; Goodman, M., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1982**, *0* (5), 280-281.
159. Myers, A. C.; Kowalski, J. A.; Lipton, M. A., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14* (20), 5219-5222.
160. Sieber, P., *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28* (19), 2107-2110.
161. Senanayake, C. H.; Fredenburgh, L. E.; Reamer, R. A.; Larsen, R. D.; Verhoeven, T. R.; Reider, P. J., *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116* (17), 7947-7948.
162. Tamura, M.; Jacyno, J.; Stammer, C. H., *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27* (45), 5435-5436.
163. (a) Lazbin, I. M.; Koser, G. F., *J. Org. Chem.* **1986**, *51* (14), 2669-2671; (b) Vasudevan, A.; Koser, G. F., *J. Org. Chem.* **1988**, *53* (21), 5158-5160; (c) Moriarty, R. M.; Khosrowshahi, J. S.; Awasthi, A. K.; Penmasta, R., *Synth. Commun.* **1988**, *18* (11), 1179-1186.
164. Radhakrishna, A. S.; Rao, C. G.; Varma, R. K.; Singh, B. B.; Bhatnagar, S. P., *Synthesis* **1983**, *1983* (07), 538-538.
165. Liu, P.; Wang, Z.; Hu, X., *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012* (10), 1994-2000.
166. Baumgarten, H. E.; Smith, H. L.; Staklis, A., *J. Org. Chem.* **1975**, *40* (24), 3554-3561.
167. Jew, S.-s.; Geun Park, H.; Park, H.-J.; Park, M.-s.; Cho, Y.-s., *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31* (11), 1559-1562.
168. Kajigaeshi, S.; Asano, K.; Fujisaki, S.; Kakinami, T.; Okamoto, T., *Chem. Lett.* **1989**, *18* (3), 463-464.
169. Poullennec, K. G.; Romo, D., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (21), 6344-6345.
170. Landsberg, D.; Kalesse, M., *Synlett* **2010**, *2010* (EFirst), 1104-1106.
171. Zuckermann, R. N.; Kerr, J. M.; Kent, S. B. H.; Moos, W. H., *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (26), 10646-10647.
172. Burkoth, T. S.; Fafarman, A. T.; Charych, D. H.; Connolly, M. D.; Zuckermann, R. N., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (29), 8841-8845.
173. Sumiyoshi, H.; Shimizu, T.; Katoh, M.; Baba, Y.; Sodeoka, M., *Org. Lett.* **2002**, *4* (22), 3923-3926.
174. Chorev, M.; MacDonald, S. A.; Goodman, M., *J. Org. Chem.* **1984**, *49* (5), 821-827.
175. (a) Ghose, A. K.; Viswanadhan, V. N.; Wendoloski, J. J., *J. Comb. Chem.* **1998**, *1* (1), 55-68; (b) Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V., *Tetrahedron* **2005**, *61* (46), 10827-10852.
176. Valeur, E.; Bradley, M., *Chem. Commun.* **2005**, *0* (9), 1164-1166.
177. Almond, M. R.; Stimmel, J. B.; Thompson, E. A.; Loudon, G. M., *Organic Syntheses* **1988**, *66*, 132.
178. Bordwell, F. G., *Acc. Chem. Res.* **1988**, *21* (12), 456-463.



179. Lee, C. M.; Kumler, W. D., *J. Org. Chem.* **1962**, *27* (6), 2052-2054.
180. (a) Sifferlen, T.; Rueping, M.; Gademann, K.; Jaun, B.; Seebach, D., *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82* (12), 2067-2093; (b) Fan, E.; Van Arman, S. A.; Kincaid, S.; Hamilton, A. D., *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (1), 369-370; (c) Bordwell, F. G.; Algrim, D. J.; Harrelson, J. A., *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110* (17), 5903-5904.
181. (a) Lenthall, J. T.; Foster, J. A.; Anderson, K. M.; Probert, M. R.; Howard, J. A. K.; Steed, J. W., *CrystEngComm* **2011**, *13* (9), 3202-3212; (b) Allen, F. H.; Bird, C. M.; Rowland, R. S.; Raithby, P. R., *Acta Cryst.* **1997**, *53* (4), 680-695.
182. (a) Yamaguchi, K.; Matsumura, G.; Kagechika, H.; Azumaya, I.; Ito, Y.; Itai, A.; Shudo, K., *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113* (14), 5474-5475; (b) Kurth, T. L.; Lewis, F. D., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (45), 13760-13767; (c) Kudo, M.; Hanashima, T.; Muranaka, A.; Sato, H.; Uchiyama, M.; Azumaya, I.; Hirano, T.; Kagechika, H.; Tanatani, A., *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (21), 8154-8163.
183. Taori, V. P.; Lu, H.; Reineke, T. M., *Biomacromolecules* **2011**, *12* (6), 2055-2063.
184. Berlinck, R. G. S.; Trindade-Silva, A. E.; Santos, M. F. C., *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29* (12), 1382-1406.
185. (a) Henderson, L. C.; Li, J.; Nation, R. L.; Velkov, T.; Pfeffer, F. M., *Chem. Commun.* **2010**, *46* (18), 3197-3199; (b) Späth, A.; König, B., *Tetrahedron* **2010**, *66* (10), 1859-1873; (c) Soegiarto, A. C.; Comotti, A.; Ward, M. D., *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (41), 14603-14616; (d) Rether, C.; Schmuck, C., *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2011* (8), 1459-1466; (e) Salvio, R.; Cacciapaglia, R.; Mandolini, L., *J. Org. Chem.* **2011**, *76* (13), 5438-5443; (f) Kuchelmeister, H. Y.; Schmuck, C., *Chem.–Eur. J.* **2011**, *17* (19), 5311-5318.
186. Phillips, D. J.; Graham, A. E., *Synlett* **2010**, *2010* (05), 769-773.
187. Taylor, J. E.; Bull, S. D.; Williams, J. M. J., *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (6), 2109-2121.
188. (a) Liu, T.; Liu, Y.; Kao, H.-Y.; Pei, D., *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (6), 2494-2501; (b) Jarvis, A.; Allerston, C. K.; Jia, H.; Herzog, B.; Garza-Garcia, A.; Winfield, N.; Ellard, K.; Aqil, R.; Lynch, R.; Chapman, C.; Hartzoulakis, B.; Nally, J.; Stewart, M.; Cheng, L.; Menon, M.; Tickner, M.; Djordjevic, S.; Driscoll, P. C.; Zachary, I.; Selwood, D. L., *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (5), 2215-2226.
189. (a) Thevissen, K.; Pellens, K.; De Brucker, K.; François, I. E. J. A.; Chow, K. K.; Meert, E. M. K.; Meert, W.; Van Minnebruggen, G.; Borgers, M.; Vroome, V.; Levin, J.; De Vos, D.; Maes, L.; Cos, P.; Cammue, B. P. A., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (12), 3686-3692; (b) Xu, H.; Wang, Y.-Y., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (24), 7274-7277.
190. (a) Cochrane, J. R.; McErlean, C. S. P.; Jolliffe, K. A., *Org. Lett.* **2010**, *12* (15), 3394-3397; (b) Lecerclé, D.; Clouet, A.; Al-Dabbagh, B.; Crouvoisier, M.; Bouhss, A.; Gravier-Pelletier, C.; Le Merrer, Y., *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18* (12), 4560-4569.
191. (a) Oakley, A. J.; Barrett, S.; Peat, T. S.; Newman, J.; Streltsov, V. A.; Waddington, L.; Saito, T.; Tashiro, M.; McKimm-Breschkin, J. L., *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (17), 6421-6431; (b) Mohanta, P. K.; Dhar, S.; Samal, S. K.; Ila, H.; Junjappa, H., *Tetrahedron* **2000**, *56* (4), 629-637.
192. Smith, J.; Liras, J. L.; Schneider, S. E.; Anslyn, E. V., *J. Org. Chem.* **1996**, *61* (25), 8811-8818.
193. Stark, H.; Purand, K.; Ligneau, X.; Rouleau, A.; Arrang, J.-M.; Garbarg, M.; Schwartz, J.-C.; Schunack, W., *J. Med. Chem.* **1996**, *39* (5), 1157-1163.
194. Mallams, A. K.; Morton, J. B.; Reichert, P., *Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1981**, *0* (0), 2186-2208.
195. Schroeder, D. C., *Chem. Rev.* **1955**, *55* (1), 181-228.
196. Sharma, S., *Synthesis* **1978**, *1978* (11), 803-820.
197. Glasovac, Z.; Kovačević, B.; Meštrović, E.; Eckert-Maksić, M., *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46* (50), 8733-8736.
198. Ballini, R.; Bosica, G.; Fiorini, D.; Maggi, R.; Righi, P.; Sartori, G.; Sartorio, R., *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43* (47), 8445-8447.
199. Kurzer, F.; Douraghi-Zadeh, K., *Chem. Rev.* **1967**, *67* (2), 107-152.
200. Takikawa, Y.; Inoue, N.; Sato, R.; Takizawa, S., *Chem. Lett.* **1982**, *11* (5), 641-642.
201. Sauers, R. R.; Van Arnum, S. D., *Synthetic Communications* **2005**, *35* (15), 2033-2038.
202. Sugimoto, H.; Makino, I.; Hirai, K., *J. Org. Chem.* **1988**, *53* (10), 2263-2267.
203. Ramadas, K.; Srinivasan, N.; Janarthanan, N., *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34* (40), 6447-6450.

204. Xian, M.; Zhu, X.; Li, Q.; Cheng, J.-P., *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40* (10), 1957-1960.
205. Ramadas, K.; Srinivasan, N., *Synth. Commun.* **1995**, *25* (21), 3381-3387.
206. Yamazaki, N.; Tomioka, T.; Higashi, F., *Synthesis* **1975**, *1975* (06), 384-385.
207. Tamura, Y.; Adachi, M.; Kawasaki, T.; Kita, Y., *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19* (20), 1753-1754.
208. Katritzky, A. R.; Ledoux, S.; Witek, R. M.; Nair, S. K., *J. Org. Chem.* **2004**, *69* (9), 2976-2982.
209. Larsen, C.; Steliou, K.; Harpp, D. N., *J. Org. Chem.* **1978**, *43* (2), 337-339.
210. (a) DeBons, F. E.; Loudon, G. M., *J. Org. Chem.* **1980**, *45* (9), 1703-1704; (b) Fujita, Y.; Tsuda, Y.; Motoyama, T.; Li, T.; Miyazaki, A.; Yokoi, T.; Sasaki, Y.; Ambo, A.; Niizuma, H.; Jinsmaa, Y.; Bryant, S. D.; Lazarus, L. H.; Okada, Y., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15* (3), 599-602.
211. Schaffner, A.-P.; Lena, G.; Roussel, S.; Wawrezynieck, A.; Aubry, A.; Briand, J.-P.; Didierjean, C.; Guichard, G., *Chem. Commun.* **2006**, *0* (39), 4069-4071.
212. (a) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J., *Advanced Drug Delivery Reviews* **1997**, *23* (1-3), 3-25; (b) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J., *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *46* (1-3), 3-26.
213. Lajoie, G.; Lépine, F.; Maziak, L.; Belleau, B., *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24* (36), 3815-3818.
214. Davy, H., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1982**, *0* (8), 457-458.
215. Ozturk, T.; Ertas, E.; Mert, O., *Chem. Rev.* **2007**, *107* (11), 5210-5278.
216. Thompson, M. J.; Heal, W.; Chen, B., *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47* (14), 2361-2364.
217. Yousif, N. M.; Pedersen, U.; Yde, B.; Lawesson, S. O., *Tetrahedron* **1984**, *40* (14), 2663-2669.
218. Scheibye, S.; Kristensen, J.; Lawesson, S. O., *Tetrahedron* **1979**, *35* (11), 1339-1343.
219. Ozturk, T.; Ertas, E.; Mert, O., *Chem. Rev.* **2010**, *110* (6), 3419-3478.
220. Curphey, T. J., *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (18), 6461-6473.
221. Huszthy, P.; Oue, M.; Bradshaw, J. S.; Zhu, C. Y.; Wang, T.; Dalley, N. K.; Curtis, J. C.; Izatt, R. M., *J. Org. Chem.* **1992**, *57* (20), 5383-5394.
222. Tripathi, C. B.; Mukherjee, S., *J. Org. Chem.* **2012**, *77* (3), 1592-1598.
223. Ryoda, A.; Yajima, N.; Haga, T.; Kumamoto, T.; Nakanishi, W.; Kawahata, M.; Yamaguchi, K.; Ishikawa, T., *J. Org. Chem.* **2007**, *73* (1), 133-141.
224. Kai, H.; Morioka, Y.; Murashi, T.; Morita, K.; Shinonome, S.; Nakazato, H.; Kawamoto, K.; Hanasaki, K.; Takahashi, F.; Mihara, S.-i.; Arai, T.; Abe, K.; Okabe, H.; Baba, T.; Yoshikawa, T.; Takenaka, H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17* (14), 4030-4034.
225. Thanigaimalai, P.; Lee, K.-C.; Bang, S.-C.; Lee, J.-H.; Yun, C.-Y.; Roh, E.; Hwang, B.-Y.; Kim, Y.; Jung, S.-H., *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18* (3), 1135-1142.
226. Elbarbary, A. A.; Lawesson, S. O., *Indian J. Chem., Sect B* **1984**, *23* (7), 655-657.
227. Cow, C. N.; Harrison, P. H. M., *J. Org. Chem.* **1997**, *62* (25), 8834-8840.
228. Przychodzeń, W., *Heteroatom Chemistry* **2006**, *17* (7), 676-684.
229. (a) Gademann, K.; Seebach, D., *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84* (10), 2924-2937; (b) Frackenhohl, J.; Arvidsson, P. I.; Schreiber, J. V.; Seebach, D., *ChemBioChem* **2001**, *2* (6), 445-455.
230. El Mahdi, O.; Lavergne, J.-P.; Martinez, J.; Viallefont, P.; Essassi, E. M.; Riche, C., *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, *2000* (2), 251-255.
231. Müller-Hartwig, J. C. D.; Akyel, K. G.; Zimmermann, J., *J. Peptide Sci.* **2003**, *9* (3), 187-199.
232. (a) Springer, J.; Jansen, T. P.; Ingemann, S.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. H., *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2008* (2), 361-367; (b) Ha, K.; Monbaliu, J.-C. M.; Williams, B. C.; Pillai, G. G.; Ocampo, C. E.; Zeller, M.; Stevens, C. V.; Katritzky, A. R., *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (40), 8055-8058; (c) Hodge, C. N.; Fernandez, C. H.; Jadhav, P. K.; Lam, P. Y.-S. 1997.
233. 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* (12), 4884-4892.
234. Plattner, J. J.; Norbeck, D. W.; Clark, C. R.; Moos, W. H., *Obstacles to Drug Development from Peptide Leads. In Drug Discovery Technologies.* Ellis Horwood Limited: Chichester, England, 1990.
235. Zuckermann, R. N.; Martin, E. J.; Spellmeyer, D. C.; Stauber, G. B.; Shoemaker, K. R.; Kerr, J. M.; Figliozzi, G. M.; Goff, D. A.; Siani, M. A., *J. Med. Chem.* **1994**, *37* (17), 2678-2685.
236. (a) Burgess, K.; Ibarzo, J.; Linthicum, D. S.; Russell, D. H.; Shin, H.; Shitangkoon, A.; Totani, R.; Zhang, A. J., *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119* (7), 1556-1564; (b) Ventosa-Andrés, P.; Valdivielso, Á. M.;

- Pappos, I.; García-López, M. T.; Tsopanoglou, N. E.; Herranz, R., *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *58* (0), 98-111.
237. (a) Cho, C.; Moran, E.; Cherry; Stephans, J.; Fodor, S.; Adams, C.; Sundaram, A.; Jacobs, J.; Schultz, P., *Science* **1993**, *261* (5126), 1303-1305; (b) Wang, X.; Huq, I.; Rana, T. M., *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119* (27), 6444-6445.
238. (a) Calcagni, A.; Gavuzzo, E.; Lucente, G.; Mazza, F.; Morera, E.; Paglialunga Paradisi, M.; Rossi, D., *Biopolymers* **2000**, *54* (6), 379-387; (b) Moree, W. J.; van der Marel, G. A.; Liskamp, R. J., *J. Org. Chem.* **1995**, *60* (16), 5157-5169.
239. Han, H.; Janda, K. D., *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (11), 2539-2544.
240. Mungall, W. S.; Kaiser, J. K., *J. Org. Chem.* **1977**, *42* (4), 703-706.
241. Cho, C. Y.; Liu, C. W.; Wemmer, D. E.; Schultz, P. G., *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7* (6), 1171-1179.
242. Cho, C. Y.; Youngquist, R. S.; Paikoff, S. J.; Beresini, M. H.; Hebert, A. R.; Berleau, L. T.; Liu, C. W.; Wemmer, D. E.; Keough, T.; Schultz, P. G., *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (31), 7706-7718.
243. Tavares, F. X.; Deaton, D. N.; Miller, A. B.; Miller, L. R.; Wright, L. L., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15* (17), 3891-3895.
244. Wender, P. A.; Rothbard, J. B.; Jessop, T. C.; Kreider, E. L.; Wylie, B. L., *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (45), 13382-13383.
245. Thirkettle, J.; Alvarez, E.; Boyd, H.; Brown, M.; Diez, E.; Hueso, J.; Elson, S.; Fulston, M.; Gershater, C.; Morata, M. L.; Perez, P.; Ready, S.; Sanchez-Puellez, J. M.; Sheridan, R.; Stefanskac, A.; Warr, S., *J. Antibiot.* **2000**, *53* (7), 664-669
246. Isogai, A.; Sakuda, S.; Shindo, K.; Watanabe, S.; Suzuki, A.; Fujita, S.; Furuya, T., *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27* (10), 1161-1164.
247. Back, T. G.; Edwards, O. E.; MacAlpine, G. A., *Tetrahedron Lett.* **1977**, *18* (31), 2651-2654.
248. Jin, F.; Confalone, P. N. 2000.
249. Nishida, M.; Kodama, T.; Obika, S.; Imanishi, T., *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2007**, *51* (1), 157-158.
250. Letsinger, R. L.; Ogilvie, K. K., *J. Org. Chem.* **1967**, *32* (2), 296-300.
251. Malešević, M.; Schumann, M.; Jahreis, G.; Fischer, G.; Lücke, C., *ChemBioChem* **2012**, *13* (14), 2122-2127.
252. (a) Lam, P. Y. S.; Ru, Y.; Jadhav, P. K.; Aldrich, P. E.; DeLucca, G. V.; Eyermann, C. J.; Chang, C.-H.; Emmett, G.; Holler, E. R.; Daneker, W. F.; Li, L.; Confalone, P. N.; McHugh, R. J.; Han, Q.; Li, R.; Markwalder, J. A.; Seitz, S. P.; Sharpe, T. R.; Bacheler, L. T.; Rayner, M. M.; Klabe, R. M.; Shum, L.; Winslow, D. L.; Kornhauser, D. M.; Jackson, D. A.; Erickson-Viitanen, S.; Hodge, C. N., *J. Med. Chem.* **1996**, *39* (18), 3514-3525; (b) Sham, H. L.; Zhao, C.; Stewart, K. D.; Betebenner, D. A.; Lin, S.; Park, C. H.; Kong, X.-P.; Rosenbrook, W.; Herrin, T.; Madigan, D.; Vasavanonda, S.; Lyons, N.; Molla, A.; Saldivar, A.; Marsh, K. C.; McDonald, E.; Wideburg, N. E.; Denissen, J. F.; Robins, T.; Kempf, D. J.; Plattner, J. J.; Norbeck, D. W., *J. Med. Chem.* **1996**, *39* (2), 392-397; (c) Wilkerson, W. W.; Dax, S.; Cheatham, W. W., *J. Med. Chem.* **1997**, *40* (25), 4079-4088; (d) Han, W.; Pelletier, J. C.; Hodge, C. N., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8* (24), 3615-3620; (e) Han, Q.; Chang, C.-H.; Li, R.; Ru, Y.; Jadhav, P. K.; Lam, P. Y. S., *J. Med. Chem.* **1998**, *41* (12), 2019-2028; (f) Patel, M.; Kaltenbach Iii, R. F.; Nugiel, D. A.; McHugh Jr, R. J.; Jadhav, P. K.; Bacheler, L. T.; Cordova, B. C.; Klabe, R. M.; Erickson-Viitanen, S.; Garber, S.; Reid, C.; Seitz, S. P., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8* (9), 1077-1082.
253. Rondeau, J.-M.; Schreuder, H., Protein Crystallography and drug discovery. In *The practice of medicinal chemistry*, Wermuth, C. G., Ed. Elsevier: Illkirch, 2008.
254. (a) Wang, L.; Phanstiel, J. *Org. Chem.* **2000**, *65* (5), 1442-1447; (b) Phillips, R. J.; Fritz, J. S., *Anal. Chim. Acta* **1982**, *139* (0), 237-246.
255. Pan, Y. H.; Yu, B.-Z.; Singer, A. G.; Ghomashchi, F.; Lambeau, G.; Gelb, M. H.; Jain, M. K.; Bahnson, B. J., *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (32), 29086-29093.
256. (a) Guillier, F.; Orain, D.; Bradley, M., *Chem. Rev.* **2000**, *100* (6), 2091-2158; (b) Wang, S.-S., *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95* (4), 1328-1333.

257. Flipo, M.; Charton, J.; Hocine, A.; Dassonneville, S.; Deprez, B.; Deprez-Poulain, R., *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (21), 6790-6802.
258. MacNevin, C. J.; Moore, R. L.; Liotta, D. C., *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (4), 1264-1269.
259. Bew, S. P.; Bull, S. D.; Davies, S. G.; Eames, J.; Baxter, A. D.; Mykytiuk, J., *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40* (39), 7143-7146.
260. Davies, S. G.; Mortlock, A. A., *Tetrahedron* **1993**, *49* (20), 4419-4438.
261. Park, C. H.; Siomboing, X.; Yous, S. d.; Gressier, B.; Luyckx, M.; Chavatte, P., *Eur. J. Med. Chem.* **2002**, *37* (6), 461-468.
262. (a) Brunie, S.; Bolin, J.; Gewirth, D.; Sigler, P. B., *J. Biol. Chem.* **1985**, *260* (17), 9742-9; (b) Renetseder, R.; Brunie, S.; Dijkstra, B. W.; Drenth, J.; Sigler, P. B., *J. Biol. Chem.* **1985**, *260* (21), 11627-11634.
263. White, S. P.; Scott, D. L.; Otwinowski, Z.; Gelb, M. H.; Sigler, P. B., *Science* **1990**, *250*, 1560-1563.
264. Scott, D. L.; Otwinowski, Z.; Gelb, M. H.; Siegler, P. B., *Science* **1990**, *250* 1563-1566.
265. Wery, J. P.; Schevitz, R. W.; Clawson, D. K.; Bobbitt, J. L.; Dow, E. R.; Gamboa, G.; Goodson Jr, T.; Hermann, R. B.; Kramer, R. M.; McClure, D. B.; Mihelich, E. D.; Putnam, J. E.; Sharp, J. D.; Stark, D. H.; Teater, C.; Warrick, M. W.; Jones, N. D., *Nature* **1991**, *352* (6330), 79-82.
266. Lee, L. K.; Bryant, K. J.; Bouveret, R.; Lei, P.-W.; Duff, A. P.; Harrop, S. J.; Huang, E. P.; Harvey, R. P.; Gelb, M. H.; Gray, P. P.; Curmi, P. M.; Cunningham, A. M.; Church, W. B.; Scott, K. F., *J. Biol. Chem.* **2013**, *288* (21), 15269-15279.
267. Edwards, S. H.; Thompson, D.; Baker, S. F.; Wood, S. P.; Wilton, D. C., *Biochemistry* **2002**, *41* (52), 15468-15476.
268. Bissantz, C.; Folkers, G.; Rognan, D., *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (25), 4759-4767.
269. Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H.-Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D., *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (12), 2615-2623.
270. Ancian, P.; Lambeau, G.; Lazdunski, M., *Biochemistry* **1995**, *34* (40), 13146-13151.

## **Partie expérimentale**

The solvents were purchased from Sigma-Aldrich and used without any purification except for THF, DCM and toluene which were purified by the solvent purification system SPS 800 Manual from MBraun.

The *N*-protected amino acids were purchased from Polypeptide Laboratories or Iris Biotech, the reagents were purchased from Sigma-Aldrich, *Sieber* resin (loading = 0.67 mmol g<sup>-1</sup>, 75-150 mm) was purchased from Varian, *Kaiser oxime* resin (PS-oxime, loading = 1.3 mmol g<sup>-1</sup>, 75-150 mm), 4-mercaptomethyl polystyrene (PS-SH, 1.87 mmol g<sup>-1</sup>, 75-150 mm) were purchased from Polymer Laboratories, the (polystyrylmethyl)-trimethylammonium bicarbonate (5.9 mmol g<sup>-1</sup>) was purchased from EMD Biosciences and the 2-chlorotrityl chloride, the *Wang* resin (L = 0.44 mmol.g<sup>-1</sup>) was purchased from NovaBiochem, the 2-chlorotrityl *N*-Fmoc-hydroxylamine resin (L = 0.61 mmol g<sup>-1</sup>, 100-200 mm) was purchased from Sigma-Aldrich.

Thin layer chromatography (TLC) was performed on silica gel 60 F254 (Merck) with detection by UV light and charring with 1% ninhydrin in ethanol followed by heating. Flash column chromatography was carried out on silica gel (40-63 mm, Merck). Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC) purifications were carried out using a 21 mm x 250 mm column containing a Macherey-Nagel Nucleodur<sup>®</sup> C<sub>18</sub> packing (3 μm). Elution was achieved using gradient mixture of CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O + 0.1% TFA.

IR spectra were recorded with a Perkin Elmer Spectrum One spectrometer with an ATR (Attenuated Total Reflexion) accessory. <sup>1</sup>H-NMR spectra were recorded on different NMR spectrometers: an Avance II NMR\_spectrometer (Bruker Biospin) 300 MHz, DPX-300, DPX-400 (Bruker Biospin). RP-HPLC analyses were performed on a Dionex U3000SD using a Macherey-Nagel Nucleodur C<sub>18</sub> column (4.6 x 100 mm, 3 μm) at a flow rate of 1 ml.min<sup>-1</sup> or on a Beckman apparatus using a Nucleosil C<sub>18</sub> column (4 x 70 mm, 3 μm) at a flow rate of 1 ml.min<sup>-1</sup>. The mobile phase was composed of 0.1% (v/v) TFA in H<sub>2</sub>O (Solvent A) and 0.1% (v/v) TFA in CH<sub>3</sub>CN (Solvent B). Mass spectra have been recorded using an ESI-TOF apparatus (Bruker micro-TOF).

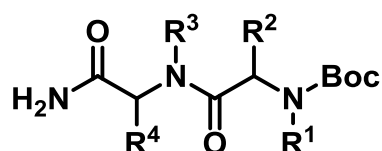
Crystal data were collected at 293 K using a CuKα graphite monochromated (λ = 1.54178 Å) radiation on a Bruker X8proteum diffractometer. The structures were solved using the SUPERFLIP software. Structures were solved by Brice Kauffmann in Institut Européen de Chimie et Biologie.

Compounds **III.29 C**, **III.29 D**, **III.29 G**, **III.29 H**, **III.34 A**, **III.34 B**, **III.36 D**, **III.36 E**, **III.36 F**, **IV.27**, **IV.28**, **VI.18** and **VI.19** were synthesized by M<sup>r</sup> Boeglin. Compounds **V.12 A**, **V.13 A**, **VI.20**, **VI.21** and **VI.22** were synthesised by M<sup>elle</sup> Lena.

### Compounds cited in chapter III

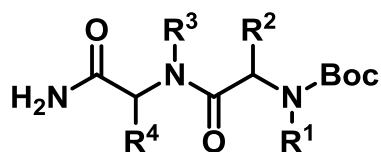
- **Parallel synthesis of 1,3,5-triazepane-2,6-diones on solid support : use of Hofmann rearrangement**

#### General procedure for amide synthesis III.23 by way A



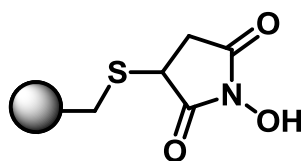
In a miniblock reactor, *Sieber* resin ( $L = 0.67 \text{ mmol.g}^{-1}$ , 672 mg, 0.45 mmol) was swollen in DMF, then vortexed with piperidine solution at DMF (1 : 4, v/v) (2.5 mL) for 20 min in room temperature (x 2). The resin was washed with DMF (6 x 2.5 mL) then 2.5 mL of DMF was added with Fmoc-Xaa-OH (0.9 mmol, 2 eq.), HOBt (0.12 g, 0.9 mmol, 2 eq.) and DIC (140  $\mu\text{L}$ , 0.9 mmol, 2 eq.). The mixture was vortexed for 2 h at room temperature then the resin was washed with DMF (3 x 2.5 mL). The coupling can be repeated in case of incompleteness. The resin was treated with piperidine solution in DMF (1 : 4, v/v) (2.5 mL) for 20 min at room temperature (2 x), the resin was washed with DMF (6 x 2.5 mL) then 2.5 mL of DMF was added with Boc-Xaa-OH (0.9 mmol, 2 eq.), HOBt (0.12 g, 0.9 mmol, 2 eq.) and DIC (140  $\mu\text{L}$ , 0.9 mmol, 2 eq.). The mixture was vortexed for 2 h at room temperature then the resin was washed with DMF (3 x 2.5 mL). The coupling can be repeated in case of incompleteness. The resin was washed with DMF (3 x 2.5 mL), MeOH (6 x 2.5 mL), DMF (6 x 2.5 mL),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (6 x 2.5 mL) and  $\text{Et}_2\text{O}$  (6 x 2.5 mL).

The dipeptide carboxamide was cleaved from the resin by a solution of TFA in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 : 98, v/v) (10 x 2.5 mL) for 2 min. Fractions were combined and pyridine (657  $\mu\text{L}$ , 7.82 mmol, 2 eq.) was added before concentration.

**General procedure for amide synthesis III.23 by way B**

In a miniblock reactor, *Sieber* resin ( $L = 0.67 \text{ mmol.g}^{-1}$ , 672 mg, 0.45 mmol) was swollen in DMF, then vortexed with piperidine solution at DMF (1 : 4, v/v) (2.5 ml) for 20 min in room temperature (x 2). The resin was washed with DMF (6 x 2.5 mL) then 2.5 mL of DMF was added with bromoacetic acid (0.125 g, 0.9 mmol, 2 eq.), HOBt (0.12g, 0.9 mmol, 2 eq.) and DIC (140  $\mu\text{L}$ , 0.9 mmol, 2 eq.). The mixture was vortexed for 2 h at room temperature then the resin was washed with DMF (3 x 2.5 mL). After filtration, DMF (2.5 mL) was added with primary amine (0.9 mmol, 2 eq.) and  $\text{Et}_3\text{N}$  (125  $\mu\text{L}$ , 0.9 mmol, 2 eq.) and the mixture was vortexed at room temperature for 4 h. The resin was washed with DMF (6 x 2.5 mL) then 2.5 mL of DMF was added with Boc-Xaa-OH (0.9 mmol, 2 eq.), HOBt (0.12 g, 0.9 mmol, 2 eq.) and DIC (140  $\mu\text{L}$ , 0.9 mmol, 2 eq.). The mixture was vortexed for 2 h at room temperature then the resin was washed with DMF (3 x 2.5 mL). The coupling can be repeated in case of incompleteness. The resin was washed with DMF (3 x 2.5 mL), MeOH (6 x 2.5 mL), DMF (6 x 2.5 mL),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (6 x 2.5 mL) and  $\text{Et}_2\text{O}$  (6 x 2.5 mL).

The dipeptide carboxamide was cleaved from the resin by a solution of TFA in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 : 98, v/v) (10 x 2.5 mL) for 2 min. Fractions were combined and pyridine (657  $\mu\text{L}$ , 7.82 mmol, 2 eq.) was added before concentration.

**N-hydroxysuccinimide resin synthesis PS-SuOH III.28**

The methyl-thiol polystyrene resin (PS-SH, 3.00 g, 5.61 mmol) was swollen in distilled THF, then N-hydroxymaleimide (1.27 g, 11.22 mmol, 2 eq.) in solution in THF (30 mL) and DIEA (381  $\mu\text{L}$ , 2.24 mmol, 0.4 eq.) were added. The mixture was stirred for 4 h under inert atmosphere at room temperature. The resin was filtered and washed with THF (6 x 30 mL),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (6 x 30 mL) and DMF (6 x 30 mL). Filtrate was concentrated and dried under vacuum and the N-hydroxymaleimide in excess was weighed (0.63 g, 5.57 mmol) to know the reaction yield. The resin was washed again with DMF (6 x 30 mL), water (6 x 30 mL), MeOH (6 x 30 mL),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (6 x 30 mL) and  $\text{Et}_2\text{O}$  (6 x 30 mL), then dried (3.63 g, 5.58 mmol, 1.54  $\text{mmol.g}^{-1}$ ).

IR (solid):  $\nu \text{ max (cm}^{-1}\text{)} = 1790, 1715 \text{ (CO)}, 1215 \text{ (NCO)}$ .



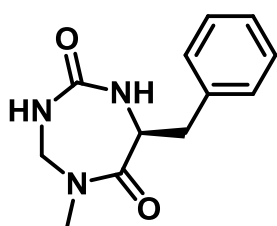
## General procedure for 1,3,5-triazepane-2,6-diones III.5 synthesis by cycloleavage

In MiniBlock reactor, BocXbbXaaNH<sub>2</sub> **III.23** (0.45 mmol) was dissolved in dry THF (2.5 mL) then pyridine (58  $\mu$ L, 0.72 mmol, 1.6 eq.) and PIFA (0.16 g, 0.36 mmol, 0.8 eq.) were added. The mixture was vortexed 1 h at room temperature then the N-hydroxysuccinimide resin (58 mg, 0.09 mmol, 0.2 eq.) was added. The mixture was vortexed 4 h at room temperature then the resin was filtered and washed with THF (6 x 30 mL), DMF (6 x 30 mL), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 x 30 mL), and Et<sub>2</sub>O (6 x 2.5 mL). The resin was dried and analyzed by IR spectrometry.

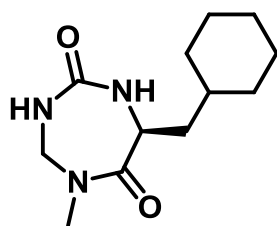
IR (solid):  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) = 3289 (NH), 1785, 1741, 1715, 1651 (CO), 1210 (NCO), 1165 (NCOO).

Resin was swollen in distilled CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> then a TFA solution in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25:75, v/v) (2.5 mL) was added and the mixture was vortexed for 30 min at room temperature (x2). The resin was filtered and washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 x 2.5 mL) and THF (1 x 2.5 mL). The resin was swollen in THF and DIEA (100  $\mu$ L, 0.45 mmol, 5 eq.) in THF (2.5 mL) was added. The mixture was vortexed for 4 h min at 35 °C then filtered and washed with THF (2.5 mL). Filtrate was dried under vacuum then dissolved in dried CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.5 mL) and trimethylammonium bicarbonate resin (L = 3.0 mmol.g<sup>-1</sup>, 0.38 g, 1.13 mmol, 2.5 eq.) was added. The mixture was stirred 3 h at room temperature and the desired compound was obtained after filtration and concentration.

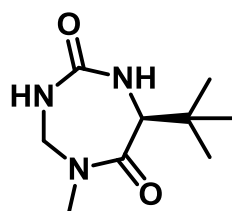
### cyclo((L)-Phe-gSar-CO) (A1,B1)



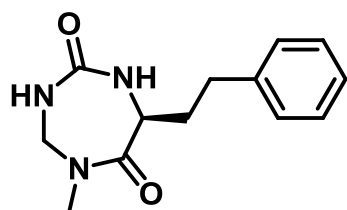
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN, 298 K)  $\delta$  = 2.78 (dd, J = 7.9, 14.3 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 3.0 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.22 (dd, J = 6.2, 14.2 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.02 (dd, J = 7.3, 15.7 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 4.76 (m, 1H, NCHCO), 4.93 (s, 1H, NH), 5.21 (dd, J = 5.3, 15.5 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 5.95 (s, 1H, NH), 7.24-7.38 (m, 5H, Ph). C<sub>18</sub>-HPLC  $t_R$  = 4.18 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 10-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [2M+Na]<sup>+</sup> = 489.2

**cyclo((L)-Cha-gSar-CO) (A1, B2)**

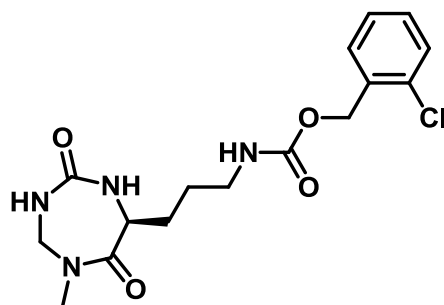
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ , 298 K)  $\delta$  = 1.16-1.43 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 1.64-1.83 (m, 7H,  $\text{CH}_2$ ), 2.55 (dd,  $J$  = 7.2, 14.2 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 2.99 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.09 (dd,  $J$  = 6.8, 12.8 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.03 (dd,  $J$  = 7.4, 15.5 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 4.48 (m, 1H), 5.03 (s, 1H), 5.21 (dd,  $J$  = 5.6, 15.8 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 5.93 (s, 1H, NH).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_{\text{R}}$  = 6.19 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 0-100% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$  = 501.0

**cyclo((L)- $\alpha$ -tBu-Gly-gSar-CO) (A1, B3)**

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 1.17 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 3.08 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 4.08 (dd,  $J$  = 7.3, 15.4 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 4.11 (m, 1H,  $\text{NCHCO}$ ), 4.73 (s, 1H, NH), 5.27 (dd,  $J$  = 7.3, 15.4 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 6.48 (s, 1H, NH).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_{\text{R}}$  = 4.90 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 0-100% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  = 222.2

**cyclo((L)-HomoPhe-gSar-CO) (A1, B4)**

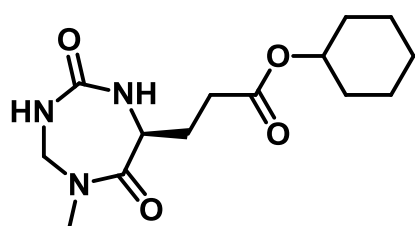
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 1.88 (td,  $J$  = 7, 14 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 2.33 (td,  $J$  = 7, 14 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 2.79 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 3.11 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 4.01 (dd,  $J$  = 7.3, 15.4 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 4.29 (m, 1H,  $\text{NCHCO}$ ), 5.09 (s, 1H, NH), 5.14 (dd,  $J$  = 7.3, 15.4 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 6.52 (m, 1H, NH), 7.21-7.34 (m, 5H, Ph).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_{\text{R}}$  = 5.68 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 0-100% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$  = 501.0

**cyclo((L)-Orn(2-Cl-Z)-gSar-CO) (A1, B5)**

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 1.58-2.04 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 2.96 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.05-3.44 (m, 3H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 4.27 (d,  $J$  = 9.8 Hz, 1H,  $\text{NCHCO}$ ), 5.08 (dd,  $J$  = 5.4, 15.6 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 5.22 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 6.36 (m, 1H, NH), 7.28-7.53 (m, 5H, Ph), 7.97 (s, 1H, NH).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_{\text{R}}$  = 6.16 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in

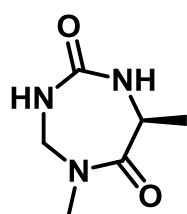
CH<sub>3</sub>CN, 0-100% B, 1 ml/min, 10 min).

**cyclo((L)-Glu(OcHx)-gSar-CO) (A1, B6)**



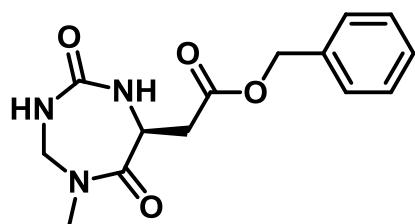
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) δ = 1.27-1.48 (m, 7H, CH<sub>2</sub>), 1.70-1.99 (m, 6H, CH<sub>2</sub>), 2.26 (m, 1H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 2.42-2.65 (m, 3H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 3.10 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 4.06 (dd, J = 7.2, 15.6 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 4.50 (m, 1H, NCHCO), 4.78 (m, 1H, NH), 5.24 (dd, J = 5.2, 15.5 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 6.56 (m, 1H, NH). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 6.14 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 0-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [2M+Na]<sup>+</sup> = 617.0

**cyclo((L)-Ala-gSar-CO) (A1, B7)**

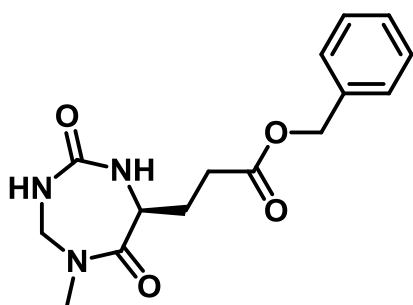


<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) δ = 1.41 (d, J = 6.7 Hz, 3H, CHCH<sub>3</sub>), 3.13 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 4.05 (dd, J = 7.1, 15.4 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 4.56 (m, 1H, NCHCO), 4.74 (s, 1H, NH), 5.31 (dd, J = 5.5, 15.6 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 6.03 (s, 1H, NH). MS(ESI) [M+Li]<sup>+</sup> = 164.1, Crystallographic data, see Table page 327

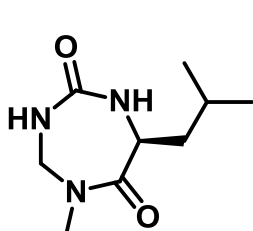
**cyclo((L)-Asp(OBn)-gSar-CO) (A1, B8)**



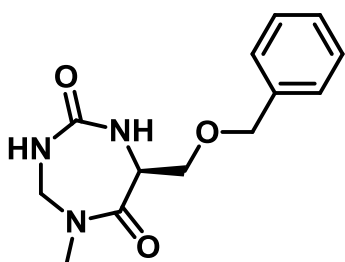
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) δ = 2.63 (dd, J = 5.8, 16.6 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>CO), 3.05 (dd, J = 7.8, 16.7 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>CO), 3.10 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 4.02 (dd, J = 7.2, 15.6 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 4.88 (m, 1H, NCHCO), 5.17 (dd, J = 12, 20.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 5.31 (dd, J = 5.1, 15.6 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 5.67 (s, 1H, NH), 6.57 (m, 1H, NH), 7.37 (m, 5H, Ph). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 5.63 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 0-100% B, 1 ml/min, 10 min). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 3.01 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 20-80% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [M + H]<sup>+</sup> = 292.0

**cyclo((L)-Glu(OBn)-gSar-CO) (A1, B10)**

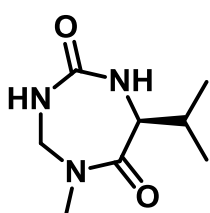
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 1.95 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 2.27 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 2.49-2.71 (m, 2H,  $\text{CHCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.08 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 4.01 (dd,  $J$  = 7.1, 15.6 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 4.46 (m, 1H,  $\text{NCHCO}$ ), 5.14 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 5.16 (dd,  $J$  = 5.3, 15.4 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 5.39 (m, 1H, NH), 7.36 (m, 5H, Ph).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 4.80 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 20-80% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{HMRS}$  calculated for  $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2$  : 306.1554 found : 306.1445

**cyclo((L)-Leu-gSar-CO) (A1, B11)**

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 0.97 (d,  $J$  = 3.3 Hz, 3H,  $\text{CHCH}_3$ ), 0.99 (d,  $J$  = 3.3 Hz, 3H,  $\text{CHCH}_3$ ), 1.47 (m, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.73-1.92 (m, 2H,  $\text{CHCH}_2\text{CH}$ ), 3.11 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 4.08 (dd,  $J$  = 7.1, 15.6 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 4.41 (m, 1H,  $\text{NCHCO}$ ), 4.69 (s, 1H, NH), 4.29 (dd,  $J$  = 5.3, 15.5 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 6.22 (s, 1H, NH).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 4.85 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 0-100% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 200.2$

**cyclo((L)-Ser(OBn)-gSar-CO) (A1, B12)**

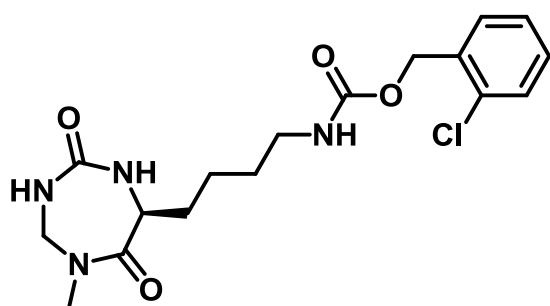
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 3.07 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.72 (t,  $J$  = 9.7 Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{O}$ ), 3.92 (dd,  $J$  = 4.0, 10.2 Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{O}$ ), 4.03 (dd,  $J$  = 7.0, 15.6 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 4.59 (d,  $J$  = 2.3 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.66 (m, 1H,  $\text{NCHCO}$ ), 5.22 (dd,  $J$  = 5.3, 15.6 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 5.25 (s, 1H, NH), 6.49 (m, 1H, NH), 7.36 (m, 5H, Ph).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 3.98 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 20-80% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[2\text{M} + \text{Na}]^+ = 548.9$

**Cyclo((L)-Val-gSar-CO) (A1, B13)**

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ , 298 K)  $\delta$  = 1.02 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 6H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.54 (q,  $J$  = 7.2 Hz, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.98 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.97 (dd,  $J$  = 5.0, 8.6 Hz, 1H,  $\text{NCHCO}$ ), 4.22 (dd,  $J$  = 7.0, 15.6 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 4.96 (dd,  $J$  = 5.8, 15.6 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 5.05 (s, 1H, NH), 5.87 (s, 1H, NH).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 4.11

min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 0-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [2M+Na]<sup>+</sup> = 420.9

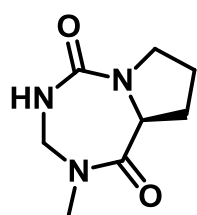
**cyclo((L)-Lys(2-Cl-Z)-gSar-CO) (A1, B14)**



<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K)  $\delta$  = 1.60-2.04 (m, 4H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.47-2.58 (m, 2H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.04 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.69-3.88 (m, 1H, NHCH<sub>2</sub>NH), 4.30-4.39 (m, 1H, NHCHCO), 5.07-5.32 (m, 4H, NHCH<sub>2</sub>NH, OCH<sub>2</sub>Ph), NHCHCO), 6.47 (m, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 7.27-7.49 (m,

4H, Ph), 7.56 (m, 1H, CH<sub>2</sub>NHCO). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 6.37 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 0-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [2M + Na]<sup>+</sup> = 786.8.

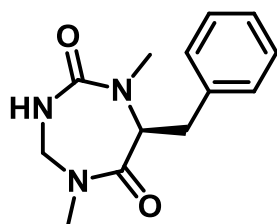
**cyclo((L)-Pro-gSar-CO) (A1, B15)**



<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K)  $\delta$  = 1.74-2.14 (m, 4H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.57 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.10 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.57 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.0 (dd, J = 7.3, 15.6 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 4.69 (t, J = 6.9 Hz, 1H, NCHCO), 5.33 (dd, J = 5.6,

15.4 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 6.06 (m, 1H, NH). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 3.91 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 0-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [2M + Na]<sup>+</sup> = 389.2

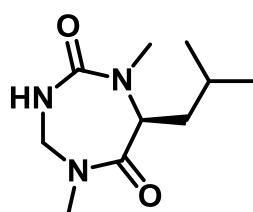
**cyclo((L)-(NMe)Phe-gSar-CO) (A1, B16)**



<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K)  $\delta$  = 2.69 (s, 3H, NHCONCH<sub>3</sub>), 3.03 (s, 3H, CHCONCH<sub>3</sub>), 3.29 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.26 (dd, J = 6.2, 7.5 Hz, 1H, NCHCO), 4.36 (dd, J = 7.0, 14.0 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 4.52 (dd, J = 4.2, 14.0 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 5.93 (m, 1H, NH), 7.28 (m, 5H, Ph). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 5.45

min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 0-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [2M + Na]<sup>+</sup> = 517.3, Crystallographic data, see Table page 328

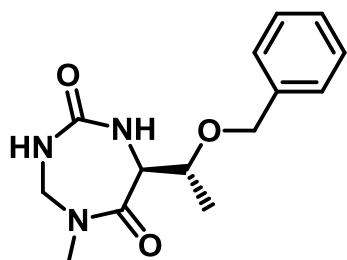
**cyclo((L)-(NMe)Leu-gSar-CO) (A1, B17)**



<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K)  $\delta$  = 0.99-1.04 (m, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.75-1.90 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.95 (s, 3H, OCN(CH<sub>3</sub>)CH), 3.05

(OCN(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>), 4.47 (dd, J = 5.4, 8.7 Hz, 1H, NCHCO), 4.47 (dd, J = 6.8, 14.5 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 5.61 (m, 1H, NHCH<sub>2</sub>N). MS(ESI): [M + H]<sup>+</sup> = 214.0

**cyclo((L)-Thr(OBn)-gSar-CO) (A1, B21)**

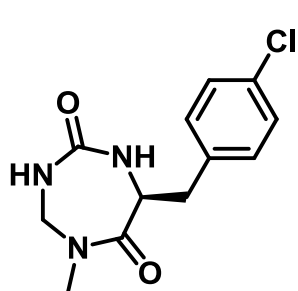


<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) δ = 1.31 (d, J = 8.5 Hz, 3H, CHCH<sub>3</sub>), 3.11 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 4.04-4.12 (m, 2H, CHCH<sub>3</sub>, NHCH<sub>2</sub>N), 4.30-4.33 (m, 1H, NHCHCO), 4.53 (d, J = 11.3 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.74 (d, J = 11.3 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 5.28 (dd, J = 5.2, 15.5 Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 5.51 (m, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 7.30-7.44 (m, 5H, Ph). C<sub>18</sub>

HPLC t<sub>R</sub> = 4.67 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 20-80% B, 1 ml/min, 10 min).

MS(ESI): [M + H]<sup>+</sup> = 278.1

**cyclo((L)-(4-Cl)Phe-gSar-CO) (A1, B22)**

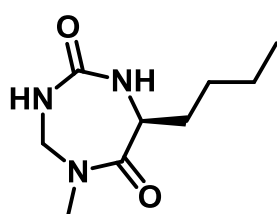


<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) δ = 2.83 (dd, J = 8.1, 14.4 Hz, 1H, NCH(CH<sub>2</sub>Ph)CO), 3.13 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.70 (dd, J = 5.8, 14.3 Hz, 1H, NCH(CH<sub>2</sub>Ph)CO), 4.06 (dd, J = 7.0, 15.6 Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 4.61-4.67 (m, 1H, NHCHCO), 4.80 (s, 1H, NHCHCO), 5.26 (dd, J = 5.2, 15.5 Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 6.33 (s, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 7.24-7.35 (m, 4H, Ph). C<sub>18</sub>-HPLC

t<sub>R</sub> = 4.98 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 20-80% B, 1 ml/min, 10 min)

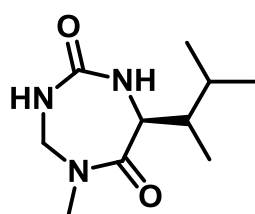
MS(ESI): [M + H]<sup>+</sup> = 267.9

**cyclo((L)-Nle-gSar-CO) (A1, B23)**

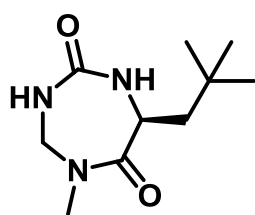


<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) δ = 0.82-0.94 (m, 3H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.27-1.46 (m, 3H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.81-2.16 (m, 3H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.30-2.41 (m, 1H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.13 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 4.09 (dd, J = 7.2, 15.7 Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 4.32-4.36 (m, 1H, NHCHCO), 4.68 (s, 1H, NHCHCO),

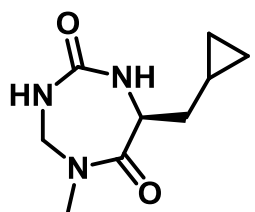
5.29 (dd, J = 5.3, 15.5 Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 6.04 (s, 1H, NHCH<sub>2</sub>N). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 4.19 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 20-80% B, 1 ml/min, 10 min). HRMS(ESI): m/z : calculée pour C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>LiN<sub>3</sub>O<sub>3</sub> : 405.2724, expérimentale : 405.2756

**cyclo((L)-Ile-gSar-CO) (A1, B25)**

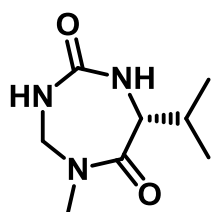
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K)  $\delta$  = 0.98-1.09 (m, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCH(CH<sub>3</sub>)CH), 1.95-2.09 (m, 2H, CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCH(CH<sub>3</sub>)CH), 3.12 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 4.09 (dd, J = 4.6, 7.7 Hz, 1H, NCHCO), 4.30 (dd, J = 6.8, 15.5 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 4.76 (m, 1H, NHCHCO), 5.06 (dd, J = 5.6, 15.4 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 5.70 (m, 1H, NHCH<sub>2</sub>N). MS(ESI): [2M + Na]<sup>+</sup> = 445.7

**cyclo((L)- $\beta$ -(tBu)Ala-gSar-CO) (A1, B26)**

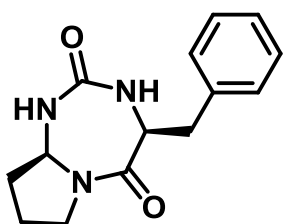
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K)  $\delta$  = 1.01 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C), 1.58-1.81 (m, 2H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CCH<sub>2</sub>), 3.14 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 4.14 (dd, J = 7.1, 15.7 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 4.41-4.46 (m, 1H, NCHCO), 4.57 (m, 1H, NHCHCO), 5.32 (dd, J = 5.4, 15.7 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 5.76 (m, 1H, NHCH<sub>2</sub>N). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 4.60 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 20-80% B, 1 ml/min, 10 min) MS(ESI): [2M + Na]<sup>+</sup> = 448.7

**cyclo((L)- $\beta$ -(cyclopropyl)Ala-gSar-CO) (A1, B27)**

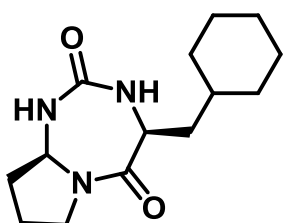
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K)  $\delta$  = 0.08-0.21 (m, 4H, (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)CH), 0.57-0.62 (m, 1H, (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)CH), 1.96-2.05 (m, 2H, CHCH<sub>2</sub>CH), 3.14 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 4.10 (dd, J = 7.0, 15.6 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 4.67-4.52 (m, 1H, NHCHCO), 4.65 (m, 1H, NHCHCO), 5.35 (dd, J = 5.3, 15.6 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 5.56 (m, 1H, NHCH<sub>2</sub>N). MS(ESI): [M + H]<sup>+</sup> = 198.1

**cyclo((D)Val-gSar-CO) (A1, B34)**

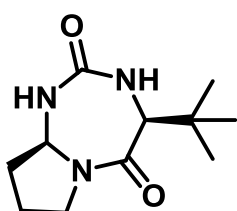
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K)  $\delta$  = 1.08-1.14 (m, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.19-2.28 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.12 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 4.02 (dd, J = 4.3, 7.6 Hz, 1H, NCHCO), 4.25 (dd, J = 6.8, 15.6 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 4.67 (m, 1H, NHCHCO), 5.11 (dd, J = 5.6, 15.6 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 5.60 (m, 1H, NHCH<sub>2</sub>N). MS(ESI): [2M + Na]<sup>+</sup> = 393.1

**cyclo((L)-Phe-g((L)-Pro)-CO) (A2, B1)**

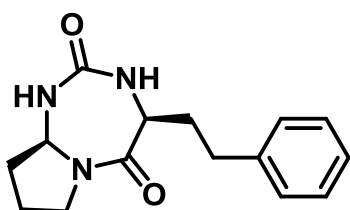
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 1.94 (m, 2H,  $\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)\text{N}$ ), 2.12 (m, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)\text{N}$ ), 2.26 (m, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)\text{N}$ ), 2.81 (dd,  $J$  = 8.8, 14.5 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 3.40 (dd,  $J$  = 5.3, 14.6 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 3.52 (m, 1H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.83 (m, 1H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 4.59 (m, 1H,  $\text{NCHCO}$ ), 4.74 (s, 1H,  $\text{NH}$ ), 5.49 (m, 1H,  $\text{NCHN}$ ), 6.40 (s, 1H,  $\text{NH}$ ), 7.31 (m, 5H, Ph).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 3.91 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 20-80% B, 1 ml/min, 10 min),  $\text{MS}(\text{ESI})$ :  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$  = 540.7

**cyclo((L)-Cha-g((L)-Pro)-CO) (A2, B2)**

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 0.82-1.55 (m, 10H,  $\text{CH}_2$ ), 1.66-2.36 (m, 6H,  $\text{CH}_2$ ), 3.47-3.56 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.79-3.86 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.37-4.43 (m, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 4.68 (s, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 5.52-5.56 (m, 1H,  $\text{NHCHN}$ ), 6.53 (s, 1H,  $\text{NHCHN}$ ).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 5.90 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 10-100% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS}(\text{ESI})$ :  $[2\text{M} + \text{Na}]^+$  = 552.9

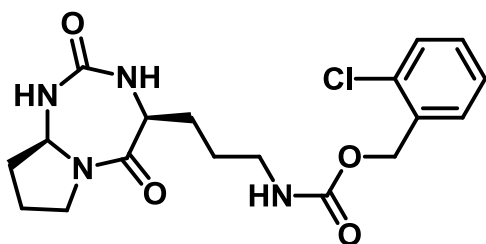
**cyclo((L)-  $\alpha$ -tBu-Gly-g((L)-Pro)-CO) (A2, B3)**

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 1.19 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 1.93-2.35 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 3.44-3.53 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.79-3.87 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.03 (d, 4.8 Hz,  $\text{NHCHCO}$ ), 4.74 (s, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 5.51-5.55 (m, 1H,  $\text{NHCHN}$ ), 6.37 (s, 1H,  $\text{NHCHN}$ ).  $\text{MS}(\text{ESI})$ :  $[2\text{M} + \text{Na}]^+$  = 472.9

**cyclo((L)-HomoPhe-g((L)-Pro)-CO) (A2, B4)**

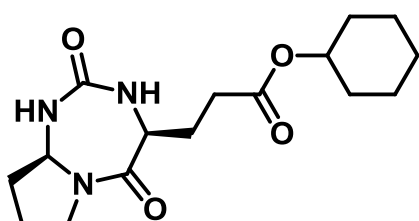
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 1.8-2.41 (m, 6H,  $\text{CH}_2$ ), 2.81 (t,  $J$  = 7.3 Hz,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.47-3.56 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.79-3.87 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.23 (td,  $J$  = 3.5, 6.8 Hz, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 5.08 (s, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 5.39-5.43 (m, 1H,  $\text{NHCHN}$ ), 6.58 (s, 1H,  $\text{NHCHN}$ ), 7.22-7.36 (m, 5H, Ph).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 5.53 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 10-100% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS}(\text{ESI})$ :  $[2\text{M} + \text{H}]^+$  = 546.9



**cyclo((L)-Orn(2-Cl-Z)-g((L)-Pro)-CO) (A2, B5)**

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 1.56-2.32 (m, 8H,  $\text{CH}_2$ ), 3.3 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 3.45 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.82 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.28 (m, 1H,  $\text{OCH}_2\text{NH}$ ), 5.26 (d,  $J$  = 13.9 Hz,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 5.45 (m, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 7.24-7.46 (m, 4H, Ph).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 6.05 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 10-100% B, 1 ml/min, 10 min).

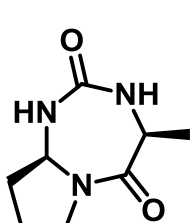
$\text{MS(ESI)}$ :  $[2\text{M} + \text{Na}]^+ = 810.9$

**cyclo((L)-Glu(OcHx)-g((L)-Pro)-CO) (A2, B6)**

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 1.24-1.60 (m, 8H,  $\text{CH}_2$ ), 1.71-2.34 (m, 11H,  $\text{CH}_2$ ), 2.45-2.67 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.47-3.58 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.78-3.86 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.45 (td,  $J$  = 3.4, 6.5 Hz, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{CO}$ ), 4.75-4.84 (m, 1H,  $\text{OCH}(\text{CH}_2)_2$ ), 5.22 (s, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{CO}$ ), 5.48-5.52 (m, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 6.50 (s, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ).

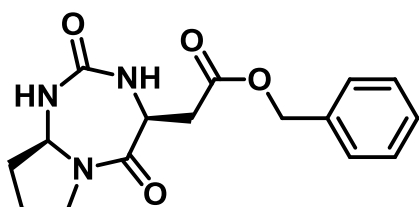
$\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 5.96 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 10-100% B, 1 ml/min, 10 min).

$\text{MS(ESI)}$ :  $[2\text{M} + \text{Na}]^+ = 668.9$ , Crystallographic data, see Table page 331

**cyclo((L)-Ala-g((L)-Pro)-CO) (A2, B7)**

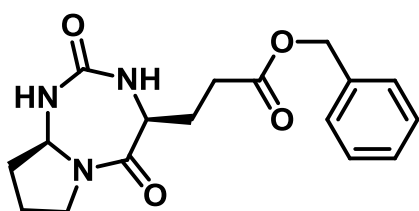
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 1.40 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.90-2.21 (m, 3H,  $\text{CH}_2$ ), 2.26-2.41 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 3.50-3.59 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.78-3.86 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.49 (qd,  $J$  = 2.9, 6.6 Hz,  $\text{NHCH}_2\text{CO}$ ), 4.81 (s, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{CO}$ ), 5.49-5.55 (m, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 6.17 (s, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ).

$\text{MS(ESI)}$ :  $[2\text{M} + \text{Na}]^+ = 388.8$

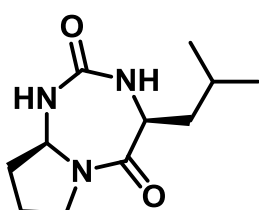
**cyclo((L)-Asp(OBn)-g((L)-Pro)-CO) (A2, B8)**

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 1.85-2.19 (m, 3H,  $\text{CH}_2$ ), 2.25-2.37 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 2.63 (dd,  $J$  = 5.9, 16.5 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{COO}$ ), 3.09 (dd,  $J$  = 7.8, 16.6 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{COO}$ ), 3.48-3.57 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.77-3.85 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.80-4.86 (m, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{CO}$ ), 5.19 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 5.54-5.59 (m, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 6.47 (s, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{CO}$ ), 7.36-7.41 (m, 5H, Ph).

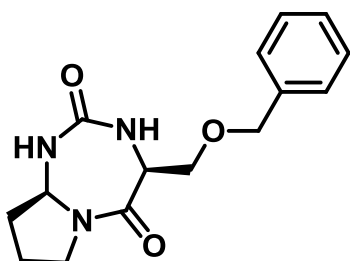
$\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 5.55 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 10-100% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[2\text{M} + \text{H}]^+ = 657.0$

**cyclo((L)-Glu(OBn)-g((L)-Pro)-CO) (A2, B10)**

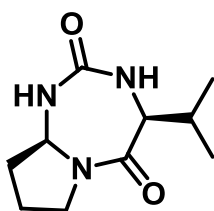
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K)  $\delta$  = 1.88-2.18 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 2.22-2.36 (m, 2H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 2.51-2.74 (m, 2H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 3.45-3.54 (m, 1H, CH<sub>2</sub>N), 3.77-3.85 (m, 1H, CH<sub>2</sub>N), 4.37-4.43 (m, 1H, NHCHCO), 5.16 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 5.40-5.44 (m, 1H, NHCHN), 6.23 (s, 1H, NHCHN), 7.35-7.41 (m, 5H, Ph). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 5.70 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 10-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [2M + Na]<sup>+</sup> = 684.8

**cyclo((L)-Leu-g((L)-Pro)-CO) (A2, B11)**

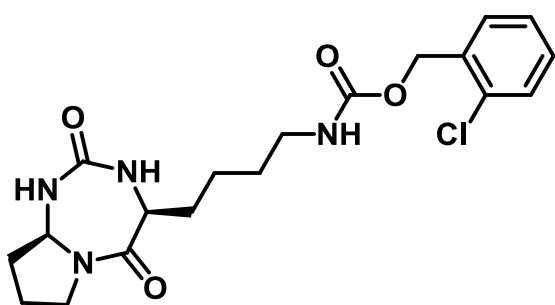
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K)  $\delta$  = 0.99 (dd, J = 5.4, 6.3 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>), 1.43-1.50 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.72-1.89 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.91-2.21 (m, 3H, CH<sub>2</sub>), 2.26-2.38 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.48-3.57 (m, 1H, CH<sub>2</sub>N), 3.79-3.87 (m, 1H, CH<sub>2</sub>N), 4.32-4.38 (m, 1H, NHCHCO), 4.67 (s, 1H, NHCHCO), 5.54-5.58 (m, 1H, NHCHN), 6.21 (s, 1H, NHCHN). MS(ESI): [2M + Na]<sup>+</sup> = 472.9

**cyclo((L)-Ser(OBn)-g((L)-Pro)-CO) (A2, B12)**

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K)  $\delta$  = 1.92-2.20 (m, 3H, CH<sub>2</sub>), 2.24-2.37 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.47-3.55 (m, 1H, CH<sub>2</sub>N), 3.70-3.83 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N, CHCH<sub>2</sub>O), 3.94 (dd, J = 4.1, 10.2 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>O), 4.61 (m, 3H, OCH<sub>2</sub>Ph, NHCHCO), 5.23 (s, 1H, NHCHCO), 5.45-5.50 (m, 1H, NHCHN), 6.49 (s, 1H, NHCHN), 7.33-7.39 (m, 5H, Ph). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 5.32 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 10-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [2M + H]<sup>+</sup> = 601.0

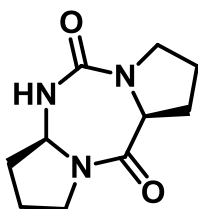
**cyclo((L)-Val-g((L)-Pro)-CO) (A2, B13)**

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K)  $\delta$  = 1.11 (d, J = 6.6 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.92-2.37 (m, 5H, CH<sub>2</sub>, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.46-3.56 (m, 1H, CH<sub>2</sub>N), 3.79-3.87 (m, 1H, CH<sub>2</sub>N), 4.03 (dd, J = 4.0, 7.1 Hz, NHCHCO), 4.74 (s, 1H, NHCHCO), 5.50-5.54 (m, 1H, NHCHN), 6.28 (s, 1H, NHCHN). MS(ESI): [2M + Na]<sup>+</sup> = 444.8

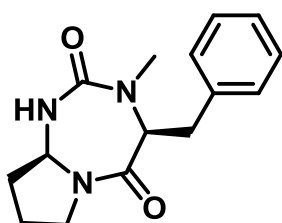
**cyclo((L)-Lys(2-Cl-Z)-g((L)-Pro)-CO) (A2, B14)**

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ , 298 K)  $\delta$  = 1.11-1.16 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.31-2.39 (m, 10H,  $\text{CH}_2$ ), 3.16 (dd,  $J$  = 6.1, 12.3 Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOO}$ ), 3.33-3.42 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.63-3.71 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.28-4.36 (m, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 5.18 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 5.47-5.52 (m, 1H,  $\text{NHCHN}$ ), 5.96-6.09 (m, 1H, NH), 7.35-

7.51 (m, 4H, Ph).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 6.24 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 10-100% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[2\text{M} + \text{Na}]^+ = 838.8$

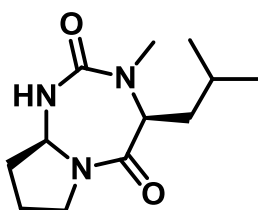
**cyclo((L)-Pro-g((L)-Pro)-CO) (A2, B15)**

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 1.78-2.20 (m, 6H,  $\text{CH}_2$ ), 2.27-2.40 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 2.57-2.68 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 3.49-3.66 (m, 3H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.76-3.84 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.65 (dd,  $J$  = 5.8, 7.3 Hz, 1H,  $\text{NCHCO}$ ), 5.45-5.49 (m, 1H, NH), 5.51-5.56 (m, 1H,  $\text{NHCHN}$ ).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[2\text{M} + \text{Na}]^+ = 440.9$

**cyclo((L)-NMe-Phe-g((L)-Pro)-CO) (A2, B16)**

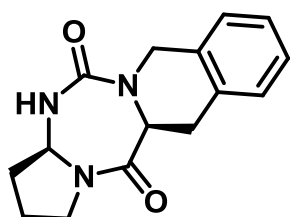
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 1.78-1.95 (m, 3H,  $\text{CH}_2$ ), 2.00-2.11 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 2.56 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.26 (dd,  $J$  = 8.8, 13.7 Hz,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.38 (dd,  $J$  = 4.9, 13.9 Hz,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.66-3.74 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.21 (dd,  $J$  = 4.9, 8.4 Hz,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 5.02 (s, 1H, NH), 5.05-5.11 (m, 1H,  $\text{NHCHN}$ ), 7.22-7.36 (m, 5H, Ph).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 5.21 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ ,

B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 10-100% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[2\text{M} + \text{Na}]^+ = 569.3$

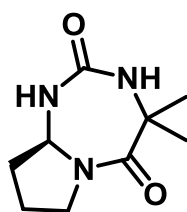
**cyclo((L)-NMe-Leu-g((L)-Pro)-CO) (A2, B17)**

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 0.99 (dd,  $J$  = 3.4, 6.3 Hz, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 1.69-2.12 (m, 6H,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.27-2.36 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 2.89 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.62-3.68 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.05 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 5.19 (td,  $J$  = 1.6, 7.0 Hz, 1H,  $\text{NHCHN}$ ), 5.28 (s, 1H,  $\text{NHCHN}$ ).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  =

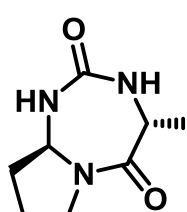
4.80 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 10-100% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[2\text{M} + \text{Na}]^+ = 501.1$

**cyclo((L)-Tic-g((L)-Pro)-CO) (A2, B19)**

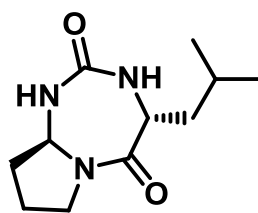
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 1.84-2.13 (m, 3H,  $\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)\text{N}$ ), 2.25-2.34 (m, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)\text{N}$ ), 3.10 (dd,  $J$  = 5.0, 15.7 Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 3.36 (dd,  $J$  = 10.5, 15.7 Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 3.54-3.62 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.75-3.84 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.40 (d,  $J$  = 15.2 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ), 4.60 (dd,  $J$  = 4.9, 10.5 Hz, 1H,  $\text{NCHCO}$ ), 4.89 (d,  $J$  = 15.2 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ), 5.43-5.48 (m, 1H,  $\text{NHCHN}$ ), 5.94 (m, 1H,  $\text{NHCHN}$ ), 7.21-7.30 (m, 4H, Ph).  $\text{C}_{18}$ -HPLC  $t_R$  = 4.19 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 20-80% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS}(\text{ESI})$ :  $[2\text{M} + \text{Na}]^+ = 565.3$

**cyclo(Aib-g((L)-Pro)-CO) (A2, B28)**

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 1.57 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_2\text{C}$ ), 1.86-2.05 (m, 3H,  $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 2.34-2.43 (m, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)\text{N}$ ), 3.61-3.79 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.40 (s, 1H,  $\text{NHCCO}$ ), 5.34 (m, 1H,  $\text{NHCHN}$ ), 5.74 (s, 1H,  $\text{NHCHN}$ ).  $\text{C}_{18}$ -HPLC  $t_R$  = 3.9 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 0-100% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS}(\text{ESI})$ :  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 197.9$ , Crystallographic data, see Table page 331

**cyclo((D)-Ala-g((L)-Pro)-CO) (A2, B32)** mixture of two isomers.

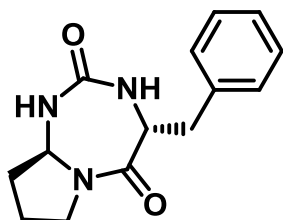
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 1.41 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 3H,  $\text{CH}_3\text{CH}$ ), 1.59 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 3H,  $\text{CH}_3\text{CH}$ ), 1.88-2.20 (m, 6H,  $\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)\text{N}$ ), 2.28-2.46 (m, 2H,  $\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)\text{N}$ ), 3.51-3.86 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.10-4.18 (m, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 4.45-4.53 (m, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 4.73 (s, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 4.83 (s, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 5.31-5.36 (m, 1H,  $\text{NHCHN}$ ), 5.50-5.55 (m, 1H,  $\text{NHCHN}$ ), 5.94 (m, 2H,  $\text{NHCHN}$ ).  $\text{MS}(\text{ESI})$ :  $[2\text{M} + \text{Na}]^+ = 389.1$ , Crystallographic data, see Table page 330

**cyclo((D)-Leu-g((L)-Pro)-CO) (A2, B33)**

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 0.95-1.03 (m, 6H,  $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ ), 1.89-2.10 (m, 3H,  $\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)\text{N}$ ), 2.28-2.42 (m, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)\text{N}$ ), 2.51-2.59 (m, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{CH}$ ), 3.04-3.17 (m, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{CH}$ ), 3.46-3.56 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.75-3.85 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.96-4.03 (m, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 5.30-5.35 (m, 2H,  $\text{NHCHCO}$ ,  $\text{NHCHN}$ ), 6.89 (m, 1H,  $\text{NHCHN}$ ).  $\text{C}_{18}$ -HPLC  $t_R$  = 6.83 min

(A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 20-80% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [2M + Na]<sup>+</sup> = 273.1

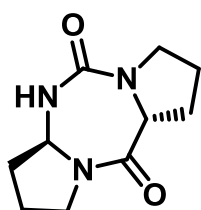
**cyclo((D)-Phe-g((L)-Pro)-CO) (A2, B35)**



<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) δ = 1.80-2.00 (m, 3H, CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)N), 2.12-2.30 (m, 1H, CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)N), 3.01-3.13 (m, 1H, NCH(CH<sub>2</sub>Ph)CO), 3.26 (dd, J = 3.8, 13.6 Hz, 1H, NCH(CH<sub>2</sub>Ph)CO), 3.52-3.61 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.72-3.81 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.24-4.30 (m, 1H, NHCHCO), 4.65 (m, 1H, NHCHCO), 4.96-5.01 (m, 1H, NHCHN),

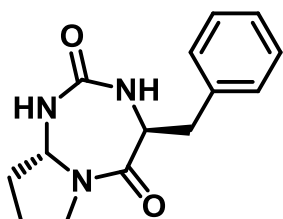
6.75 (m, 1H, NHCHN), 7.23-7.37 (m, 5H, Ph). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 7.36 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 20-80% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [2M + Na]<sup>+</sup> = 241.1

**cyclo((D)-Pro-g((L)-Pro)-CO) (A2, B36)**



<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) δ = 1.77-2.14 (m, 6H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.21-2.37 (m, 1H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.44-2.55 (m, 1H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.28-3.37 (m, 1H, CH<sub>2</sub>N), 3.64-3.80 (m, 3H, CH<sub>2</sub>N), 4.15 (t, J = 8.4 Hz, 1H, NCHCO), 5.07-5.12 (m, 1H, NHCHN), 5.23 (s, 1H, NH). MS(ESI): [2M + Na]<sup>+</sup> = 441.3

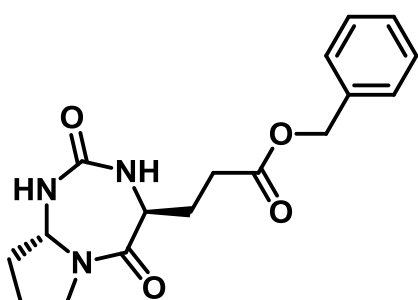
**cyclo((L)-Phe-g((D)-Pro)-CO) (A13, B1)**



<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) δ = 1.77-2.20 (m, 4H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.01-3.21 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.52 (m, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 3.71 (m, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.26 (m, 1H, NCHCO), 4.89-5.01 (m, 2H, NCHN, NH), 6.57 (s, 1H, NH), 7.27 (m, 5H, Ph). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 5.41 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 0-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [2M + Na]<sup>+</sup> =

540.9

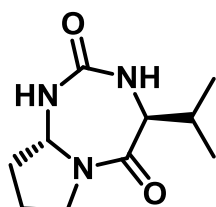
**cyclo((L)-Glu(OBn)-g((D)-Pro)-CO) (A13, B10)**



<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) δ = 1.87-2.04 (m, 4H, CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)N), 2.19-2.27 (m, 2H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 2.53-2.59 (m, 2H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 3.46-3.55 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.71-3.80 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.97-4.03 (m, 1H, NHCHCO),

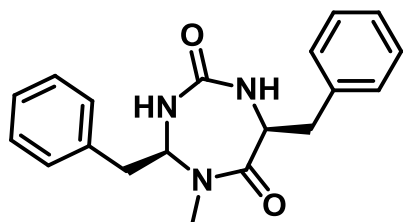
5.15 (d,  $J = 3.0$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 5.28-5.33 (m, 1H, NHCHN), 5.50 (m, 1H, NHCHCO), 6.78 (s, 1H, NHCHN), 7.35-7.43 (m, 5H, Ph). C<sub>18</sub>-HPLC  $t_R = 4.92$  min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 20-80% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [2M + Na]<sup>+</sup> = 685.9

**cyclo((L)-Val-g((D)-Pro)-CO) (A13, B13)**



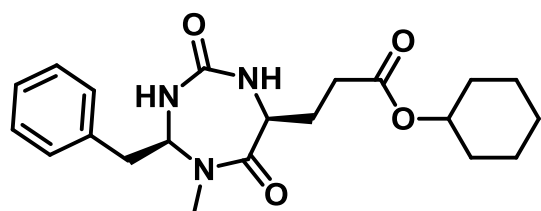
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K)  $\delta = 1.02-1.08$  (m, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH), 1.89-2.37 (m, 4H, CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)N), 2.52 (q,  $J = 7.1$  Hz, 1H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH), 3.45-3.57 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.78-3.86 (m, 1H, NHCHCO), 5.33-5.36 (m, 1H, NHCHN), 5.42 (m, 1H, NHCHCO), 6.84 (s, 1H, NHCHN). C<sub>18</sub>-HPLC  $t_R = 5.01$  min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 20-80% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [2M + Na]<sup>+</sup> = 445.2

**cyclo((L)-Phe-g((L)-NMe-Phe)-CO) (A3, B1)**

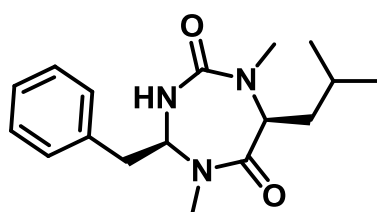


<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K)  $\delta = 2.82$  (dd,  $J = 8.9, 14.5$  Hz, 1H, COCHCH<sub>2</sub>Ph), 2.96 (dd,  $J = 8.6, 14.3$  Hz, 1H, CH<sub>3</sub>NCHCH<sub>2</sub>Ph), 3.06 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.17 (dd,  $J = 5.4, 14.3$  Hz, 1H, COCHCH<sub>2</sub>Ph), 3.42 (dd,  $J = 5.0, 14.5$  Hz, 1H, CH<sub>3</sub>NCHCH<sub>2</sub>Ph), 4.67 (s, 1H, NH), 4.78 (m, 1H, NCHCO), 5.72 (m, 1H, NCHN), 5.87 (s, 1H, NH), 7.3 (m, 10H, Ph). C<sub>18</sub>-HPLC  $t_R = 7.00$  min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 20-80% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI) [2M + Na]<sup>+</sup> = 646.8

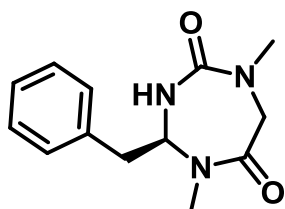
**cyclo((L)-Glu(OcHx)-g((L)-NMe-Phe)-CO) (A3, B6)**



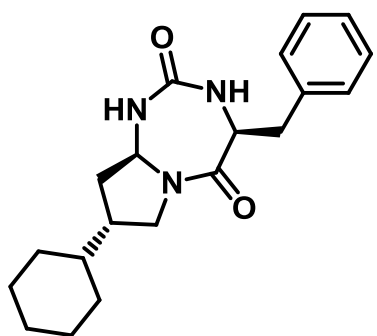
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K)  $\delta = 1.27-1.78$  (m, 10H, CH<sub>2</sub>), 2.24-2.36 (m, 1H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 2.44-2.67 (m, 3H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 2.95-3.05 (m, 4H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Ph), 3.20 (dd,  $J = 5.3, 14.4$  Hz, CH<sub>2</sub>Ph), 4.65 (td,  $J = 2.7, 6.4$  Hz, OCH), 4.74-4.85 (m, 1H, NHCHCO), 5.15 (sn 1H, NH), 5.73-5.83 (m, 2H, NHCHN, NHCHN), 7.26-7.42 (m, 5H, Ph). C<sub>18</sub>-HPLC  $t_R = 7.73$  min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 10-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [2M + Na]<sup>+</sup> = 796.9

**cyclo((NMe)Leu-g(NMe)Phe-CO) (A3, B17)**

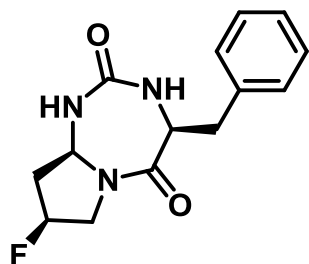
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 0.99 (t,  $J$  = 6.0 Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.61-1.74 (m, 2H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.87-1.97 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.88-2.96 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ,  $\text{NCH}_3$ ), 3.09 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.29 (dd,  $J$  = 4.2, 13.8 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.67-4.52 (m, 1H,  $\text{NCHCO}$ ), 5.47-5.53 (m, 1H,  $\text{NHCHN}$ ), 7.18-7.44 (m, 5H, Ph).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 7.17 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 10-100% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[2\text{M} + \text{Na}]^+ = 629.2$

**cyclo(NMe-Gly-g((L)-NMe-Phe)-CO) (A3, B18)**

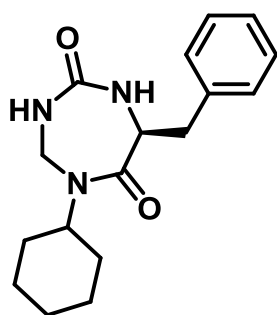
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 3.03 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.05-3.10 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 3.17-3.23 (dd,  $J$  = 3.9, 13.4 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 3.82 (d,  $J$  = 15.8 Hz,  $\text{NCH}_2\text{CO}$ ), 4.47 (d,  $J$  = 15.9,  $\text{NCH}_2\text{CO}$ ), 5.07-5.15 (m, 1H,  $\text{NHCHN}$ ), 7.24-7.43 (m, 5H, Ph).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 4.99 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 10-100% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[2\text{M} + \text{Na}]^+ = 517.1$

**cyclo((L)-Phe-g(4-(S)-cyclohexyl)Pro-CO) (A4, B1)**

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 1.92 (m, 2H,  $\text{CHCH}_2\text{CH}$ ), 2.22 (m, 1H,  $\text{CHPh}$ ), 2.80 (dd,  $J$  = 8.8, 14.6 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 3.07 (t,  $J$  = 10.9 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{CH}$ ), 3.40 (dd,  $J$  = 5.3, 14.5 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.02 (dd,  $J$  = 7.8, 11.5 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{CH}$ ), 4.59 (m, 1H,  $\text{NCHCO}$ ), 4.69 (s, 1H,  $\text{NH}$ ), 5.51 (m, 1H,  $\text{NCHN}$ ), 5.81 (s, 1H,  $\text{NH}$ ), 7.32 (m, 10H, Ph).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 8.08 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 0-100% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[2\text{M} + \text{Na}]^+ = 705.0$ , Crystallographic data, see Table page 332

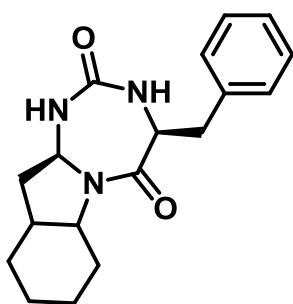
**cyclo((L)-Phe-g(4-(S)-fluoro)Pro-CO) (A5, B1)**

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 2.35 (m, 2H,  $\text{CHCH}_2\text{CHF}$ ), 2.84 (dd,  $J$  = 8.7, 14.6 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 3.42 (dd,  $J$  = 5.4, 14.5 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 3.66 (ddd,  $J$  = 4.0, 14.4, 37.2 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{CH}$ ), 4.10-4.28 (m, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}$ , FCH), 4.62 (m, 1H, NCHCO), 4.78 (s, 1H, NH), 5.65 (t,  $J$  = 6.2 Hz, 1H, NCHN), 5.82 (s, 1H, NH), 7.31 (m, 5H, Ph).  $\text{C}_{18}$ -HPLC  $t_R$  = 5.41 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 0-100% B, 1 ml/min, 10 min).

**cyclo((L)-Phe-gNChg-CO) (A6, B1), (C23, B1)**

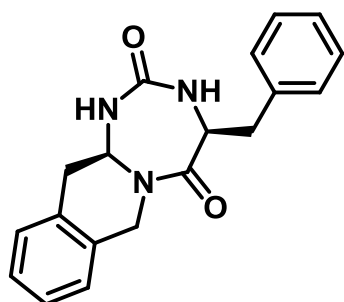
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 1.26-1.51 (m, 6H,  $\text{CH}_2$ ), 1.66-1.94 (m, 5H,  $\text{CH}_2$ ), 2.82 (dd,  $J$  = 9.1, 14.5 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 3.39 (dd,  $J$  = 4.5, 14.6 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.21 (dd,  $J$  = 7.1, 15.9 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 4.44 (m, 1H, NCHCO), 4.66 (m, 1H, NH), 5.02 (dd,  $J$  = 5.1, 15.8 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 6.32 (m, 1H, NH), 7.33 (m, 5H, Ph).  $\text{C}_{18}$ -HPLC  $t_R$  = 6.71 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 10-100% B, 1 ml/min, 10 min).

$\text{MS(ESI)}$ :  $[2\text{M} + \text{Na}]^+ = 625.0$

**cyclo((L)-Phe-g((L)-Oic)-CO) (A7, B1)**

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 1.15-1.45 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 1.54-1.79 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 2.0 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 2.18-2.38 (m, 3H,  $\text{CH}_2$ ), 2.80 (dd,  $J$  = 9.0, 14.5 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 3.40 (dd,  $J$  = 5.1, 14.6 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.13 (m, 1H,  $\text{NCH}(\text{CH})\text{CH}_2$ ), 4.50 (m, 1H, NCHCO), 4.74 (s, 1H, NH), 5.47 (m, 1H, NCHN), 6.46 (s, 1H, NH), 7.29 (m, 5H, Ph).  $\text{C}_{18}$ -HPLC  $t_R$  = 6.83 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 0-100% B, 1 ml/min, 10 min).

$\text{MS(ESI)}$ :  $[2\text{M} + \text{Na}]^+ = 649.0$

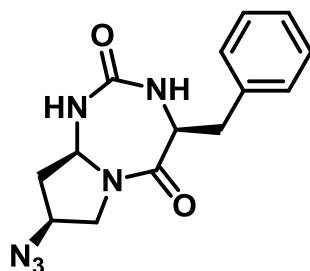
**cyclo((L)-Phe-g((L)-Tic)-CO) (A8, B1)**

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 2.88 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ,  $\text{CHCH}_2\text{CHN}$ ), 3.25 (dd,  $J$  = 5.0, 15.1 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 3.44 (dd,  $J$  = 4.7, 14.6 Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{CHN}$ ), 4.59 (d,  $J$  = 15.6 Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{N}$ ), 4.72 (m, 2H, NH, NCHCO), 4.83 (d,  $J$  = 15.6 Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{N}$ ), 5.38



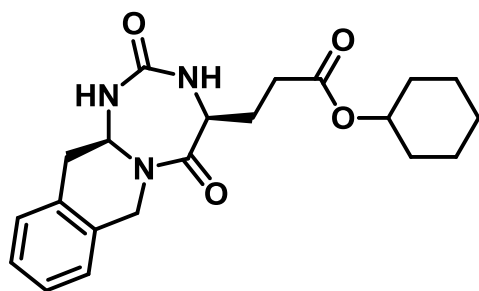
(m, 1H, NH), 5.80 (dd,  $J = 4.9, 10.5$  Hz, 1H, NCHN), 7.31 (m, 10H, Ph). C<sub>18</sub>-HPLC  $t_R = 6.92$  min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 0-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [2M + Na]<sup>+</sup> = 664.9

**cyclo((L)-Phe-g((4-(S)-N<sub>3</sub>)-(L)-Pro)-CO) (A9, B1)**



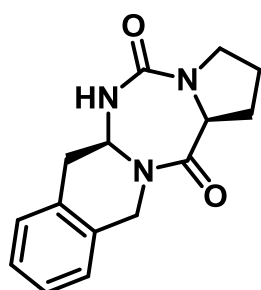
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K)  $\delta = 2.04-2.09$  (m, 2H, CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)N), 2.50-2.59 (m, 2H, CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)N), 2.85 (dd,  $J = 8.9, 14.5$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 3.44 (dd,  $J = 5.3, 14.5$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 3.68 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4.32-4.37 (m, 1H, NHCHN) 4.56-4.61 (m, 1H, NHCHCO), 4.66 (s, 1H, NHCHCO), 5.58 (s, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 7.30-7.41 (m, 5H, Ph). C<sub>18</sub>-HPLC  $t_R = 4.30$  min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 20-80% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [M + H]<sup>+</sup> = 301.0

**cyclo((L)-Glu(OcHx)-g((L)-Tic)-CO) (A8, B6)**

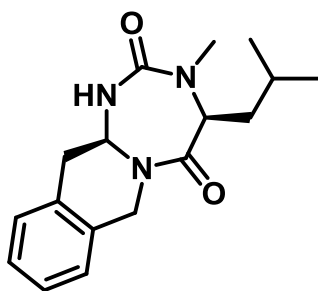


<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K)  $\delta = 1.27-1.78$  (m, 10H, CH<sub>2</sub>), 2.25-2.39 (m, 2H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 2.46-2.70 (m, 2H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 2.96-2.99 (m, 1H, PhCH<sub>2</sub>CH), 3.29 (dd,  $J = 4.9, 15.2$  Hz, 1H, PhCH<sub>2</sub>CH), 4.53 (d,  $J = 15.7$  Hz, 1H, PhCH<sub>2</sub>N), 4.86 (d,  $J = 15.7$  Hz, 1H, PhCH<sub>2</sub>N), 4.96-5.06 (m, 2H, NHCHCO, NHCHCO), 5.82 (dd,  $J = 5.0, 10.4$  Hz, 1H, NHCHN), 7.26-7.35 (m, 4H, Ph). C<sub>18</sub>-HPLC  $t_R = 7.46$  min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 10-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [M + H]<sup>+</sup> = 386.0

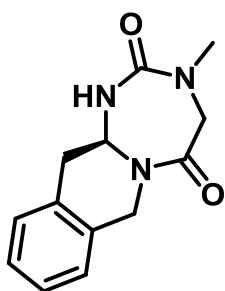
**cyclo((L)-Pro-g((L)-Tic)-CO) (A8, B15)**



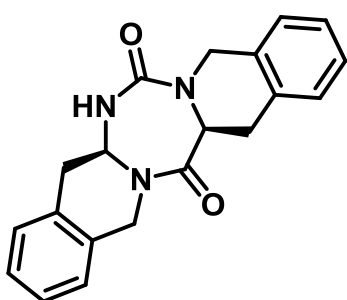
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K)  $\delta = 1.78-2.01$  (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.07-2.18 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.54-2.72 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.94 (dd,  $J = 4.6, 15.1$  Hz, PhCH<sub>2</sub>CH), 3.29 (dd,  $J = 4.9, 15.2$  Hz, PhCH<sub>2</sub>CH), 3.51-3.65 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N), 4.53 (d,  $J = 15.5$  Hz, PhCH<sub>2</sub>N), 4.73-4.90 (m, 2H, PhCH<sub>2</sub>N, NCHCO), 5.83 (dd,  $J = 5.0, 11.5$  Hz, 1H, NHCHN), 7.25-7.34 (m, 4H, Ph). C<sub>18</sub>-HPLC  $t_R = 5.26$  min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 10-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [2M + Na]<sup>+</sup> = 565.3

**cyclo((L)-NMe-Leu-g((L)-Tic)-CO) (A8, B17)**

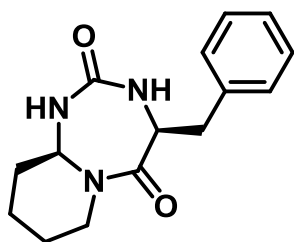
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 0.99 (t,  $J$  = 6.4 Hz, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 1.65-1.77 (m, 2H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.88-1.99 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.90 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 2.96 (dd,  $J$  = 7.3, 14.7 Hz, 1H,  $\text{PhCH}_2\text{CH}$ ), 3.22 (dd,  $J$  = 4.7, 14.7 Hz,  $\text{PhCH}_2\text{CH}$ ), 4.44-4.55 (m, 2H,  $\text{PhCH}_2\text{N}$ ,  $\text{NCHCO}$ ), 4.89 (d,  $J$  = 15.5 Hz,  $\text{PhCH}_2\text{N}$ ), 5.41-5.44 (m, 1H,  $\text{NH}$ ), 5.46-5.41 (m, 1H,  $\text{NHCHN}$ ), 7.25-7.33 (m, 4H, Ph).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 6.82 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 10-100% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[2\text{M} + \text{Na}]^+ = 625.2$

**cyclo(NMe-Gly-g((L)-Tic)-CO) (A8, B18)**

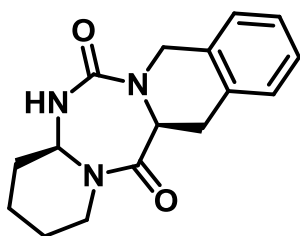
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 2.94 (dd,  $J$  = 5.5, 15.1 Hz, 1H,  $\text{PhCH}_2\text{CH}$ ), 3.07 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.28 (dd,  $J$  = 5.1, 14.7 Hz, 1H,  $\text{PhCH}_2\text{CH}$ ), 3.74 (d,  $J$  = 15.4 Hz,  $\text{NCH}_2\text{CO}$ ), 4.58 (d,  $J$  = 15.4, 1H,  $\text{PhCH}_2\text{N}$ ), 4.66 (d,  $J$  = 15.4, 1H,  $\text{PhCH}_2\text{N}$ ), 4.82 (d,  $J$  = 15.5 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{CO}$ ), 5.66 (dd,  $J$  = 5.3, 11.0 Hz, 1H,  $\text{NHCHN}$ ), 7.26-7.35 (m, 4H, Ph).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[\text{M} - \text{H}]^- = 244.0$

**cyclo((L)-Tic-g((L)-Tic)-CO) (A8, B19)**

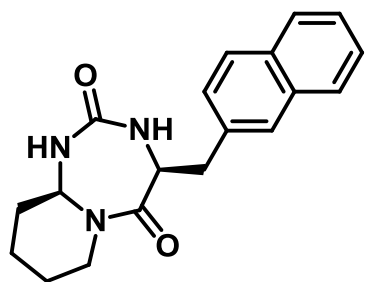
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 2.91 (dd,  $J$  = 5.9, 15.0 Hz, 1H,  $\text{NCH}(\text{CH}_2\text{Ph})\text{CO}$ ), 3.03 (dd,  $J$  = 5.1, 15.4 Hz, 1H,  $\text{NHCH}(\text{CH}_2\text{Ph})\text{N}$ ), 3.21 (dd,  $J$  = 5.1, 15.0 Hz, 1H,  $\text{NHCH}(\text{CH}_2\text{Ph})\text{N}$ ), 3.45 (dd,  $J$  = 10.0, 15.4 Hz, 1H,  $\text{NCH}(\text{CH}_2\text{Ph})\text{CO}$ ), 4.27 (d,  $J$  = 15 Hz,  $\text{NHCON}(\text{CH}_2\text{Ph})\text{CH}$ ), 4.67-4.79 (m, 3H,  $\text{NHCHCO}$ ,  $\text{CHN}(\text{CH}_2\text{Ph})\text{CO}$ ), 5.05 (d,  $J$  = 15.2 Hz, 1H,  $\text{NHCON}(\text{CH}_2\text{Ph})\text{CH}$ ), 5.57 (m, 1H,  $\text{NHCHN}$ ), 5.71 (m, 1H,  $\text{NHCHN}$ ), 7.23-7.33 (m, 8H, Ph).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 6.90 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 20-80% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 334.0$

**cyclo((L)-Phe-g((L)-Pip)-CO) (A10, B1)**

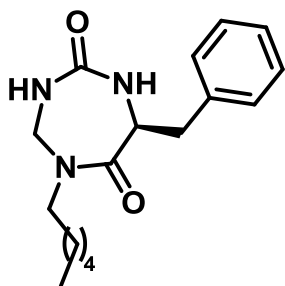
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 1.50-1.73 (m, 3H,  $\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N})$ ), 1.81-1.93 (m, 3H,  $\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N})$ ), 2.84 (dd,  $J$  = 8.3, 14.4 Hz, 1H,  $\text{NCH}(\text{CH}_2\text{Ph})\text{CO}$ ), 3.04-3.14 (m, 1H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.40 (dd,  $J$  = 5.1, 14.3 Hz, 1H,  $\text{NCH}(\text{CH}_2\text{Ph})\text{CO}$ ), 4.10-4.17 (m, 1H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 4.76-4.83 (m, 2H,  $\text{NHCHCO}$ ), 5.61-5.66 (m, 1H,  $\text{NHCHN}$ ), 6.37 (m, 1H,  $\text{NHCHN}$ ), 7.26-7.39 (m, 5H, Ph).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 5.17 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 20-80% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS}(\text{ESI})$ :  $[2\text{M} + \text{Na}]^+ = 569.2$

**cyclo((L)-Tic-g((L)-Pip)-CO) (A10, B19)**

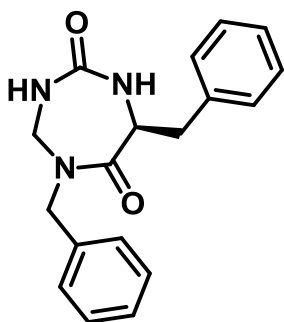
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 1.58-1.96 (m, 6H,  $\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N})$ ), 3.00 (dd,  $J$  = 4.7, 15.3 Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 3.33-3.50 (m, 2H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.87-3.94 (m, 1H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 4.25 (d,  $J$  = 14.9 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ), 4.78 (dd,  $J$  = 4.7, 10.5 Hz, 1H,  $\text{NCHCO}$ ), 5.08 (d,  $J$  = 14.9 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ), 5.17 (m, 1H,  $\text{NHCHN}$ ), 5.48-5.53 (m, 1H,  $\text{NHCHN}$ ), 7.26-7.31 (m, 4H, Ph).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 5.47 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 20-80% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS}(\text{ESI})$ :  $[2\text{M} - \text{H}]^- = 569.2$

**cyclo((L)-3-(2-naphtyl)-Ala-g((L)-Pip)-CO) (A10, B24)**

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 1.49-1.72 (m, 3H,  $\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N})$ ), 1.81-1.92 (m, 3H,  $\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N})$ ), 2.97-3.15 (m, 2H,  $\text{NCH}(\text{CH}_2\text{Napht})\text{CO}$ ,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.56 (dd,  $J$  = 5.4, 14.5 Hz, 1H,  $\text{NCH}(\text{CH}_2\text{Napht})\text{CO}$ ), 4.11-4.18 (m, 1H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 4.82 (s, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 4.87-4.93 (m, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 5.62-5.66 (m, 1H,  $\text{NHCHN}$ ), 6.28 (m, 1H,  $\text{NHCHN}$ ), 7.40-7.58 (m, 3H, Napht), 7.77-7.87 (m, 4H, Napht).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 6.98 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 20-80% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS}(\text{ESI})$ :  $[3\text{M} + \text{Na}]^+ = 991.9$

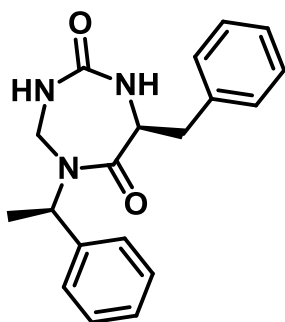
**cyclo((L)-Phe-gN(hexyl)Gly-CO) (C3, B1)**

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 0.9 (m, 5H,  $\text{CH}_2$ ), 1.31 (m, 6H,  $\text{CH}_2$ ), 2.83 (dd,  $J$  = 9.0, 14.5 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 3.39 (dd,  $J$  = 4.5, 14.5 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 3.51 (dt,  $J$  = 1.7, 7.0 Hz, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 4.10 (dd,  $J$  = 7.0, 15.6 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 4.65 (m, 2H, NH,  $\text{NCHCO}$ ), 5.20 (dd,  $J$  = 5.2, 15.5 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 6.15 (s, 1H, NH), 7.32 (m, 5H, Ph).  $\text{C}_{18}$ -HPLC  $t_R$  = 7.64 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 20-80% B, 1 ml/min, 10 min), MS(ESI):  $[2\text{M} + \text{Na}]^+ = 629.0$

**cyclo((L)-Phe-gN(Bn)Gly-CO) (C4, B1)**

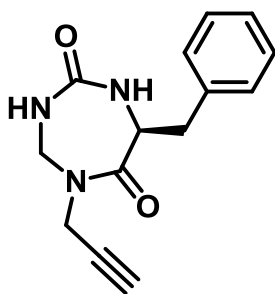
+  $\text{Na}]^+ = 640.9$

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 2.91 (dd,  $J$  = 9.4, 14.5 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 3.45 (dd,  $J$  = 4.6, 14.6 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.07 (dd,  $J$  = 7.2, 15.7 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 4.64 (m, 2H, NH,  $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ), 4.72 (m, 1H,  $\text{NCHCO}$ ), 4.86 (d,  $J$  = 14.8 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ), 5.12 (dd,  $J$  = 5.5, 15.7 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 5.50 (m, 1H, NH), 7.34 (m, 10H, Ph).  $\text{C}_{18}$ -HPLC  $t_R$  = 6.48 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 20-80% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI)  $[2\text{M}$

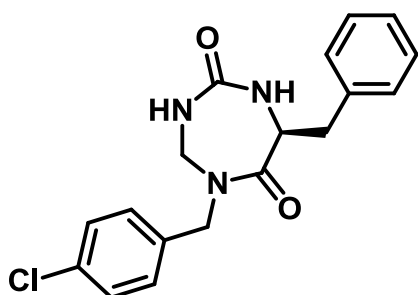
**cyclo((L)-Phe-gN( $\alpha$ -Me-Bn)Gly-CO) (C5, B1)**

MS(ESI):  $[2\text{M} + \text{Na}]^+ = 668.9$

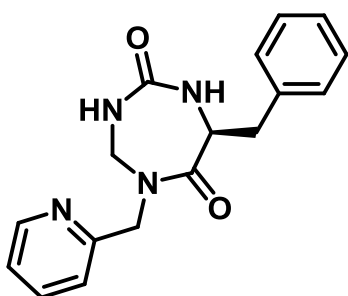
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 1.64 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 3H,  $\text{NCHCH}_3$ ), 2.90 (dd,  $J$  = 9.4, 14.6 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 3.46 (dd,  $J$  = 4.5, 14.6 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 3.96 (dd,  $J$  = 7.2, 16.0 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 4.64 (m, 1H, NH), 4.69 (m, 1H,  $\text{NCHCO}$ ), 4.85 (dd,  $J$  = 5.1, 16.0 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 6.01 (m, 2H,  $\text{NCHCH}_3$ , NH), 7.33 (m, 10H, Ph).  $\text{C}_{18}$ -HPLC  $t_R$  = 6.99 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 20-80% B, 1 ml/min, 10 min).

**cyclo((L)-Phe-gN(propyne)Gly-CO) (C7, B1)**

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 2.33 (t,  $J$  = 2.5 Hz, 1H,  $\text{CH}\equiv\text{C}$ ), 2.85 (dd,  $J$  = 9.0, 14.5 Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 3.40 (dd,  $J$  = 4.9, 14.5 Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 4.29 (dd,  $J$  = 2.5, 15.1 Hz, 1H,  $\text{CCH}_2\text{N}$ ), 4.42-4.52 (m, 2H,  $\text{CCH}_2\text{N}$ ,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 4.66-4.73 (m, 2H,  $\text{NHCHCO}$ ), 5.22 (dd,  $J$  = 4.2, 15.7 Hz, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 5.99 (s, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 7.28-7.40 (m, 5H, Ph).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 4.66 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 20-80% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[2\text{M} + \text{Na}]^+ = 537.1$

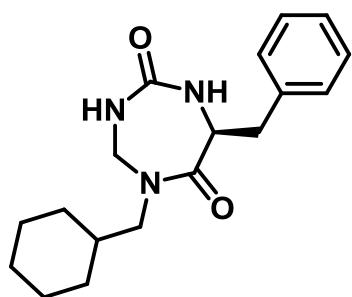
**cyclo((L)-Phe-gN((4-Cl)-Bn)Gly-CO) (C9, B1)**

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 2.91 (dd,  $J$  = 9.5, 14.4 Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 3.46 (dd,  $J$  = 4.5, 14.6 Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 4.07 (dd,  $J$  = 6.8, 15.5 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 4.60-4.84 (m, 3H,  $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 5.15 (dd,  $J$  = 5.7, 15.9 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 5.27 (m, 1H, NH), 7.22-7.45 (m, 9H, Ph).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 7.47 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 20-80% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[\text{M} - \text{H}]^- = 341.9$

**cyclo((L)-Phe-gN(pyridin-2-ylmethyl)Gly-CO) (C10, B1)**

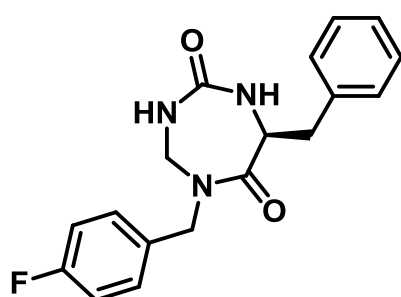
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 2.88 (dd,  $J$  = 9.4, 14.5 Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 3.43 (dd,  $J$  = 4.7, 14.5 Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 4.51 (dd,  $J$  = 7.2, 15.7 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 4.58 (m, 1H, NH), 4.74 (m, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Pyridine}$ ), 4.84 (s, 2H,  $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ), 5.29 (dd,  $J$  = 5.8, 15.7 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 5.42 (m, 1H, NH), 7.22-7.42 (m, 7H, Ph, Pyridine), 7.72 (m, 1H, Pyridine), 8.57 (d,  $J$  = 4.5 Hz, Pyridine).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  =

4.25 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 10-100% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 311.1$

**cyclo((L)-Phe-gN(cyclohexylmethyl)Gly-CO) (C12, B1)**

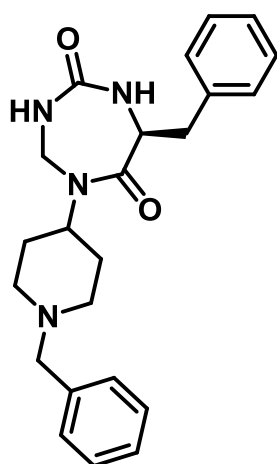
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 0.83-1.80 (m, 11H, cyclohexyle), 2.85 (dd,  $J$  = 9.5, 14.9 Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 3.29-3.45 (m, 3H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ,  $\text{NCH}_2\text{cyclohexyle}$ ), 4.07 (dd,  $J$  = 7.1, 15.5 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 4.65-4.71 (m, 2H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ , NH), 5.21 (dd,  $J$  = 5.1, 15.3 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 6.42 (s, 1H, NH), 7.27-7.40 (m, 5H, Ph).

$\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 7.41 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 20-80% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 316.1$

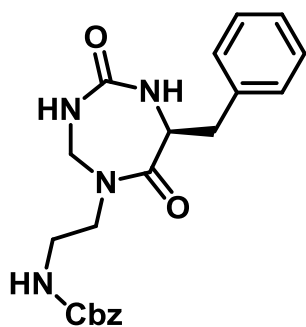
**cyclo((L)-Phe-gN((4-F)-Bn)Gly-CO) (C13, B1)**

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 2.91 (dd,  $J$  = 9.5, 14.4 Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 3.46 (dd,  $J$  = 4.5, 14.6 Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 4.08 (dd,  $J$  = 7.0, 15.7 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 4.63 (d,  $J$  = 15.1 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ), 4.67 (s, 1H, NH), 4.73 (m, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 4.82 (d,  $J$  = 15.1 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ), 5.14 (dd,  $J$  = 5.3, 15.7 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 5.62 (m, 1H, NH), 7.04-7.10 (m, 2H, CHF), 7.27-

7.42 (m, 7H, Ph).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 6.74 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 20-80% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[\text{M} - \text{H}]^- = 325.9$

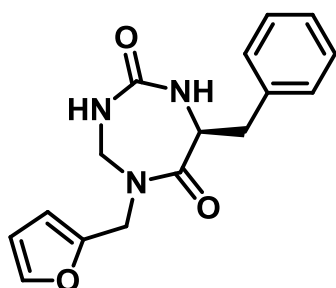
**cyclo((L)-Phe-gN(4-amino-benzylpiperin-4-yl)Gly-CO) (C14, B1)**

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 1.58-1.74 (m, 2H,  $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 1.85 (m, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 2.15 (m, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 2.83 (dd,  $J$  = 8.9, 14.4 Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 3.00 (m, 1H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.38 (dd,  $J$  = 4.5, 14.4 Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 3.52 (d,  $J$  = 12.9 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ), 3.58 (d,  $J$  = 12.9 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ), 4.28 (dd,  $J$  = 7.2, 15.8 Hz, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 4.51 (m, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 4.66 (m, 1H, NH), 5.05 (dd,  $J$  = 5.5, 15.8 Hz, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 5.88 (s, 1H, NH), 7.27-7.40 (m, 10H, Ph).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 4.45 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 20-80% B, 1 ml/min, 10 min)  $\text{MS(ESI)}$ :  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 393.2$

**cyclo((L)-Phe-gN(N-Z-ethylamino)Gly-CO) (C15, B1)**

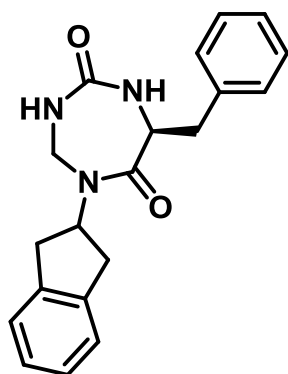
min). MS(ESI):  $[2M - H]^- = 790.9$

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta = 2.82$  (dd,  $J = 9.6, 14.5$  Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 3.33-3.46 (m, 2H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 3.68 (m, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 4.10 (m, 1H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 4.56-4.76 (m, 3H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ , NH), 5.10-5.20 (m, 3H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 5.61 (s, 1H, NH), 7.23-7.43 (m, 10H, Ph).  $\text{C}_{18}$ -HPLC  $t_R = 6.53$  min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 20-80% B, 1 ml/min, 10

**cyclo((L)-Phe-gN(furfuryl)Gly-CO) (C17, B1)**

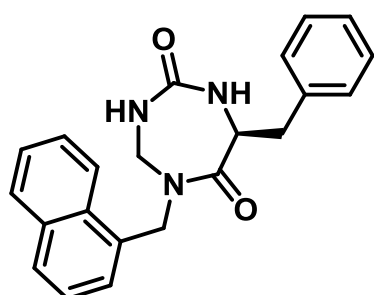
$\text{CH}_3\text{CN}$ , 20-80% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI):  $[M + H]^+ = 299.9$

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta = 2.88$  (dd,  $J = 9.3, 14.5$  Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 3.43 (dd,  $J = 4.6, 14.5$  Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 4.26 (dd,  $J = 7.3, 15.8$  Hz, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 4.61 (s, 1H, NH), 4.67-4.73 (m, 3H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ,  $\text{NCH}_2\text{furan}$ ), 5.18 (dd,  $J = 5.8, 15.8$  Hz, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 5.55 (s, 1H, NH), 6.37 (m, 1H, NH), 7.29-7.42 (m, 8H, Ph, furane).  $\text{C}_{18}$ -HPLC  $t_R = 5.54$  min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in

**cyclo((L)-Phe-gN(2,3-dihydro-1H-inden-2-yl)Gly-CO) (C18, B1)**

$\text{CH}_3\text{CN}$ , 20-80% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI):  $[M + H]^+ = 336.1$ .

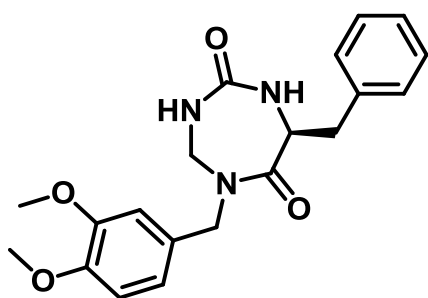
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta = 2.81$ -2.91 (m, 2H,  $\text{NCHCH}_2\text{Ph}$ ), 3.06 (dd,  $J = 5.1, 16.7$  Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 3.31-3.46 (m, 3H,  $\text{NCHCH}_2\text{Ph}$ ,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 4.08 (dd,  $J = 7.3, 16.1$  Hz, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 4.68 (m, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 4.79 (s, 1H, NH), 5.03 (dd,  $J = 5.2, 15.8$  Hz, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 5.51 (m, 1H,  $\text{NCH}(\text{CH}_2)_2$ ), 5.86 (m, 1H, NH), 7.21-7.40 (m, 9H, Ph).  $\text{C}_{18}$ -HPLC  $t_R = 7.20$  min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in

**cyclo((L)-Phe-gN(naphthalen-1-ylmethyl)Gly-CO) (C20, B1)**

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta = 2.95$  (dd,  $J = 9.1, 14.6$  Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 3.52 (dd,  $J = 4.9, 14.6$  Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 4.05 (dd,  $J = 7.3, 15.7$  Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 4.66 (m, 1H, NH), 4.74 (m,

1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.93 (d, J = 14.7 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 4.96-5.04 (m, 1H, NCH<sub>2</sub>naphtyl), 5.36 (m, 1H, NCH<sub>2</sub>naphtyl) 5.50 (d, J = 14.7 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 7.29-7.50 (m, 7H, Ph), 7.55-7.58 (m, 2H, Ph), 7.87-7.93 (m, 1H, Ph), 8.04-8.07 (m, 1H, Ph). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 8.00 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 20-80% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [M + H]<sup>+</sup> = 359.9

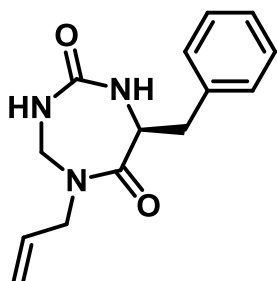
**cyclo((L)-Phe-gN(3,4)(MeO)<sub>2</sub>Bn)Gly-CO) (C21, B1)**



<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) δ = 2.91 (dd, J = 9.2, 14.5 Hz, 1H, NCH(CH<sub>2</sub>Ph)CO), 3.47 (dd, J = 4.9, 14.5 Hz, 1H, NCH(CH<sub>2</sub>Ph)CO), 3.89 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.91 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.10 (dd, J = 7.2, 15.7 Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 4.61-4.77 (m, 4H, NHCHCO, PhCH<sub>2</sub>N), 5.12 (dd, J = 5.5, 15.6 Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 5.32 (s, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 6.82-6.85 (m,

3H, (CH<sub>3</sub>O)<sub>2</sub>Ph), 7.31-7.39 (m, 5H, Ph). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 5.87 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 20-80% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [M + H]<sup>+</sup> = 370.1

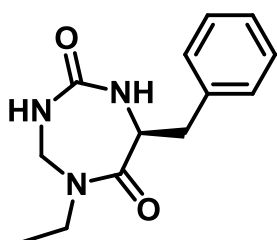
**cyclo((L)-Phe-gN(allyl)Gly-CO) (C22, B1)**



<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) δ = 2.87 (dd, J = 8.9, 14.3 Hz, 5 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>Ph), 3.42 (dd, J = 4.7, 14.6 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>Ph), 4.08-4.16 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>N, CH<sub>2</sub>=CHCH<sub>2</sub>N), 4.25 (dd, J = 6.1, 15.3 Hz, CH<sub>2</sub>=CHCH<sub>2</sub>N), 4.70 (m, 2H, NH, CHCH<sub>2</sub>Ph), 5.16 (dd, J = 5.2, 15.5 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 5.25-4.33 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=CHCH<sub>2</sub>N), 5.78-5.91 (m, 1H, CH<sub>2</sub>=CHCH<sub>2</sub>N), 6.07 (m, 1H, NH), 7.28-7.41 (m, 5H, Ph). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 4.70 min (A :

0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 20-80% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [M + H]<sup>+</sup> = 393.2

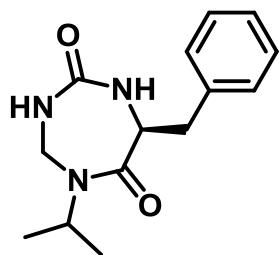
**cyclo((L)-Phe-gN(Et)Gly-CO) (C24, B1)**



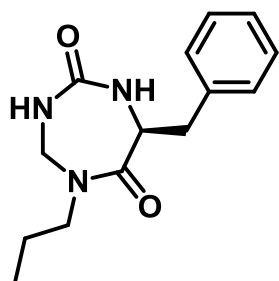
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) δ = 1.29 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.85 (dd, J = 9.2, 14.4 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>Ph), 3.41 (dd, J = 4.7, 14.4 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>Ph), 3.55-3.68 (m, 2H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.14 (dd, J = 6.9, 15.5 Hz, NCH<sub>2</sub>N), 4.59-4.70 (m, 2H, NH, CHCH<sub>2</sub>Ph), 5.22 (dd, J = 5.3, 15.6 Hz, NCH<sub>2</sub>N), 5.79 (m, 1H, NH), 7.29-7.41 (m, 5H, Ph). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 4.04 min (A :

0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 20-80% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [2M + H]<sup>+</sup> = 495.2

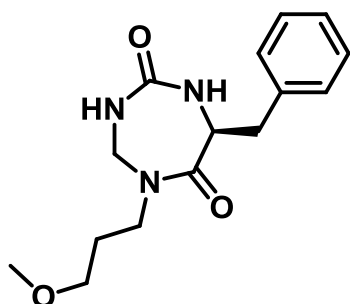


**cyclo((L)-Phe-gN(iPr)Gly-CO) (C27, B1)**

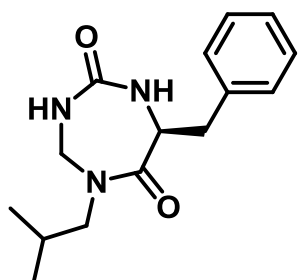
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 1.18 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 3H,  $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ ), 1.26 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 3H,  $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ ), 2.85 (dd,  $J$  = 9.2, 14.5 Hz, 1H,  $\text{NCH}(\text{CH}_2\text{Ph})\text{CO}$ ), 3.41 (dd,  $J$  = 4.6, 14.5 Hz, 1H,  $\text{NCH}(\text{CH}_2\text{Ph})\text{CO}$ ), 4.22 (dd,  $J$  = 7.2, 15.9 Hz, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 4.62-4.70 (m, 2H,  $\text{NHCHCO}$ ), 4.86 (m, 1H,  $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ ), 5.05 (dd,  $J$  = 5.1, 15.9 Hz, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 6.04 (s, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 7.28-7.40 (m, 5H, Ph).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 4.65 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 20-80% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 262.1$

**cyclo((L)-Phe-gN(Pr)Gly-CO) (C28, B1)**

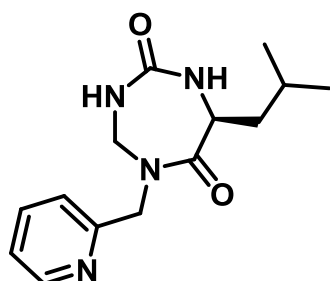
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 0.97 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.29-1.34 (m, 2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 2.85 (dd,  $J$  = 9.3, 14.5 Hz, 1H,  $\text{NCH}(\text{CH}_2\text{Ph})\text{CO}$ ), 3.38-3.57 (m, 3H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ,  $\text{NCH}(\text{CH}_2\text{Ph})\text{CO}$ ), 4.12 (dd,  $J$  = 7.1, 15.7 Hz, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 4.58 (s, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 4.65-4.71 (m, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 5.23 (dd,  $J$  = 5.3, 15.6 Hz, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 5.72 (s, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 7.29-7.41 (m, 5H, Ph).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 4.83 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 20-80% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[\text{2M} + \text{Na}]^+ = 545.1$

**cyclo((L)-Phe-gN(3-methoxypropyl)Gly-CO) (C29, B1)**

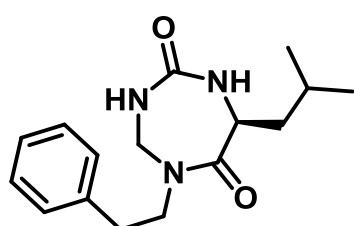
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 1.86-1.94 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.85 (dd,  $J$  = 9.2, 14.5 Hz, 1H,  $\text{NCH}(\text{CH}_2\text{Ph})\text{CO}$ ), 3.36-3.51 (m, 5H,  $\text{CH}_3\text{OCH}_2$ ), 3.61-3.70 (m, 3H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ,  $\text{NCH}(\text{CH}_2\text{Ph})\text{CO}$ ), 4.18 (dd,  $J$  = 7.2, 15.7 Hz, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 4.60 (s, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 4.64-4.70 (m, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 5.22 (dd,  $J$  = 5.4, 15.5 Hz, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 5.73 (s, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 7.29-7.41 (m, 5H, Ph).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 4.30 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 20-80% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[\text{2M} + \text{Na}]^+ = 605.2$

**cyclo((L)-Phe-gN(iBu)Gly-CO) (C30, B1)**

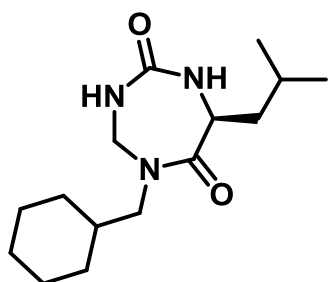
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K)  $\delta$  = 0.95 (d, J = 4.3 Hz, 1H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH), 0.98 (d, J = 4.2 Hz, 1H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH), 1.89-2.00 (m, 1H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH), 2.85 (dd, J = 9.2, 14.5 Hz, 1H, NCH(CH<sub>2</sub>Ph)CO), 3.34-3.44 (m, 4H, NCH(CH<sub>2</sub>Ph)CO, CHCH<sub>2</sub>N), 4.09 (dd, J = 7.2, 15.6 Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 4.64-4.72 (m, 2H, NHCHCO), 5.23 (dd, J = 5.2, 15.5 Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 6.14 (s, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 7.29-7.40 (m, 5H, Ph). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 5.61 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 20-80% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [M + H]<sup>+</sup> = 276.1

**cyclo((L)-Leu-gN(phenethyl)Gly-CO) (C10, B11)**

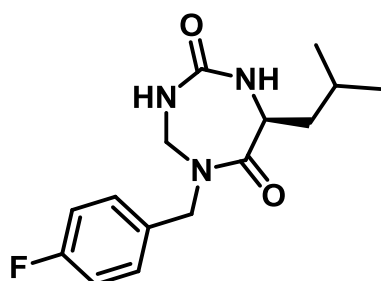
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K)  $\delta$  = 0.99 (d, J = 5.7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.01 (d, J = 5.7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.76-1.96 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.44-4.57 (m, 3H, NHCHCO, NHCH<sub>2</sub>N, NHCHCO), 4.81 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>Cpyridinium), 5.31 (dd, J = 5.8, 15.5 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 5.41 (m, 1H, NH), 7.23-7.28 (m, 1H, CHCHC(CH<sub>2</sub>)N), 7.38 (d, J = 7.8 Hz, 1H, CHCHC(CH<sub>2</sub>)N), 7.71 (td, J = 1.8, 7.7 Hz, 1H, CHCHCHC(CH<sub>2</sub>)N), 8.56 (d, J = 5.0 Hz, 1H, CHCHN). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 3.73 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 20-80% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [M + H]<sup>+</sup> = 277.1

**cyclo((L)-Leu-gN(phenethyl)Gly-CO) (C11, B11)**

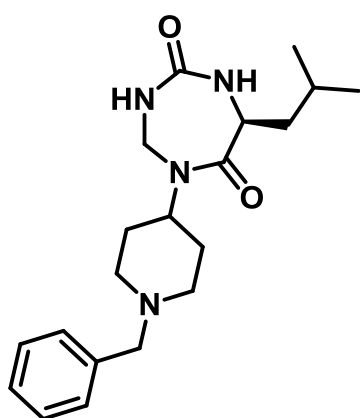
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K)  $\delta$  = 0.99 (d, J = 5.3 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.01 (d, J = 5.3 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.72-1.94 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.94 (t, J = 7.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 3.76-3.89 (m, 3H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph, NHCH<sub>2</sub>N), 4.35 (m, 1H, NHCHCO), 4.51 (s, 1H, NH), 5.05 (dd, J = 5.7, 15.5 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 5.25 (m, 1H, NH), 7.22 (m, 5H, Ph). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 6.40 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 20-80% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [M + H]<sup>+</sup> = 290.1

**cyclo((L)-Leu-gN(cyclohexylmethyl)Gly-CO) (C12, B11)**

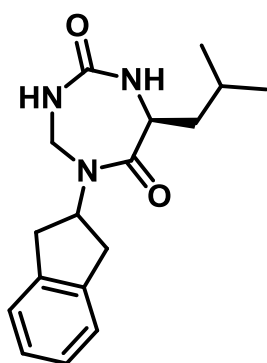
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K)  $\delta$  = 0.98-1.02 (m, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH), 1.14-1.41 (m, 10H, Hcyclohexyl), 1.85-1.94 (m, 1H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH), 3.30 (dd, J = 7.5, 13.8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.42 (dd, J = 6.9, 13.8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.68 (m, 1H, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CHN), 4.11 (dd, J = 7.2, 15.5 Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 4.39-4.45 (m, 1H, NHCHCO), 4.58 (s, 1H, NHCHCO), 5.26 (dd, J = 5.2, 15.5 Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 5.81 (s, 1H, NHCH<sub>2</sub>N). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 7.05 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 20-80% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [M + H]<sup>+</sup> = 282.1

**cyclo((L)-Leu-gN((4-F)-Bn)Gly-CO) (C13, B11)**

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K)  $\delta$  = 1.01 (d, J = 5.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.03 (d, J = 5.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.75-1.99 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.10 (dd, J = 7.2, 15.8 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 4.49 (m, 1H, NHCHCO), 4.60 (d, J = 14.9 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>Ph), 4.71 (s, 1H, NH), 4.81 (d, J = 14.9 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>Ph), 5.19 (dd, J = 5.3, 15.7 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 5.59 (m, 1H, NH), 7.07 (m, 1H, Ph), 7.26-7.30 (m, 3H, Ph). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 6.30 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 20-80% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [M + H]<sup>+</sup> = 294.0

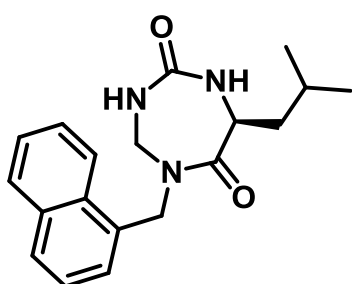
**cyclo((L)-Leu-gN(4-amino-benzylpiperin-4-yl)Gly-CO) (C14, B11)**

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K)  $\delta$  = 0.97 (d, J = 4.5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.00 (d, J = 4.5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.41-1.51 (m, 2H, NCH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), 1.62-1.69 (m, 2H, NCH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), 1.72-1.91 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.08-2.16 (m, 2H, N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), 2.95-3.01 (m, 2H, N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), 3.50 (d, J = 13.1 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>Ph), 3.56 (d, J = 13.1 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>Ph), 4.29 (dd, J = 7.3, 15.8 Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 4.37-4.62 (m, 2H, NCH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, NHCHCO), 4.72 (s, 1H, NHCHCO), 5.08 (dd, J = 5.5, 15.8 Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 6.11 (s, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 7.26-7.38 (m, 5H, Ph). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 3.87 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 20-80% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [M + H]<sup>+</sup> = 359.3

**cyclo((L)-Leu-gN(2,3-dihydro-1H-inden-2-yl)Gly-CO) (C18, B11)**

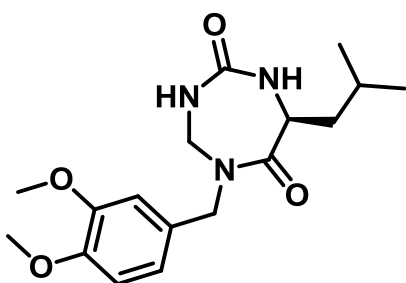
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 0.99 (d,  $J$  = 4.8 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.02 (d,  $J$  = 4.8 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ) 1.73-1.96 (m, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.86 (dd,  $J$  = 4.9, 16.9 Hz, 1H,  $\text{NCH}(\text{CH}_2)_2$ ), 3.05 (dd,  $J$  = 4.9, 16.9 Hz, 1H,  $\text{NCH}(\text{CH}_2)_2$ ), 3.37 (dd,  $J$  = 8.2, 16.8 Hz, 2H,  $\text{NCH}(\text{CH}_2)_2$ ), 4.10 (dd,  $J$  = 7.2, 16.0 Hz, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 4.42 (m, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 4.69 (s, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 5.08 (dd,  $J$  = 5.3, 15.9 Hz, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 5.45-5.61 (m, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ,  $\text{NCH}(\text{CH}_2)_2$ ), 7.21-7.29 (m, 4H, Ph).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 6.80 min

(A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 20-80% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 302.1$

**cyclo((L)-Leu-gN(naphthalen-1-ylmethyl)Gly-CO) (C20, B11)**

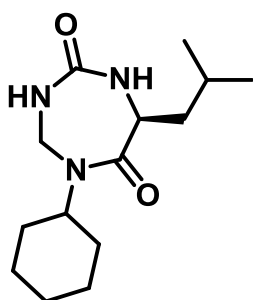
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 1.01 (d,  $J$  = 3.3 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.04 (d,  $J$  = 3.3 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ) 1.71-1.92 (m, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 4.07 (dd,  $J$  = 7.0, 15.6 Hz, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 4.47 (m, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 4.55 (s, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 4.92 (d,  $J$  = 14.9 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 5.02 (dd,  $J$  = 5.4, 15.6 Hz, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 5.20 (m, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 5.47 (d,  $J$  = 14.9 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 7.42-7.61 (m, 3H, Ph), 7.88-7.94 (m, 1H, Ph), 8.04-8.08 (m, 1H, Ph).

$\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 7.11 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 20-80% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 326.3$

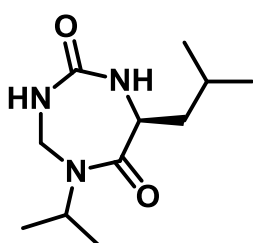
**cyclo((L)-Leu-gN(3,4)(MeO)<sub>2</sub>Bn)Gly-CO) (C21, B11)**

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 1.01 (d,  $J$  = 5.0 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.03 (d,  $J$  = 5.0 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ) 1.78-2.00 (m, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 3.89 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.91 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.12 (dd,  $J$  = 7.2, 15.6 Hz, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 4.47 (m, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 4.58 (s,  $\text{NHCHCO}$ ), 4.62 (d,  $J$  = 14.7 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ), 4.73 (d,  $J$  = 14.7 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ), 5.14 (dd,  $J$  = 5.4,

15.6 Hz,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 5.35 (m, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 6.82-6.85 (m, 3H, Ph).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 5.35 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 20-80% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 335.6$

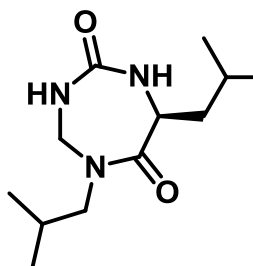
**cyclo((L)-Leu-gN(cHx)Gly-CO) (C23, B11)**

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 0,97-1.01 (m, 6H,  $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2$ ), 1.26-1.52 (m, 7H, Hcyclohexyl,  $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2$ ), 1.68-1.93 (m, 6H, Hcyclohexyl,  $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2$ ), 4.26 (dd,  $J$  = 7.1, 15.9 Hz, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 4.36-4.47 (m, 2H,  $\text{NHCHCO}$ ,  $(\text{CH}_2)_2\text{CHN}$ ), 5.04-5.12 (m, 2H,  $\text{NHCHCO}$ ,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 6.83 (s, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 6.00 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 20-80% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 268.8$

**cyclo((L)-Leu-gN(iPr)Gly-CO) (C27, B11)**

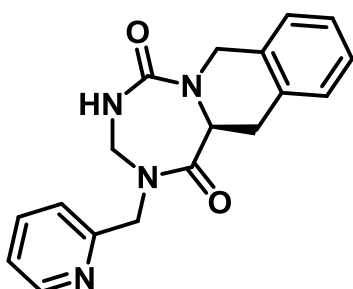
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 0,97-1.01 (m, 6H,  $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2$ ), 1.17 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 1H,  $(\text{CH}_3)_2\text{CHN}$ ), 1.23 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 1H,  $(\text{CH}_3)_2\text{CHN}$ ), 1.26-1.30 (m, 1H,  $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2$ ), 1.74-1.88 (m, 2H,  $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2$ ), 4.23 (dd,  $J$  = 7.2, 15.9 Hz, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 4.36-4.27 (m, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 4.74 (s, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 4.79-4.92 (m, 1H,  $(\text{CH}_3)_2\text{CHN}$ ), 5.07

(dd,  $J$  = 5.2, 15.9 Hz, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 6.51 (m, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[2\text{M} + \text{Na}]^+ = 477.1$

**cyclo((L)-Leu-gN(iBu)Gly-CO) (C30, B11)**

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 0.94-1.02 (m, 12H,  $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ ), 1.85-1.97 (m, 2H,  $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ ), 3.27-3.42 (m, 2H,  $\text{CHCH}_2\text{CH}$ ), 3.68 (m, 1H,  $(\text{CH}_3)_2\text{CHN}$ ), 4.12 (dd,  $J$  = 7.2, 15.6 Hz, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 4.40-4.46 (m, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 4.60 (s, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 5.27 (dd,  $J$  = 5.2, 15.5 Hz, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 5.87 (s, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 5.03 min (A : 0.1% TFA

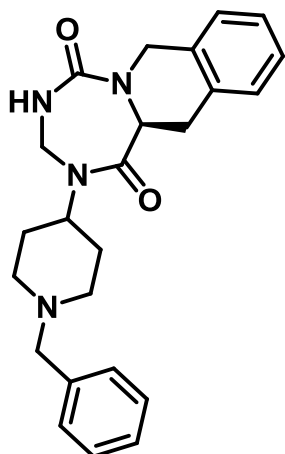
in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 20-80% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[2\text{M} + \text{Na}]^+ = 477.0$

**cyclo((L)-Tic-gN(pyridin-2-ylmethyl)Gly-CO) (C10, B19)**

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta$  = 3.14 (dd,  $J$  = 4.2, 15.7 Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 3.42 (dd,  $J$  = 11.2, 15.6 Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 4.53 (d,  $J$  = 15.7 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ), 4.60 (dd,  $J$  = 4.3, 11.2 Hz, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 4.69-4.79 (m, 3H,  $\text{NCH}_2\text{Cpyridium}$ ,  $\text{NCHCO}$ ), 4.91 (d,  $J$  = 14.8 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ), 5.02 (dd,  $J$  = 6.0, 15.2 Hz, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ),

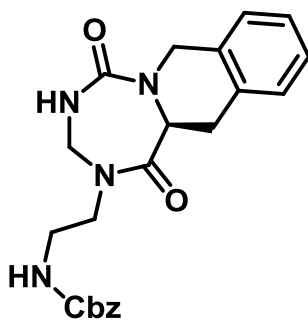
5.49 (m, 1H, NH), 7.20-7.36 (m, 5H, Ph), 7.41 (d, J = 8.0 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N), 7.73 (td, J = 1.9, 7.6 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>CHC(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N), 8.58 (d, J = 5.0 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>N). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 2.93 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 20-80% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [2M + H]<sup>+</sup> = 645.1

**cyclo((L)-Tic-gN(4-amino-benzylpiperin-4-yl)Gly-CO) (C14, B19)**



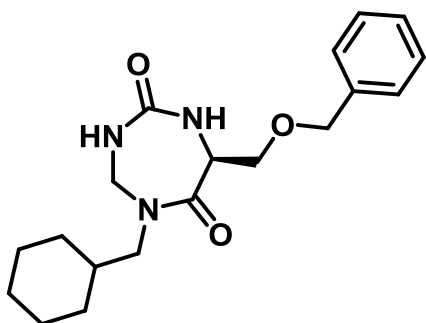
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) δ = 1.58-1.81 (m, 4H, CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N), 2.04-2.32 (m, 4H, CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N), 2.90-3.15 (m, 2H, CHCH<sub>2</sub>Ph), 3.68-3.72 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>Ph), 4.39-4.70 (m, 3H, NCH<sub>2</sub>N, NHCH<sub>2</sub>CO, NCH<sub>2</sub>Ph), 4.79-5.02 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>N, NCH<sub>2</sub>Ph), 5.48 (m, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 7.23-7.56 (m, 9H, Ph). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 4.76 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 20-80% B, 1 ml/min, 10 min).

**cyclo((L)-Tic-gN(N-Z-ethylamino)Gly-CO) (C15, B19)**



<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) δ = 3.07 (dd, J = 4.2, 15.8 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>C), 3.33 (dd, J = 11.2, 15.7 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>C), 3.41-3.50 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 3.63-3.77 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 4.36-4.56 (m, 3H, NCH<sub>2</sub>C, NHCH<sub>2</sub>N, NCHCO), 4.71-4.83 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>N, NCH<sub>2</sub>C), 5.15 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 5.92 (m, 1H, NHCON), 7.15-7.41 (m, 9H, Ph). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 6.84 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 20-80% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [2M + Na]<sup>+</sup> = 838.9

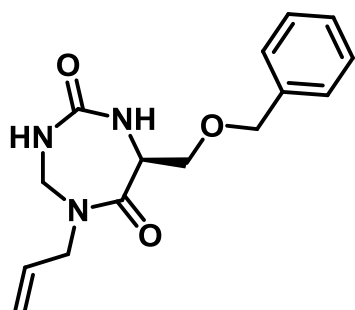
**cyclo((L)-Ser(OBn)-gN(cyclohexylmethyl)Gly-CO) (C12, B12)**



<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) δ = 0.86-1.77 (m, 11H, CH<sub>2</sub>), 3.25 (dd, J = 7.6, 13.8 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>CH), 3.40 (dd, J = 7.0, 13.8 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>CH), 3.74 (t, J = 9.7 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>O), 3.94 (dd, J = 3.9, 10.3 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>O), 4.07 (dd, J = 6.9, 15.6 Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 4.56-4.71 (m, 3H, OCH<sub>2</sub>Ph, NHCHCO), 5.17-5.24 (m, 2H, NHCHCO, NHCH<sub>2</sub>N),

6.05 (m, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 7.34-7.40 (m, 5H, Ph). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 7.84 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 20-80% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [M + H]<sup>+</sup> = 346.0

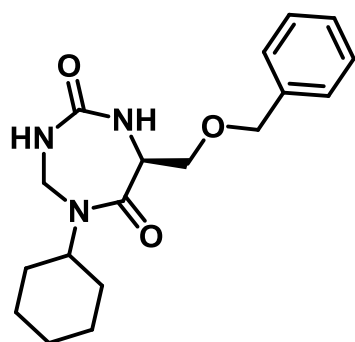
**cyclo((L)-Ser(OBn)-gN(allyl)Gly-CO) (C22, B12)**



<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) δ = 3.73 (dd, J = 9.7, 19.4 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>O), 3.95 (dd, J = 4.0, 10.1 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>O), 4.03-4.24 (m, 3H, NCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>, NHCH<sub>2</sub>N), 4.61 (d, J = 2.8 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 4.66-4.72 (m, 1H, CHCH<sub>2</sub>O), 5.13 (dd, J = 5.4, 15.6 Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 5.23-5.30 (m, 3H, NCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>, NHCHCO), 5.75-5.88 (m, 1H, NCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 5.93 (s, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 7.34-7.43 (m,

5H, Ph). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 5.19 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 20-80% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [M + H]<sup>+</sup> = 289.9

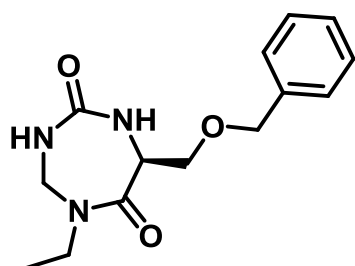
**cyclo((L)-Ser(OBn)-gN(cHx)Gly-CO) (C23, B12)**



<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) δ = 1.14-1.70 (m, 10H, CH<sub>2</sub> cyclohexyl), 3.72 (dd, J = 9.5, 19.4 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>O), 3.94 (dd, J = 4.1, 10.1 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>O), 4.22 (dd, J = 7.0, 15.8 Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 4.33-4.43 (m, 1H, NCH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), 4.60 (d, J = 1.5 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 4.64-4.70 (m, 1H, CHCH<sub>2</sub>O), 5.01 (dd, J = 5.3, 15.7 Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 5.24 (s, 1H, NHCHCO), 6.66 (s, 1H, NHCH<sub>2</sub>N),

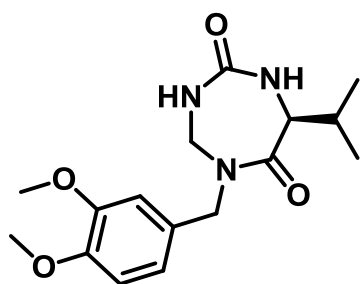
7.33-7.42 (m, 5H, Ph). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 6.89 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 20-80% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [M + H]<sup>+</sup> = 332.0

**cyclo((L)-Ser(OBn)-gN(Et)Gly-CO) (C24, B12)**



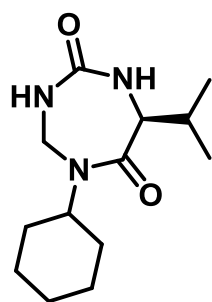
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) δ = 1.29 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.68-3.77 (m, 3H, CHCH<sub>2</sub>O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.94 (dd, J = 4.0, 10.2 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>O), 4.14 (dd, J = 7.0, 15.7 Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 4.60-4.69 (m, 3H, OCH<sub>2</sub>Ph, CHCH<sub>2</sub>O), 5.20 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>N, NHCHCO), 5.60 (s, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 7.34-7.43 (m, 5H, Ph). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 4.59 min (A :

0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 20-80% B, 1 ml/min, 10 min).

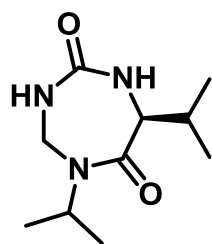
**cyclo((L)-Val-gN(3,4)(MeO)<sub>2</sub>Bn)Gly-CO) (C21, B13)**

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) δ = 1.00-1.04 (m, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH), 1.91-2.00 (m, 1H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH), 3.89 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.91 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.12 (dd, J = 7.2, 15.7 Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 4.44-4.50 (m, 1H, NHCHCO), 4.58 (s, 1H, NHCHCO), 4.62 (d, J = 14.8 Hz, 1H, PhCH<sub>2</sub>N), 4.72 (d, J = 14.8 Hz, 1H, PhCH<sub>2</sub>N), 5.15 (dd, J = 5.5, 15.5 Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 5.28 (m, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 6.81-6.85 (m, 3H,

(CH<sub>3</sub>O)<sub>2</sub>Ph). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 5.34 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 20-80% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [2M + Na]<sup>+</sup> = 665.2

**cyclo((L)-Val-gN(cHx)Gly-CO) (C13, B23)**

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) δ = 1.06-1.11 (m, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCH), 1.26-1.48 (m, 10H, Hcyclohexyl), 2.25-2.34 (m, 1H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCH), 3.95-4.00 (m, 1H, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CHN), 4.42-4.45 (m, 1H, NHCHCO), 4.85-4.96 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>N, NHCHCO), 5.56-5.62 (m, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 6.17 (s, 1H, NHCH<sub>2</sub>N). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 4.92 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 20-80% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [2M + Na]<sup>+</sup> = 259.8

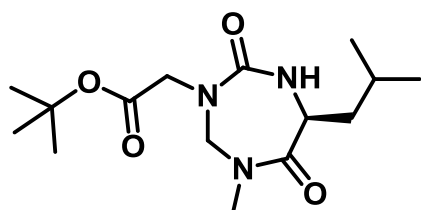
**cyclo((L)-Val-gN(iPr)Gly-CO) (C27, B13)**

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) δ = 1.05-1.11 (m, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCH), 1.15-1.20 (m, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHN), 2.22-2.31 (m, 1H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCH), 3.93-3.97 (m, 1H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHN), 4.31-4.39 (m, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 4.77-4.89 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>N, NHCHCO), 5.11 (s, 1H, NHCHCO), 6.85 (s, 1H, NHCH<sub>2</sub>N). MS(ESI): [2M + Na]<sup>+</sup> = 449.1

- Derivatisation of the urea moiety : creation of new libraries : III.29, III.30, III.31 and III.32



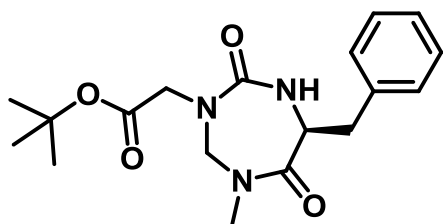
**General procedure for N- mono-alkylation reaction exemplified by (S)-tert-butyl 2-(6-isobutyl-1-methyl-4,7-dioxo-1,3,5-triazepan-3-yl)acetate (III.30 A)**



Under inert atmosphere, **Cyclo(Leu-gSar-CO)** (**A1**, **B11**) (0.15 g, 0.08 mmol) was dissolved in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1 mL).  $\text{KF}/\text{Al}_2\text{O}_3$  (40% wt) (0.11 g, 0.8 mmol, 10 eq.) and tertbutylbromo acetate (22  $\mu\text{L}$ , 0.15 mmol, 2 eq.) were added. The mixture was stirred for 24 h at 40 °C then  $\text{KF}/\text{Al}_2\text{O}_3$  was removed by filtration. The crude was washed with a saturated solution of  $\text{NaHCO}_3$  then with  $\text{KHSO}_4$  (1M), and  $\text{NaCl}$  (saturated). Organic layer was dried on  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  then concentrated. The desired product was purified by flash chromatography (AcOEt /cyclohexane, 40 : 60, v/v). A white solid was obtained with 50% yield (0.04 g).

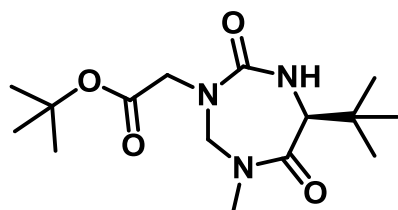
$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298K):  $\delta$  = 0.92 (t,  $J$  = 6.2 Hz, 6H,  $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ ), 1.44 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ), 1.60-1.85 (m, 3H,  $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ ,  $\text{CHCH}_2\text{CH}$ ), 3.08 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.85 (d,  $J$  = 17.7 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{CO}$ ), 4.12 (d,  $J$  = 15.6 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 4.28-4.36 (m, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CO}$ ,  $\text{CHCH}_2\text{CH}$ ), 5.49 (d,  $J$  = 15.6 Hz,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298K):  $\delta$  = 22.29, 23.40 ( $\text{CH}_3\text{CH}$ ), 24.81 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 28.51 ( $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ), 34.98 ( $\text{NCH}_3$ ), 41.24 ( $\text{CHCH}_2\text{CH}$ ), 51.99 ( $\text{COCH}_2\text{N}$ ), 52.66 ( $\text{CHCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 63.30 ( $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 82.71 ( $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ), 157.45 ( $\text{NCONH}$ ), 169.48 ( $\text{COOtBu}$ ), 171.06 ( $\text{NCOCH}$ ).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 5.23 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 20-80% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[2\text{M} + \text{H}]^+ = 626.5$

**(S)-tert-butyl 2-(6-benzyl-1-methyl-4,7-dioxo-1,3,5-triazepan-3-yl)acetate (III. 30 B)**



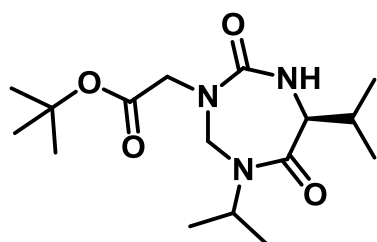
White solid with 54% yield.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K):  $\delta$  = 1.49 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 2.84 (dd,  $J$  = 9.3, 14.4 Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 3.17 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.40 (dd,  $J$  = 4.5, 14.3 Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 3.89 (d,  $J$  = 17.7 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{COOtBu}$ ), 4.21 (d,  $J$  = 15.9 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 4.33 (d,  $J$  = 17.7 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{COOtBu}$ ), 4.55 (s, 1H,  $\text{NH}$ ), 4.62-4.67 (m, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 5.48 (d,  $J$  = 15.7 Hz, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{N}$ ), 7.28-7.40 (m, 5H, Ph).  $^{13}\text{C-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298K):  $\delta$  = 28.10 ( $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ), 34.69 ( $\text{NCH}_3$ ), 38.25 ( $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 51.51 ( $\text{NCH}_2\text{COOtBu}$ ), 55.99 ( $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 62.84 ( $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 82.32 ( $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ), 127.33, 128.70, 129.04, 129.39, 136.20 (Ph), 157.24 ( $\text{NCONH}$ ), 169.00 ( $\text{CH}_2\text{COOtBu}$ ), 169.90 ( $\text{NCOCH}$ ).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 6.75 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 10-100% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 370$

**(S)-tert-butyl 2-(6-tert-butyl-1-methyl-4,7-dioxo-1,3,5-triazepan-3-yl)acetate (III.30 C)**

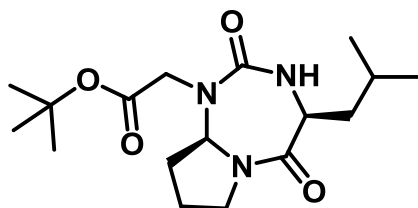
White solid with 49% yield.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K):  $\delta$  = 1.17 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CCH}$ ), 1.51 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CO}$ ), 3.13 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.93 (d,  $J$  = 17.7 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{COOtBu}$ ), 4.10 (d,  $J$  = 4.1 Hz, 1H, NH), 4.28-4.37 (m, 2H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ,  $\text{NCH}_2\text{COOtBu}$ ), 4.65 (d,  $J$  = 4.2 Hz, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 5.40 (d,  $J$  = 15.5 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K) :  $\delta$  = 26.4, 28.1 ( $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ), 34.0 ( $(\text{CH}_3)_3\text{CCH}$ ), 34.7 ( $\text{NCH}_3$ ), 51.4 ( $\text{CH}_2$ ), 61.7 ( $\text{CH}$ ), 63.2 ( $\text{CH}_2$ ), 82.2 ( $(\text{CH}_3)_3\text{CO}$ ), 157.5, 169.0, 169.5 ppm (CO).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 12.21 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 0-100% B, 1.2 ml/min, 20 min).  $\text{HRMS(ESI)}$ :  $m/z$  : calculated for  $\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{LiN}_3\text{O}_4$  : 320.2156, found : 320.2143

**(S)-tert-butyl 2-(1,6-diisopropyl-4,7-dioxo-1,3,5-triazepan-3-yl)acetate (III.30 D)**

White solid with 40% yield.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K):  $\delta$  = 1.08-1.11 (m, 6H,  $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}$ ), 1.18 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 6H,  $(\text{CH}_3)_2\text{CHN}$ ), 1.52 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CO}$ ), 2.24-2.35 (m, 1H,  $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}$ ), 3.82 (d,  $J$  = 17.7 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{COOtBu}$ ), 3.99-4.03 (m, 1H,  $(\text{CH}_3)_2\text{CHN}$ ), 4.37 (d,  $J$  = 17.7 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{COOtBu}$ ), 4.50 (d,  $J$  = 15.8 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 4.66 (s, 1H, NH), 4.79-4.88 (m, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 5.01 (d,  $J$  = 15.8 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K) :  $\delta$  = 18.0, 19.8, 20.6, 21.0, 28.0 ( $\text{CH}_3$ ), 30.8, 44.1 ( $\text{CH}$ ), 50.4, 55.2 ( $\text{CH}_2$ ), 61.6 ( $\text{CH}$ ), 82.2 (Cq), 158.1, 169.2, 169.4 ppm (CO).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 12.87 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 0-100% B, 1.2 ml/min, 20 min).  $\text{HRMS(ESI)}$ :  $m/z$  : calculated for  $\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{LiN}_3\text{O}_4$  : 334.231, found : 334.235

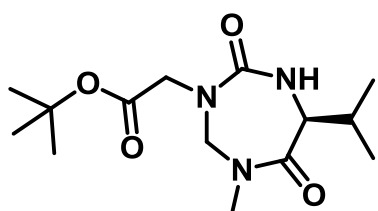
**tert-butyl 2-((4S,9aR)-4-isobutyl-2,5-dioxooctahydro-1H-pyrrolo[1,2-a][1,3,5]triazepin-1-yl)acetate (III.30 E)**

White solid with 62% yield.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K),  $\delta$  = 0.98 (d,  $J$  = 4.6 Hz, 3H,  $(\text{CH}_3)\text{CHCH}_2$ ), 1.01 (d,  $J$  = 4.7 Hz, 3H,  $(\text{CH}_3)\text{CHCH}_2$ ), 1.59 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ), 1.80-2.28 (m, 7H,  $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ,  $(\text{CH}_3)\text{CHCH}_2$ ), 3.65 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.75 (d,  $J$  = 18.0 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{COOtBu}$ ), 4.29-

4.35 (m, 1H, NHCHCO), 5.57 (s, 1H, NH), 4.64 (d, J = 18.0 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>COOtBu), 5.84 (dd, J = 3.7, 6.0 Hz, 1H, NCHN). <sup>13</sup>C-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 22.05, 22.84 ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH), 23.53 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 24.72 ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 28.49 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C), 31.70 (NCH(CH<sub>2</sub>)N), 40.80 ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 45.85 (NCH<sub>2</sub>CO), 46.74 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 53.52 (NHCHCO), 69.06 (NCH(CH<sub>2</sub>)N), 82.54 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C), 159.33 (NCON), 169.61 (COOtBu), 169.93 (NCOCH). MS(ESI): [M + Na]<sup>+</sup> = 362.

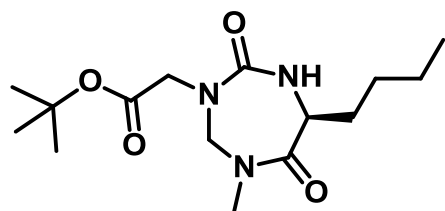
**(S)-tert-butyl 2-(6-isopropyl-1-methyl-4,7-dioxo-1,3,5-triazepan-3-yl)acetate (III.30 F)**



White solid with 92% yield.

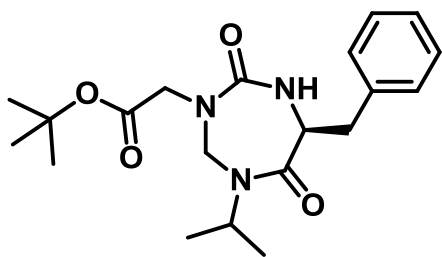
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298K), δ = 1.09 (t, J = 6.6 Hz, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH), 1.50 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C), 2.19-2.30 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.13 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.96-4.02 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>COOtBu, NHCHCO) 4.25 (d, J = 17.7 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>COOtBu), 4.51 (d, J = 15.6 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 4.73 (m, 1H, NH), 5.14 (d, J = 15.6 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N). <sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298K), δ = 18.02, 19.85 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 28.11 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C), 30.66 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 34.78 (NCH<sub>3</sub>), 51.44 (NCH<sub>2</sub>COOtBu), 61.47 (NHCHCO), 62.95 (NCH<sub>2</sub>N), 82.28 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C), 157.96 (NCON), 169.02 (COOtBu), 170.04 (NCOCH). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 5.82 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 10-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [M + Na]<sup>+</sup> = 322.2

**(S)-tert-butyl 2-(6-butyl-1-methyl-4,7-dioxo-1,3,5-triazepan-3-yl)acetate (II.30 G)**



White solid with 64% yield.

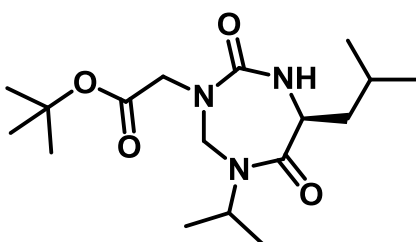
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 0.95 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.29-1.63 (m, 13H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.96-2.07 (m, 2H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.15 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.90 (d, J = 17.7 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>COOtBu), 4.19 (d, J = 15.7 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 4.30-4.35 (m, 1H, NHCHCO), 3.37 (d, J = 17.7 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>COOtBu), 4.57 (m, 1H, NH), 5.52 (d, J = 15.6 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N). <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 13.8 (CH<sub>3</sub>), 22.4, 27.9 (CH<sub>2</sub>), 28.0 (CH<sub>3</sub>), 31.7 (CH<sub>2</sub>), 34.4 (CH<sub>3</sub>), 51.5 (CH<sub>2</sub>), 54.4 (CH), 62.8 (CH<sub>2</sub>), 82.1 (Cq), 157.1, 169.0, 170.5 ppm (CO). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 12.61 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 0-100% B, 1.2 ml/min, 20 min). HRMS(ESI): m/z : calculated for C<sub>15</sub>H<sub>27</sub>LiN<sub>3</sub>O<sub>4</sub> : 320.2156, found : 320.2128

**(S)-tert-butyl 2-(6-benzyl-1-isopropyl-4,7-dioxo-1,3,5-triazepan-3-yl)acetate (III.30 H)**

White solid with 50% yield.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K),  $\delta$  = 1.20 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 1H,  $(\text{CH}_3)\text{CHN}$ ), 1.49 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ), 2.85 (dd,  $J$  = 9.4, 14.4 Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 3.40 (dd,  $J$  = 4.3, 14.4 Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 3.57 (d,  $J$  = 17.8 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{COOtBu}$ ), 4.22

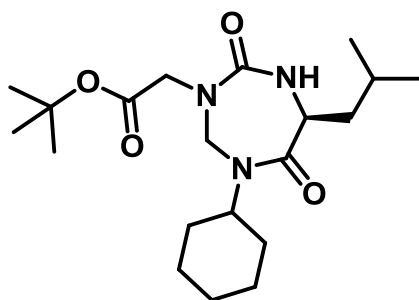
(d,  $J$  = 16.0 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 4.53 (d,  $J$  = 17.9 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{COOtBu}$ ), 4.57 (m, 1H, NH), 4.62-4.67 (m, 1H,  $\text{NCH}(\text{CH}_3)_2$ ), 4.81-4.90 (m, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 5.30 (d,  $J$  = 15.9 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 7.30-7.40 (m, 5H, Ph).  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K),  $\delta$  = 20.4, 21.0, 28.2 ( $\text{CH}_3$ ), 38.0 ( $\text{CH}_2$ ), 45.4 (CH), 51.6 ( $\text{CH}_2$ ), 56.2 (CH), 56.4 ( $\text{CH}_2$ ), 82.0 (Cq), 127.7, 129.4, 130.4 (CH-Ar), 138.5 (Cq), 157.9, 170.2, 170.8 ppm (CO).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 13.86 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 0-100% B, 1.2 ml/min, 20 min).  $\text{HRMS(ESI)}$ :  $m/z$  : calculated for  $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{LiN}_3\text{O}_4$  : 382.2313, found : 382.2368

**(S)-tert-butyl 2-(6-isobutyl-1-isopropyl-4,7-dioxo-1,3,5-triazepan-3-yl)acetate (III.30 I)**

White solid with 95% yield.

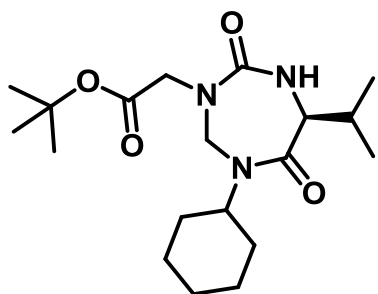
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K),  $\delta$  = 0.98 (d,  $J$  = 4.3 Hz, 3H,  $(\text{CH}_3)\text{CHCH}_2$ ), 1.00 (d,  $J$  = 4.4 Hz, 3H,  $(\text{CH}_3)\text{CHCH}_2$ ), 1.19 (t,  $J$  = 6.6 Hz, 6H,  $(\text{CH}_3)\text{CHN}$ ), 1.52 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ), 1.73-1.93 (m, 3H,  $(\text{CH}_3)\text{CHCH}_2$ ), 3.56 (d,  $J$  = 17.7 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{COOtBu}$ ), 4.20 (d,  $J$  = 15.9, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 4.38-4.43 (m, 1H,  $(\text{CH}_3)\text{CHN}$ ), 4.55 (s, 1H, NH), 4.66 (d,  $J$  = 17.7 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{COOtBu}$ ), 4.75-4.86 (m, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 5.41 (d,  $J$  = 15.9, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298K),  $\delta$  = 20.56, 21.18, 21.89, 23.10 ( $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ ), 28.13 ( $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ), 30.95 ( $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2$ ), 40.79 ( $(\text{CH}_3)_2\text{CHN}$ ), 44.40 ( $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2$ ), 50.67 ( $\text{NCH}_2\text{CO}$ ), 52.27 ( $\text{NHCHCO}$ ), 55.44 ( $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 82.33 ( $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ), 157.06 (NCON), 169.36 (COOtBu), 170.27 (NCOCH).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 7.93 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 10-100% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[M + \text{Na}]^+ = 364.1$

**(S)-tert-butyl 2-(1-cyclohexyl-6-isobutyl-4,7-dioxo-1,3,5-triazepan-3-yl)acetate (III.30 J)**

White solid with 70% yield.

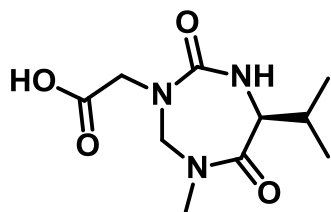
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K),  $\delta$  = 0.99 (d,  $J$  = 3.8 Hz, 3H,  $(\text{CH}_3)\text{CH}$ ), 1.01 (d,  $J$  = 3.9 Hz, 3H,  $(\text{CH}_3)\text{CH}$ ), 1.11-1.37 (m, 5H,  $\text{CH}_2$ ), 1.40-1.49 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.58 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ), 1.70-1.94 (m, 6H,  $\text{CH}_2$ ,  $(\text{CH}_3)\text{CH}$ ,  $(\text{CH}_3)\text{CHCH}_2$ ), 3.57 (d,  $J$  = 17.7 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{COOtBu}$ ), 4.23 (d,  $J$  = 15.9, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 4.35-4.45 (m, 2H,  $(\text{CH}_2)_2\text{CHN}$ ,  $\text{NHCHCO}$ ), 4.52 (s, 1H, NH), 4.65 (d,  $J$  = 17.7 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{COOtBu}$ ), 5.41 (d,  $J$  = 15.9, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K),  $\delta$  = 21.93 ( $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ ), 23.08 ( $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ ), 24.49 ( $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ ), 25.49, 25.64, 25.80 ( $\text{CH}_2$ cyclohexyle), 28.14 ( $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ), 31.13 ( $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2$ ), 32.02 ( $(\text{CH}_2)_2\text{CHN}$ ), 40.86 ( $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2$ ), 50.67 ( $\text{NCH}_2\text{CO}$ ), 52.31 ( $\text{NHCHCO}$ ), 56.04 ( $(\text{CH}_3)_2\text{CHN}$ ), 69.87 ( $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 82.29 ( $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ), 157.00 ( $\text{NCON}$ ), 169.35 ( $\text{COOtBu}$ ), 170.40 ( $\text{NCOCH}$ ).  $\text{C}_{18}$ -HPLC  $t_R$  = 8.77 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 10-100% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 404$

**(S)-tert-butyl 2-(1-cyclohexyl-6-isopropyl-4,7-dioxo-1,3,5-triazepan-3-yl)acetate (III.30 K)**

White solid with 72% yield.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K),  $\delta$  = 1.08 (d,  $J$  = 5.9 Hz, 3H,  $(\text{CH}_3)\text{CH}$ ), 1.01 (d,  $J$  = 3.9 Hz, 3H,  $(\text{CH}_3)\text{CH}$ ), 1.15-1.48 (m, 5H,  $\text{CH}_2$ ), 1.52 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ), 1.70-1.88 (m, 6H,  $\text{CH}_2$ ,  $(\text{CH}_3)\text{CH}$ ), 3.81 (d,  $J$  = 17.7 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{COOtBu}$ ), 3.99-4.03 (m, 1H,  $(\text{CH}_2)_2\text{CHN}$ ), 4.35 (d,  $J$  = 17.7, 1H,  $\text{NCH}_2\text{COOtBu}$ ), 4.35-4.46 (m, 2H,  $(\text{CH}_2)_2\text{CHN}$ ,  $\text{NHCHCO}$ ), 4.52 (d,  $J$  = 15.6, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 4.72 (s, 1H, NH), 4.65 (d,  $J$  = 17.7 Hz), 5.00 (d,  $J$  = 15.6, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K),  $\delta$  = 18.03, 19.85 ( $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ ), 25.46, 25.64, 25.76 ( $\text{CH}_2$ cyclohexyle), 28.14 ( $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ), 30.86, 31.27 ( $(\text{CH}_2)_2\text{CHN}$ ), 31.80 ( $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ ), 50.43 ( $\text{NCH}_2\text{CO}$ ), 52.53 ( $\text{NHCHCO}$ ), 55.97 ( $(\text{CH}_3)_2\text{CHN}$ ), 61.66 ( $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 82.30 ( $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ), 158.13 ( $\text{NCON}$ ), 169.31 ( $\text{COOtBu}$ ), 169.60 ( $\text{NCOCH}$ ).  $\text{C}_{18}$ -HPLC  $t_R$  = 8.18 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 10-100% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 390.1$

**General procedure for tertbutyl group cleavage exemplified for (S)-6-isopropyl-1-methyl-4,7-dioxo-[1,3,5]-triazepane-3-yl)-acetic acid (III.31 A)**



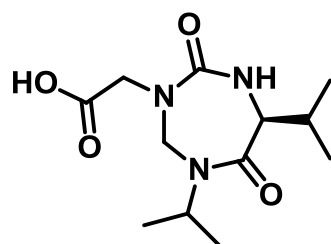
Under inert atmosphere and at 0 °C, the compound III.30 F was dissolved in TFA. Then the mixture was allowed to warm up to room temperature. After 30 min, TFA was concentrated and the desired compound was obtained by precipitation in cold Et<sub>2</sub>O. A

white solid was obtained with a quantitative yield.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, 298 K), δ = 1.09 (d, J = 6.6 Hz, 3H, (CH<sub>3</sub>)CH), 1.16 (d, J = 6.6 Hz, 3H, (CH<sub>3</sub>)CH), 2.14-2.26 (m, 1H, (CH<sub>3</sub>)CH), 3.16 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.99 (d, J = 8.8 Hz, NHCHCO), 4.26 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>COOH), 4.89 (d, J = 16.0 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 5.20 (d, J = 16.0 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N).

MS(ESI): [2M + Na]<sup>+</sup> = 509.1

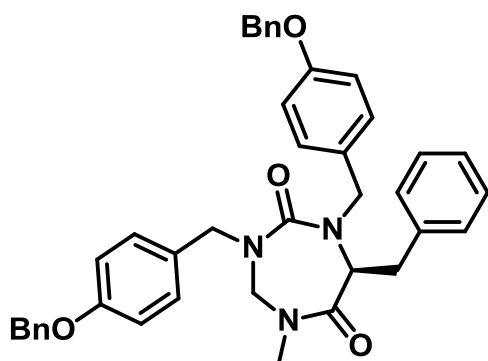
**(S)-(1,6-Diisopropyl-4,7-dioxo-[1,3,5]triazepane-3-yl)-acetatic acid (III.31 B)**



A white solid was obtained with a quantitative yield.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 1.08 – 1.25 (m, 12H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH), 2.35 – 2.50 (m, 1H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCH), 4.31 – 4.36 (m, 1H, NCH), 4.56 (d, J = 17.4 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>CO), 4.89 (d, J = 17.4 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>CO), 4.92 – 5.06 (m, 1H, NCHCO), 5.04 (d, J = 15.6 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 5.48 ppm (d, J=15.9 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N) ; <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 19.6, 20.1, 20.8, 21.1 (CH<sub>3</sub>), 32.1, 45.1 (CH), 51.2, 56.4 (CH<sub>2</sub>), 62.9 (CH), 82.2 (Cq), 159.0, 171.0, 173.8 ppm (CO). ). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 8.65 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 0-100% B, 1.2 ml/min, 20 min). HRMS(ESI): m/z : calculated for C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>LiN<sub>3</sub>O<sub>4</sub> : 278.1687, found : 278.1674

**General procedure for N,N-di-alkylation reaction exemplified for (S)-7-benzyl-1,3-bis(4-(benzyloxy)benzyl)-5-methyl-1,3,5-triazepane-2,6-dione (III.29 A)**

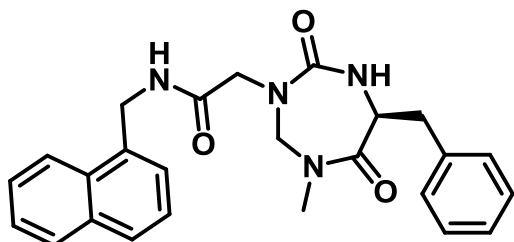


Under inert atmosphere, *cyclo*(Phe-gSar-CO) was dissolved in dry THF. NaH (95%, 4 eq.) was added then BnOBnCl (4 eq.) and a small amount of NaI were added. After 24 h at room temperature, the mixture was dissolved in EtOAc and washed with H<sub>2</sub>O. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and

evaporated. The desired product was purified by flash chromatography (AcOEt /cyclohexane, 50 : 50, v/v). An oil was obtained with 49% yield.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K),  $\delta$  = 2.70 (s, 1H,  $\text{NCH}_3$ ), , 3.20 (dd,  $J$  = 7.9, 14.0 Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 3.31 (dd,  $J$  = 4.3, 14.0 Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 3.45 (d,  $J$  = 14.8 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ), 3.99 (d,  $J$  = 13.8 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 4.13-4.17 (m, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 4.25 (d,  $J$  = 14.7 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ), 4.48 (d,  $J$  = 14.7 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ), 4.68 (d,  $J$  = 14.7 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ), 4.88 (d,  $J$  = 13.8 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 5.08 (d,  $J$  = 9.3 Hz, 4H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 6.89-6.98 (m, 3H, Ph), 7.03-7.07 (m, 2H, Ph), 7.15-7.20 (m, 2H, Ph), 7.29-7.47 (m, 14H, Ph).  $^{13}\text{C-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K),  $\delta$  = 34.81 ( $\text{CH}_3$ ), 39.99, 51.04, 52.15, 62.46 ( $\text{CH}_2$ ), 66.61 (CH), 70.06 ( $\text{CH}_2$ ), 115.06, 115.20, 127.02, 127.48, 127.99, 128.05, 128.53, 128.62, 129.20, 129.61, 129.77, 129.98, 130.08 (Ph), 136.78, 136.98, 137.64 (Ph), 158.28 (CO), 163.60 (Ph), 169.38 (CO).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 17.32 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 30-100% B, 1.2 ml/min, 20 min).  $\text{HRMS(ESI)}$ :  $m/z$  : calculated for  $\text{C}_{40}\text{H}_{40}\text{N}_3\text{O}_4$  : 626.3013, found : 626.3021

**General procedure for the synthesis of 1,3,5-triazepane-2,6-dione functionalised with an amide : exemplified by the preparation of (S)-2-(6-benzyl-1-methyl-4,7-dioxo-1,3,5-triazepan-3-yl)-N-(naphthalen-1-ylmethyl)acetamide (III.32 A)**



Compound **III.30 B** (35 mg, 0.1 mmol) was dissolved in 1 mL of TFA under inert atmosphere at 0 °C then the mixture was allowed to warm up to room temperature. After 30 min stirring, TFA was concentrated and the crude was dissolved in a

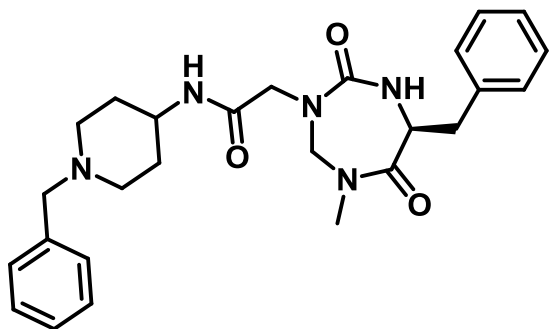
small amount of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The carboxylic acid corresponding to **III.30 B** was precipitated in cold  $\text{Et}_2\text{O}$ .

The carboxylic acid corresponding to **III.30 B** (29 mg, 0.1 mmol) and the naphthylmethylamine (18  $\mu\text{L}$ , 0.12 mmol, 1.2 eq.) were dissolved in a mixture of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 mL) and  $\text{CH}_3\text{CN}$  (1 mL). PS-DIPAM resin (75 mg, 0.15 mmol, 1.5 eq.) and PS-IIDQ resin (100 mg, 0.2 mmol, 2 eq.) were added and the mixture was stirred at room temperature. After 3 days, the resins were filtered and isocyanate resin (PS-NCO, 100 mg, 0.17 mmol, 1 eq.) was added. After 2 h of stirring, the resin was filtered and the filtrate was concentrated. The

desired product **III.32 A** was purified by flash chromatography (MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1 : 99, v/v). A white solid was obtained with 70% yield (0.03 g).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K):  $\delta$  = 2.75 (dd, J = 9.1, 14.5 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 3.04 (s, 1H, NCH<sub>3</sub>), 3.23 (dd, J = 4.7, 14.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 3.90 (d, J = 15.6 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>CONH), 4.01 (d, J = 15.6 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>CONH), 4.27 (d, J = 15.7 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 4.49-4.55 (m, 1H, NHCHCO), 4.65 (s, 1H, NHCHCO), 4.79-4.92 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>Napht), 5.34 (d, J = 15.6 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 6.99 (s, 1H, NHCH<sub>2</sub>Napht), 7.23-7.56 (m, 9H, Ph, Napht), 7.80-7.98 (m, 3H, Napht). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 13.83 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 0-100% B, 1.2 ml/min, 20 min). HRMS(ESI): m/z : calculated for C<sub>25</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>3</sub> : 453.171, found : 453.169

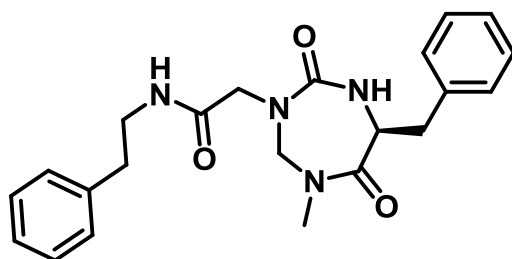
**(S)-2-(6-benzyl-1-methyl-4,7-dioxo-1,3,5-triazepan-3-yl)-N-(1-benzylpiperidin-4-yl)acetamide (III.32 B)**



White solid with 70% yield.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K):  $\delta$  = 1.41-1.54 (m, 2H, (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CHNH), 1.84-1.89 (m, 3H, (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CHNH), 2.09-2.17 (m, 2H, (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CHNH), 2.81-2.88 (m, 3H, CHCH<sub>2</sub>Ph, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CHNH), 3.16 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.40 (dd, J = 4.2, 14.3 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>Ph), 3.57 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>Ph), 3.71-3.84 (m, 1H, NHCHCO), 3.93 (d, J = 15.5 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>CONH), 4.04 (d, J = 15.5 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>CONH), 4.36 (d, J = 15.5 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 4.60-4.66 (m, 2H, NHCHCO, (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CHNH), 5.45 (d, J = 15.5 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 6.42 (s, 1H, CHNHCOCH<sub>2</sub>), 7.28-7.41 (m, 10H, Ph). <sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K):  $\delta$  = 30.84 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 33.26 (NCH<sub>3</sub>), 37.03 (NHCHCO), 51.66 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 51.85 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 55.35 (NCH<sub>2</sub>CONH), 62.52 (NCH<sub>2</sub>Ph), 62.57 (NCH<sub>2</sub>N), 126.53, 127.20, 127.99, 128.25, 129.14, 129.45, 137.00 (Ph), 158.30 (NCON), 169.52 (NCOCH), 171.22 (CH<sub>2</sub>CONH); C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 11.00 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 0-100% B, 1.2 ml/min, 20 min). HRMS(ESI): m/z : calculated for C<sub>26</sub>H<sub>34</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> : 464.266, found : 464.266



**(S)-2-(6-benzyl-1-methyl-4,7-dioxo-1,3,5-triazepan-3-yl)-N-phenethylacetamide (III.32 C)**

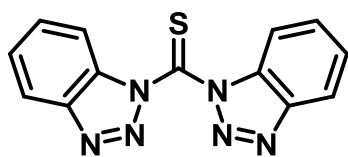
White solid with 76% yield

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K):  $\delta$  = 2.75-2.90 (m, 3H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 3.12 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.35-3.65 (m, 3H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 3.83 (d,  $J$  = 15.4 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{CONH}$ ), 4.08 (d,  $J$  = 15.4 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{CONH}$ ), 4.27 (d,  $J$  = 15.8 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 4.56-4.60 (m, 2H,  $\text{NHCHCO}$ ), 5.30 (d,  $J$  = 15.7 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 6.40 (s, 1H,  $\text{CHNHCOCH}_2$ ), 7.17-7.43 (m, 10H, Ph).

$^{13}\text{C-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K),  $\delta$  = 34.55 ( $\text{NCH}_3$ ), 35.49 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 38.16 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 40.47 ( $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 53.51 ( $\text{NHCHCO}$ ), 55.92 ( $\text{NCH}_2\text{CONH}$ ), 62.49 ( $\text{NHCH}_2\text{NH}$ ), 126.57, 127.52, 128.63, 128.78, 129.18, 129.34, 136.03, 138.59 (Ph), 157.44 ( $\text{NCON}$ ), 169.32 ( $\text{NCOCH}$ ), 169.62 ( $\text{CH}_2\text{CONH}$ );  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 7.92 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 0-100% B, 1.2 ml/min, 20 min).  $\text{HRMS(ESI)}$ :  $m/z$  : calculated for  $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{LiN}_4\text{O}_3$  : 401.216, found : 401.214

**Compounds cited in chapter IV**

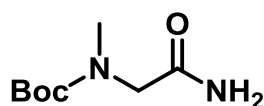
- **2-thioxo-1,3,5-triazepan-6-one synthesis**

**BtCSBt (IV.4)**

Under inert atmosphere and at 0 °C, TMS-benzotriazole (2.37 mL, 13.07 mmol, 2 eq.) was dissolved in  $\text{CCl}_4$  (10 mL) then thiophosgene (0.5 mL, 6.53 mmol, 1 eq.) in  $\text{CCl}_4$  (15 mL) was

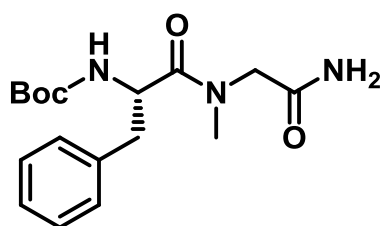
added dropwise. When the addition was over, the mixture was allowed to warm up to room temperature and was stirred for 15 h. The yellow solid formed was filtered then washed with cold  $\text{CCl}_4$  and dried under vacuum. A yellow solid was obtained with 77% yield (1.41 g).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K),  $\delta$  = 7.62-7.67 (m, 2H, Ph), 7.76-7.81 (m, 2H, Ph), 8.25-8.33 (m, 4H, Ph).  $^{13}\text{C-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K),  $\delta$  = 113.97, 121.09, 127.01, 130.66 (Ph), 169.74 (CS).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 303$

**Boc-Sar-NH<sub>2</sub> (IV.10)**

Under inert atmosphere Boc-Sar-OH **IV.9** (5 g, 26.4 mmol) was dissolved in dry THF (25 mL), then NMM (3.5 mL, 31.7 mmol, 1.2 eq.) was added. The mixture was cooled to -15 °C and IBCF (4.1 mL, 31.7 mmol, 1.2 eq.) was added dropwise. After 30 min at -15 °C, the reaction mixture was allowed to warm up to room temperature and ammonia was bubbled into the mixture until total conversion of the mixed anhydride. The salts were filtered and the filtrate was concentrated under vacuum. The desired product **IV.10** was purified by flash chromatography (EtOAc/cyclohexane, 80 : 20, v/v, and then 100% EtOAc). A white solid was obtained with 62% yield (3.0 g).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 1.49 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C), 2.98 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.89 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>CO), 5.52 (s, 1H, CONH<sub>2</sub>), 6.03 (s, 1H, CONH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 28.34 (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C, 35.77 (NCH<sub>3</sub>), 52.90 (NCH<sub>2</sub>CO), 80.90 (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C, 172.08 (CO).

**Boc-Phe-Sar-NH<sub>2</sub> (IV.11)**

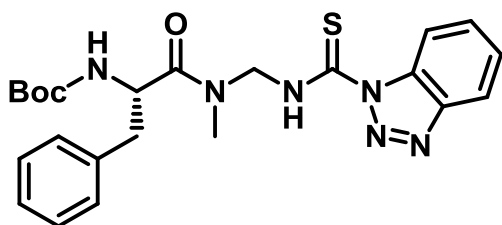
Under inert atmosphere and at 0 °C, Boc-Sar-NH<sub>2</sub> **IV.10** (3 g, 16 mmol) was dissolved in TFA (6 mL). After 30 min stirring at 0 °C, TFA was removed by evaporation and the TFA salt corresponding to **IV.10** was added to a solution of Boc-Phe-OH (4.24 g, 16 mmol, 1 eq.), BOP (6.50 g, 16.8 mmol, 1.05 eq.) and DIEA (8.3 mL, 48 mmol, 3 eq.) in DMF (20 mL). The mixture was stirred at room temperature for 4h. The reaction was quenched by addition of brine solution and extracted by EtOAc. The desired product **IV.11** was purified by flash chromatography (EtOAc/cyclohexane, 50:50, v/v, and then EtOAc/cyclohexane, 80:20, v/v). A white solid was obtained with 81% yield (4.38 g).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 1.42 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C), 2.85 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.90-3.03 (m, 4H, CH<sub>2</sub>Ph), 3.58 (d, J = 16.2 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>NH), 4.40 (d, J = 16.2 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>NH), 4.73 (m, 1H, CHCH<sub>2</sub>Ph), 5.33 (s, 1H, CONH<sub>2</sub>), 5.65 (s, 1H, CONH<sub>2</sub>), 6.54 (s, 1H, NH), 7.19-7.36 (m, 5H, Ph). <sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>, 298 K), δ = 28.63 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C), 35.39 (NCH<sub>3</sub>), 37.22 (CH<sub>2</sub>Ph), 51.13 (NHCHCO), 52.35 (NCH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>), 78.69 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C), 126.82, 128.58, 129.96, 130.23, 138.45 (Ph), 148.28 (NHCOOtBu), 170.63 (CONH<sub>2</sub>), 172.56 (CH(CH<sub>2</sub>)CON). MS(ESI): [M + Na]<sup>+</sup> = 358.1

**Boc-Phe-Sar-H•CF<sub>3</sub>COOH (IV.12)**

Dipeptide amide **IV.11** (2 g, 5.96 mmol) was dissolved in H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (1 : 1, v/v) (40 mL) then PIFA (3.08 g, 7.16 mmol, 1.2 eq.) was added and the mixture was stirred for 2.5 h at room temperature. Acetonitrile was concentrated under vacuum without heating then the mixture was freeze-dried. The crude was washed with cold Et<sub>2</sub>O (x 3) and was used in the next step without additional purification.

MS(ESI): [2M + H]<sup>+</sup> = 614.6

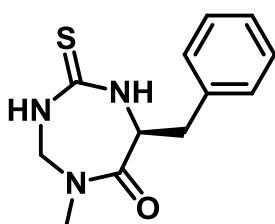
**(S)-tert-butyl 1-(((1H-benzo[d][1,2,3]triazole-1-carbothioamido)methyl)(methyl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-ylcarbamate (IV.13)**

TFA salt **IV.12** (1.12 g) was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL) and washed with saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> (100 mL) (2 x), then the organic layer was concentrated under vacuum without heating. Under inert atmosphere and at 0°C, benzotriazole

derivative **IV.4** (0.82 g, 2.92 mmol, 1.1 eq.) was dissolved in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL). Amine from TFA **IV.12** salt was dissolved in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL) and added dropwise to benzotriazole derivative **IV.4** solution and the mixture was stirred at room temperature for 15 h. Solvent was concentrated under vacuum and the desired product **IV.13** was purified by flash chromatography (EtOAc/cyclohexane, 10 : 90, v/v, and then EtOAc/cyclohexane, 15 : 75, v/v). A yellow solid was obtained with 35% yield (0.44 g).

<sup>1</sup>H-NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 1.44 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C), 2.95-3.11 (m, 5H, NCH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Ph), 4.75-4.89 (m, 1H, CHCH<sub>2</sub>Ph), 5.26-5.52 (m, 3H, NCH<sub>2</sub>N, OCNHCH), 7.08-7.35 (m, 3H, Ph), 7.44-7.75 (m, 3H, Ph), 7.97-8.31 (m, 2H, Ph), 8.87 (m, 1H, Ph), 9.70 (s, 1H, NHCS).

MS(ESI): [2M + Na]<sup>+</sup> = 958.7

**cyclo(Phe-gSar-CS), (S)-7-benzyl-5-methyl-2-thioxo-1,3,5-triazepan-6-one (IV.1)**

Compound **IV.13** (0.44 g, 0.94 mmol) was dissolved in TFA (2 mL) at 0°C under inert atmosphere. After 30 min stirring at 0 °C, TFA was removed by evaporation and the TFA salt formed was dissolved in water. The aqueous phase was washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> then freeze-dried.

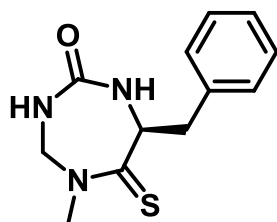
200 mg (0.41 mmol) of TFA salt were obtained.

The TFA salt from **IV.13** (0.2 g, 0.41 mmol) was dissolved in CH<sub>3</sub>CN (10 mL) then added dropwise to a solution of DIEA (132 μL, 0.82 mmol, 2 eq.) in 20 mL of CH<sub>3</sub>CN. When the addition was completed, the mixture was stirred for 3 h at room temperature then solvent was concentrated under vacuum. The crude was dissolved in EtOAc and washed with 1 M KHSO<sub>4</sub>. The desired heterocycle **IV.1** was purified by flash chromatography (EtOAc/cyclohexane, 40 : 60, v/v, and then EtOAc/cyclohexane/acetic acid, 40 : 60 : 0.3, v/v/v). A white solid was obtained with 39% yield (0.04 g).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 2.86-2.96 (m, 1H, CH<sub>2</sub>Ph). 3.13 (s, 3H, CH<sub>3</sub>N), 3.43 (dd, J = 5.7, 14.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.04 - 4.16 (m, 1H, NHCH<sub>2</sub>NCH<sub>3</sub>), 4.89 (m, 1H, CHCH<sub>2</sub>Ph), 5.36 (d, J = 15.2 Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>NCH<sub>3</sub>), 6.36 (s, 1H, CSNHCH), 7.24-7.40 (m, 5H, Ph), 7.94 (s, 1H CH<sub>2</sub>NHCS). <sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 34.17 (CH<sub>3</sub>), 36.93 (CH<sub>2</sub>Ph), 57.18 (CH), 57.25 (NCH<sub>2</sub>N), 127.53, 129.16, 129.27, 135.57 (Ph), 168.46 (CO), 181.16 (CS). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 5.42 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 10-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [2M + Na]<sup>+</sup> = 520.9, Crystallographic data, see Table page 333

## • Thionation of 1,3,5-triazepane-2,6-dione skeleton

### 7-Benzyl-5-methyl-6-thioxo-[1,3,5]triazepane-2-one (IV.27)

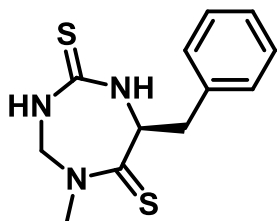


Heterocycle *cyclo*(Phe-gSar-CO) (50 mg, 0.21 mmol) was dissolved in dry THF under inert atmosphere. Lawesson reagent (85 mg, 0.21 mmol, 1 eq.) was added and the mixture was stirred for 48 h at room temperature. Then THF was concentrated under vacuum and the heterocycle **IV.27** was purified by preparative thin layer chromatography (EtOAc/cyclohexane, 60 : 40, v/v). A yellow solid was obtained with 79% yield.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 2.90 (dd, J = 8.4, 14.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 3.24 (dd, J = 4.8, 14.1 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 3.44 (s, NCH<sub>3</sub>, 3H), 4.31 (dd, J = 4.8, 15.6 Hz, NCH<sub>2</sub>N), 5.02 - 5.13 (m, 1H, NCHCS), 5.56 (dd, J = 5.4, 15.0 Hz, NCH<sub>2</sub>N), 6.34 - 6.43 (m, 1H, NH), 7.14 - 7.43 ppm (m, 6H, Ph, NH). <sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 39.5 (CH<sub>2</sub>), 41.8 (CH<sub>3</sub>), 57.2 (CH), 58.0 (CH<sub>2</sub>),

126.1, 127.9, 129.5, 138.2 (Ph), 156.3 (CO), 202.9 (CS). C<sub>18</sub>-RP-HPLC  $t_R$  = 11.74 min (A: 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B: 0.08% TFA in MeCN, 0-100% B, 1.2ml/min, 20 min), HRMS(ESI): m/z : calculated for C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>NaOS : 272.083, experimental : 272.080

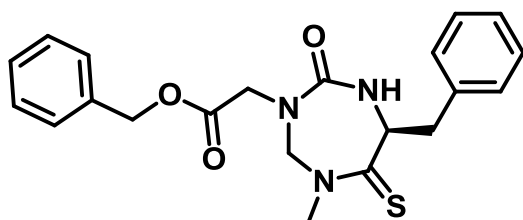
### 7-Benzyl-5-methyl-[1,3,5]triazepane- 2,6-dithione (IV.28)



Heterocycle **cyclo(Phe-gSar-CO)** (50 mg, 0.21 mmol) was dissolved in dry toluene under inert atmosphere. Lawesson reagent (85 mg, 0.21 mmol, 1 eq.) was added and the mixture was stirred at 80 °C for 48 h. Then toluene was concentrated under vacuum and the heterocycle **IV.28** was purified by preparative thin layer chromatography (EtOAc/cyclohexane, 60 : 40, v/v). A yellow solid was obtained with 82% yield.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K),  $\delta$  = 3.02 (dd, J = 9.3, 14.7 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 3.51 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.56 (dd, J = 4.5, 14.7 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.32 (dd, J = 6.9, 15.0 Hz, NCH<sub>2</sub>N), 5.13 - 5.23 (m, 1H, NCHCS), 5.50 (dd, J = 4.8, 15.0 Hz, NCH<sub>2</sub>N), 6.36 (br, 1H, NH), 7.23 - 7.39 (m, 5H, Ph), 8.26 ppm (br, 1H, NH) ; <sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K),  $\delta$  = 41.2 (CH<sub>2</sub>), 43.2 (CH<sub>3</sub>), 59.3 (CH<sub>2</sub>), 61.4 (CH), 127.4, 129.1, 135.9 (Ph), 181.1, 200.4 ppm (CS) ; C<sub>18</sub>-RP-HPLC  $t_R$  = 12.82 min (A: 0.1% TFA dans H<sub>2</sub>O, B: 0.08% TFA dans MeCN, 0-100% B, 1.2 ml/min, 20 min). HRMS(ESI): m/z : calculated for C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>LiN<sub>3</sub>S<sub>2</sub> : 272.086, experimental : 272.084

### General procedure for thionation of N-mono-alkylated compound exemplified for (S)-benzyl 2-(6-benzyl-1-methyl-4-oxo-7-thioxo-1,3,5-triazepan-3-yl)acetate (IV.30)

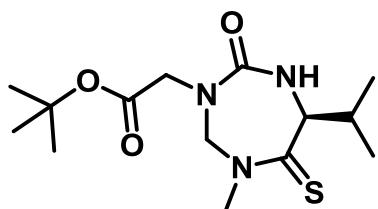


Heterocycle **IV.29** (30 mg, 0.08 mmol) was dissolved in dry THF (2 mL) under inert atmosphere. Lawesson reagent (65 mg, 0.16 mmol, 2 eq.) was added and the mixture was stirred at 60 °C for 2 days. Solvent was concentrated under vacuum and the crude was dissolved in EtOAc and washed with KHSO<sub>4</sub> (1M) and saturated solution of NaHCO<sub>3</sub>. The organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The desired compound **IV.30** was purified by flash

chromatography (EtOAc/cyclohexane, 30 : 70, v/v, and then EtOAc/cyclohexane/, 40 : 60, v/v/v). A white solid was obtained with 57% yield (18 mg).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K),  $\delta$  = 3.01 (dd,  $J$  = 9.9, 14.3 Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 3.56-3.62 (m, 4H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ,  $\text{NCH}_3$ ), 4.18 (d,  $J$  = 18.0 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{CO}$ ), 4.33 (d,  $J$  = 18.0 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{CO}$ ), 4.62 (m, 1H, NH), 4.66 (d,  $J$  = 15.4 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 4.95-5.01 (m, 1H,  $\text{NHCHCS}$ ), 5.20 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 5.50 (d,  $J$  = 15.4 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 7.29-7.40 (m, 5H, Ph).  $^{13}\text{C-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K),  $\delta$  = 42.75 ( $\text{NCH}_3$ ), 43.94 ( $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 50.36 ( $\text{COCH}_2\text{N}$ ), 61.89 ( $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 65.16 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 67.40 ( $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 127.40, 128.52, 128.66, 128.73, 129.04, 129.39, 135.07, 16.46 (Ph), 157.23 (CO), 169.56 (CO), 201.69 (CS).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 7.10 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 30-100% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[2\text{M} + \text{Na}]^+ = 816.7$

**(S)-tert-butyl 2-(6-isopropyl-1-methyl-4-oxo-7-thioxo-1,3,5-triazepan-3-yl)acetate (IV.32)**

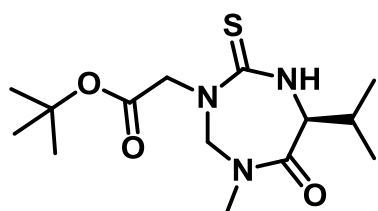


Compound **IV.32** was purified by preparative HPLC (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 20-80% B, 4 ml/min, 20 min). A white solid was obtained with 25% yield.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K),  $\delta$  = 1.13 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 3H,  $(\text{CH}_3)\text{CH}$ ), 1.15 (d,  $J$  = 1.7 Hz, 3H,  $(\text{CH}_3)\text{CH}$ ), 1.51 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ), 2.35-2.47 (m, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 3.59 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 4.07 (d,  $J$  = 17.7 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{COOtBu}$ ), 4.19 (d,  $J$  = 15.5 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{COOtBu}$ ), 4.40-4.45 (m, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 4.89 (d,  $J$  = 15.2 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 5.21 (s, 1H, NH), 5.25 (d,  $J$  = 15.5 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K),  $\delta$  = 19.00, 20.73 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 28.12 ( $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ), 34.14 ( $\text{NCH}_3$ ), 44.15 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 51.11 ( $\text{NCH}_2\text{COOtBu}$ ), 65.31 ( $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 70.39 ( $\text{NHCHCS}$ ), 82.49 ( $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ), 157.91 (NCON), 168.83 (COOtBu), 201.44 (NCSC).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 5.41 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 30-100% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 338.0$ , Crystallographic data, see Table page 334

**(S)-tert-butyl 2-(6-isopropyl-1-methyl-7-oxo-4-thioxo-1,3,5-triazepan-3-yl)acetate (IV.33)**



Compound **IV.33** was purified by preparative HPLC (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 20-80% B, 4 ml/min, 20 min). A white solid was obtained with 12% yield.

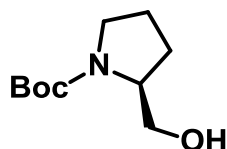
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K),  $\delta$  = 1.11 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 3H,

(CH<sub>3</sub>)CH), 1.14 (d, J = 6.8 Hz, 3H, (CH<sub>3</sub>)CH), 1.53 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C), 2.24-2.34 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.16 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 4.14-4.18 (m, 1H, NHCHCO), 4.52 (d, J = 17.5 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>COOtBu), 4.67 (d, J = 15.5 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 4.77 (d, J = 17.5 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>COOtBu), 5.29 (d, J = 15.5 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 6.32 (s, 1H, NH). <sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 18.21, 19.66 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 28.12 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C), 30.95 (NCH<sub>3</sub>), 34.85 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 57.90 (NCH<sub>2</sub>COOtBu), 64.50 (NHCHCO), 64.87 (NCH<sub>2</sub>N), 82.75 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C), 167.75(COOtBu), 169.86 (NCOCH), 185.17 (NCSN). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 4.91 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 30-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [M + Na]<sup>+</sup> = 338.0

## Compounds cited in chapter V

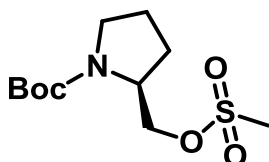
### • Synthesis of 1,3,6-triazocane-2,5-dione skeleton

#### (S)-tert-butyl 2-(hydroxymethyl)pyrrolidine-1-carboxylate (V.2)



Under inert atmosphere Boc-Pro-OH (6 g, 27.9 mmol) was dissolved in dry THF (150 mL), then NMM (3.4 mL, 30.7 mmol, 1.1 eq.) was added. The mixture was cooled to -15 °C and IBCF (3.8 ml, 29.3 mmol, 1.05 eq.) was added dropwise. The mixture was stirred 30 min at -15 °C. Salts were quickly filtrated at r.t. and the mixture was replaced in the 0 °C bath. A solution of NaBH<sub>4</sub> (2.1 g, 55.7 mmol, 2 eq.) in H<sub>2</sub>O (12 mL) was added at 0 °C. After 16 h at room temperature, the solvent was concentrated under vacuum and the crude was diluted in EtOAc and washed with KHSO<sub>4</sub> (1M) and saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> and brine. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated. The desired compound was obtained as white crystals with 87% yield (4.9 g) <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 1.45 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C), 1.70-2.08 (m, 4H, CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)N), 3.28-3.36 (m, 1H, CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)N), 3.41-3.51 (m, 1H, CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)N), 3.55-3.69 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 3.98 (m, 1H, CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)N), 4.77 (m, 1H, OH).

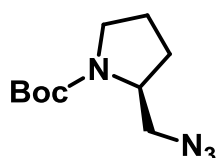
#### (S)-tert-butyl 2-((methylsulfonyloxy)methyl)pyrrolidine-1-carboxylate (V.3)



Compound **V.2** (4.9 g, 24.4 mmol) was dissolved in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (110 mL) under inert atmosphere and at 0 °C. Et<sub>3</sub>N (5 mL, 36.5 mmol, 1.5

eq.) was added then methanesulfonyl chloride (2.8 mL, 36.5 mmol, 1.5 eq.) was added dropwise. When the addition was over, the reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. Solvent was concentrated under vacuum and the crude was diluted in EtOAc and washed with a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> and with brine. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated. The crude was used in the next step without additional purification.

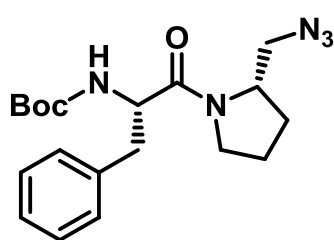
#### **(S)-tert-butyl 2-(azidomethyl)pyrrolidine-1-carboxylate (V.4)**



Under inert atmosphere, the mesylate derivative **IV.3** was dissolved in DMF (100 mL) then heated to 60 °C. When the temperature was 60 °C, NaN<sub>3</sub> (4 g, 60.9 mmol, 2.5 eq.) was added and the reaction was heated 15 h at 60 °C. The reaction was quenched by addition of KHSO<sub>4</sub> (1M) solution and the extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine and concentrated under vacuum. The desired compound **V.4** was purified by flash chromatography (EtOAc/cyclohexane, 5 : 95, v/v). Colourless oil was obtained with 72% yield (4.0 g) from the alcohol **V.2**.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 1.49 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C), 1.79-2.06 (m, 4H, CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)N), 3.37-3.64 (m, 4H, CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)N, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 3.94 (CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)N).

#### **tert-butyl (S)-1-((S)-2-(azidomethyl)pyrrolidin-1-yl)-1-oxo-3-phenylpropan-2-ylcarbamate (V.5)**

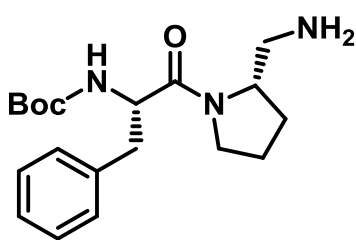


Under inert atmosphere and at 0 °C, azide derivative **V.4** (4 g, 17.8 mmol) was dissolved in TFA (4 mL). After 30 min stirring at 0 °C, TFA was removed by evaporation and the TFA salt corresponding to **V.4** was added to a solution of Boc-Phe-OH (4.71 g, 17.8 mmol, 1 eq.), BOP (7.85 g, 17.8 mmol, 1 eq.) and DIEA (9.3 mL, 53.3 mmol, 3 eq.) in DMF (20 mL). The mixture was stirred at room temperature 4 h. The reaction was quenched by addition of brine solution and extracted by EtOAc. The desired product **V.5** was purified by flash chromatography (EtOAc/cyclohexane, 50 : 50, v/v, and then EtOAc/cyclohexane, 20 : 80, v/v). Colourless oil was obtained with 73% yield (4.89 g). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 1.43 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C), 1.75-1.99 (m, 4H, CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)N), 2.89-3.09 (m, 3H, CH<sub>2</sub>Ph, CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)N), 3.15-3.31 (m, 1H, CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)N), 3.50-3.58 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 4.15-4.23 (m, 1H, CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)N), 4.60-4.71



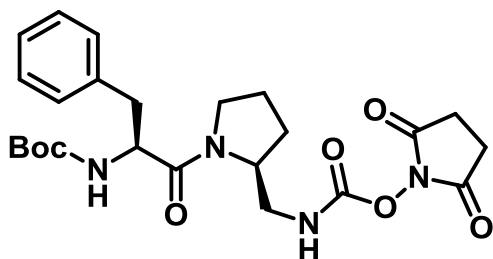
(m, 1H, CHCH<sub>2</sub>Ph), 5.32-5.40 (m, 1H, NH), 7.22-7.34 (m, 5H, Ph). <sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 24.07 (CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 27.64 (CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 28.36 (CH<sub>3</sub>), 39.84 (CH<sub>2</sub>Ph), 47.23 (CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 51.92 (CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 53.42 (CHCH<sub>2</sub>Ph), 56.45 (NCHCH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 79.73 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 126.96, 128.40, 129.33, 129.50, 136.30 (Ph), 155.17 (NHCOOtBu), 170.73 (CHCON). MS(ESI): [M + H]<sup>+</sup> = 373.8

**tert-butyl (S)-1-((S)-2-(aminomethyl)pyrrolidin-1-yl)-1-oxo-3-phenylpropan-2-ylcarbamate (V.6)**



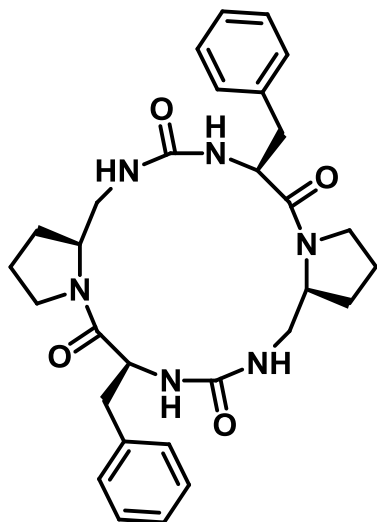
Azide dipeptide **V.5** (4.89 g, 13.1 mmol) was dissolved in MeOH (75 mL) under argon atmosphere. Pd/C (10 % wt) (0.26 g) was added then the mixture was placed under hydrogen atmosphere for 5 h. Pd/C was filtered on Buchner system and solvent was concentrated under vacuum. Colourless oil was obtained with quantitative yield.

**Succinimide carbamate (V.7)**



Under argon atmosphere, DSC (4 g, 15.7 mmol, 1.2 eq.) was dissolved in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL), then an amine **V.6** solution (4.55 g, 13.1 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL) was added dropwise to the DSC solution. The mixture was stirred 20 h at room temperature and the reaction was quenched by addition of a KHSO<sub>4</sub> solution (1M). The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. Carbamate **V.7** was purified by precipitation in a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/*i*Pr<sub>2</sub>O mixture. Desired compound was obtained with 81% yield as a white solid (5.2 g). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 1.47 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C), 1.60-1.83 (m, 4H, CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)N), 2.76-3.02 (m, 6H, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO, CH<sub>2</sub>Ph), 3.23-3.29 (m, 1H, CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)N), 3.42-3.52 (m, 1H, CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)N), 3.57-3.73 (m, 2H, CHCH<sub>2</sub>NHCO), 4.09 (m, 1H, CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)N), 4.55 (m, 1H, CHCH<sub>2</sub>Ph), 5.29 (m, 1H, NH), 7.23-7.35 (m, 5H, Ph). <sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 23.78 (CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 25.50 (CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N) 28.37 (CH<sub>3</sub>), 28.63 (COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 39.10 (CH<sub>2</sub>Ph), 45.10 (CHCH<sub>2</sub>NHCO) 47.38 (CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 54.16 (CHCH<sub>2</sub>Ph), 57.69 (CHCH<sub>2</sub>NHCO), 80.33 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 127.15, 128.60, 129.39, 136.13 (Ph), 152.09 (NHCOON), 155.60 (NHCOOtBu), 169.90 (COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 171.97 (CHCON).

**(6S,10aS,16S,20aS)-6,16-dibenzyltetradecahydrodipyrrolo[2,1-e:2',1'-m][1,3,6,9,11,14]hexaazacyclohexadecine-5,8,15,18(1H,19H)-tetraone (V.8 A)**



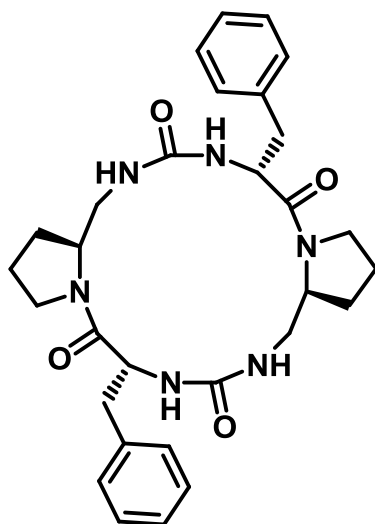
Carbamate derivative **V.7** (0.5 g, 1.0 mmol) was dissolved in TFA (1 mL) at 0 °C under inert atmosphere. After 30 min stirring at 0 °C, TFA was removed by evaporation and the TFA salt formed was precipitated in cold Et<sub>2</sub>O. The TFA salt corresponding to **V.7** was obtained with 74% yield (0.37 g)

The TFA salt from **V.7** (0.37 g, 0.74 mmol) was dissolved in CH<sub>3</sub>CN (200 mL) then added dropwise to a solution of DIEA (280 μL, 1.51 mmol, 2 eq.) in 400 mL of CH<sub>3</sub>CN. When the addition was completed, the mixture was stirred for 3 h at room temperature then solvent was concentrated under

vacuum. The crude was dissolved in EtOAc and washed with a KHSO<sub>4</sub> solution (1M) and brine. The desired heterocycle **V.8 A** was purified by flash chromatography (MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 2 : 98, v/v) then MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 : 95, v/v) and MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 : 90, v/v). A white solid was obtained with 24% yield (0.1 g).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>, 298 K), δ = 0.52 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.10 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.49 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 1.68 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.21 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 2.82-3.32 (m, 10H, CH<sub>2</sub>Ph, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, NHCH(CH<sub>2</sub>)N), 3.65 (m, 2H, NHCH(CH<sub>2</sub>)CO), 4.72 (m, 2H, NHCHCO), 5.88 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>CHN), 6.37 (m, 2H, NHCONHCH<sub>2</sub>), 7.09-7.33 (m, 10H, Ph). <sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>, 298 K), δ = 20.56 (CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 26.92 (CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 42.18 (CH<sub>2</sub>Ph), 43.13 (CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 53.04 (NHCH<sub>2</sub>CHN), 56.58 (NHCHCO), 126.76, 128.61, 129.51, 137.92 (Ph), 157.44 (CHCON), 170.33 (NHCONH). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 4.88 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 30-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [M + Na]<sup>+</sup> = 569.3, Crystallographic data, see Table page 335

**(6R,10aS,16R,20aS)-6,16-dibenzyltetradecahydrodipyrrolo[2,1-e:2',1'-m][1,3,6,9,11,14]hexaazacyclohexadecine-5,8,15,18(1H,19H)-tetraone (V.8 B)**

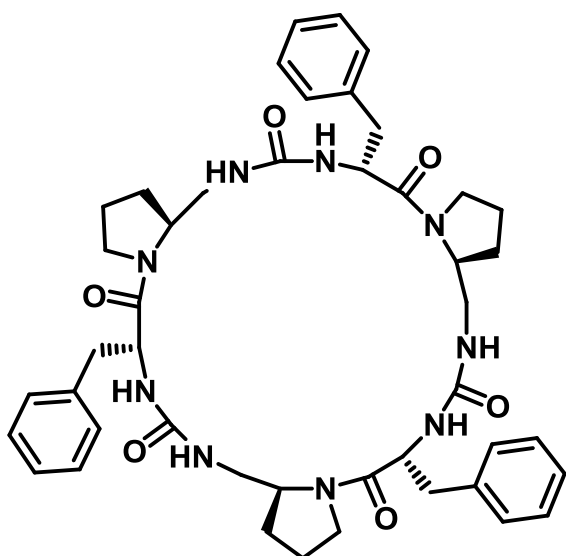


According to the procedure for the synthesis of **V.8 A**. Cyclic dimer **IV.8 B** was obtained with 25% yield as a white solid.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ , 298 K),  $\delta$  = 1.31-1.70 (m, 8H,  $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 2.71-3.03 (m, 8H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ,  $\text{NHCH}_2\text{CH}$ ), 3.45-3.60 (m, 4H,  $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.31 (m, 2H,  $\text{NHCHCO}$ ), 4.83-4.91 (m, 2H,  $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 6.30 (m, 2H, NH), 6.95 (m, 2H, NH), 7.20-7.31 (m, 10H, Ph).  $^{13}\text{C-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO } d_6$ , 298 K),  $\delta$  = 20.23, 24.12 ( $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 26.97, 29.39 ( $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 36.39, 38.72 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 45.06 ( $\text{NHCH}_2\text{CHN}$ ), 46.36, 47.56 ( $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 52.14, 55.08 ( $\text{NHCHCO}$ ),

57.46, 57.82 ( $\text{NHCH}_2\text{CHN}$ ), 126.32, 126.81, 127.05, 128.08, 128.58, 128.67, 129.68, 130.56, 137.79, 137.95, 138.03 (Ph), 157.07, 159.86 ( $\text{NHCONH}$ ), 171.27, 171.64 ( $\text{NCOCH}$ ).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC } t_R$  = 5.21 min (A: 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B: 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 30-100% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 569.3$

**(6R,10aS,16R,20aS,26R,30aS)-6,16,26-tribenzyltricosahydrotripyrrolo[2,1-e:2',1'-m:2'',1''-u][1,3,6,9,11,14,17,19,22]nonaazacyclotetracosine-5,8,15,18,25,28(1H,29H)-hexaone (V.9 B)**

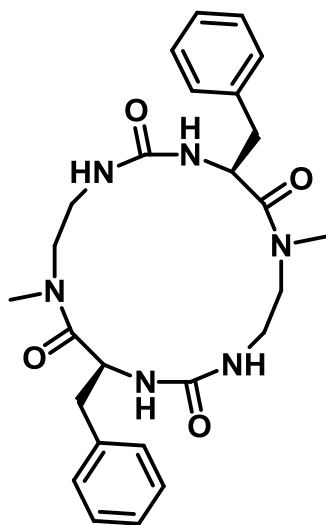


Cyclic trimer **V.9 B** obtained according to the procedure of **V.8 A** was obtained with 13 % yield as a white solid.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ , 298 K),  $\delta$  = 1.31-1.850 (m, 12H,  $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 2.60-3.42 (m, 18H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ,  $\text{NHCH}_2\text{CH}$ ,  $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.90-4.20 (m, 3H,  $\text{NHCHCO}$ ), 4.41 (m, 3H,  $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 6.66 (m, 3H, NH), 6.93 (m, 3H, NH), 7.11-7.36 (m, 15H, Ph).  $^{13}\text{C-NMR}$  (300

MHz, DMSO  $d_6$ , 298 K),  $\delta$  = 21.23, 24.13 (CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 26.97, 29.39 (CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 36.40, 38.73 (CH<sub>2</sub>Ph), 45.07 (NHCH<sub>2</sub>CHN), 46.36, 47.53 (CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 52.15, 55.08 (NHCHCO), 57.46, 57.81 (NHCH<sub>2</sub>CHN), 126.30, 126.77, 127.04, 128.11, 128.73, 129.78, 130.63, 137.81, 137.98, 138.08 (Ph), 157.03, 159.85 (NHCONH), 171.22, 171.63 (NCOCH). C<sub>18</sub>-HPLC  $t_R$  = 6.78 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 30-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [M + Na]<sup>+</sup> = 842.4

**(4S,12S)-4,12-dibenzyl-6,14-dimethyl-1,3,6,9,11,14-hexaazacyclohexadecane-2,5,10,13-tetraone (V.8 C)**



According to the procedure for the synthesis of **V.8 A**. Cyclic dimere **V.8 B** was obtained with 30 % yield as a white solid. NMR spectroscopy shows an equilibrium between two conformers.

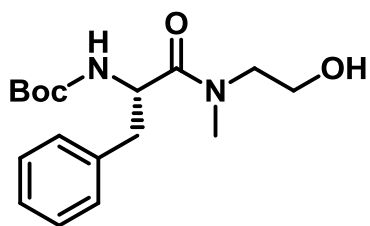
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN, 298 K),  $\delta$  = 2.49-3.00 (m, 21H, NCH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Ph, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.26-3.36 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)CO), 3.58-3.69 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)CO), 3.82-4.14 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)CO), 4.81-4.87 (m, 1H, NHCHCO), 5.03-5.13 (m, 2H, NHCHCO), 6.08 (t, J = 5.4 Hz, 1H, OCNHCH<sub>2</sub>), 6.17 (d, J = 10.1 Hz, 1H, OCNHCHCO), 6.28 (d, J = 6.5 Hz, 1H, OCNHCHCO), 6.49 (d, J = 9.5 Hz, 1H, OCNHCHCO), 6.67 (m, 1H, OCNHCH<sub>2</sub>), 6.76 (d, J = 9.3

Hz, OCNHCHCO), 7.06-7.09 (m, 2H, Ph), 7.14-7.33 (m, 12H, Ph).

<sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN, 298 K),  $\delta$  = 32.52, 34.41, 34.93 (NCH<sub>3</sub>), 35.64, 36.05, 36.47 (CH<sub>2</sub>Ph), 40.08, 40.53, 40.99 (CH<sub>2</sub>NHCONH), 47.79, 49.01, 49.19 (CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)CO), 49.68, 49.78, 51.11 (NHCHCO), 126.42, 126.52, 127.87, 128.18, 129.44, 129.71, 137.06, 137.47 (Ph), 156.82, 157.41, 157.73 (NHCONH), 173.51, 174.01, 174.07 (NCOCH). C<sub>18</sub>-HPLC  $t_R$  = 5.24 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 10-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [M + Na]<sup>+</sup> = 517.3

• **Synthesis of 1,3,6-oxadiazocane-2,5-dione skeleton**

**(S)-tert-butyl-1-((2-hydroxyethyl)(methyl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-ylcarbamate (V.10)**

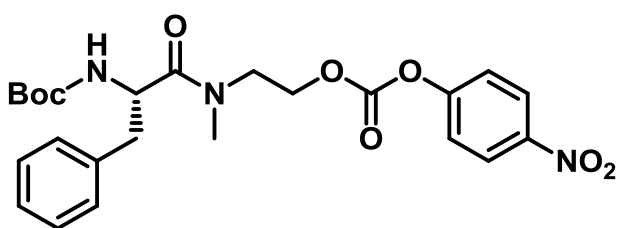


Under inert atmosphere Boc-L-Phe-Sar-OH (5.05 g, 15 mmol) was dissolved in dry THF (200 mL), and then NMM (2 mL, 18 mmol, 1.2 eq.) was added. The mixture was cooled to -15 °C and IBCF (2.3 mL, 29.3 mmol, 1.2 eq.) was added dropwise.

The mixture was stirred 30 min at -15 °C. Salts were quickly filtrated at 0 °C. A solution of NaBH<sub>4</sub> (1.1 g, 55.7 mmol, 2 eq.) in H<sub>2</sub>O (5 mL) was added at 0 °C. After 16 h at room temperature, the solvent was concentrated under vacuum and the crude was diluted in EtOAc and washed with a 1 M KHSO<sub>4</sub> solution and saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> and brine. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The desired compound **IV.10** was obtained after purification by flash chromatography with 66% yield.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 1.40 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C), 2.71 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.96 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Phe), 3.44 (dd, J = 5.6, 14.6 Hz, 2H, (CH<sub>3</sub>)NCH<sub>2</sub>), 3.67 (dd, J = 4.64 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 4.8 (m, 1H, NHCHCO), 5.39 (dd, J = 4.8, 8.6 Hz, 1H, NH), 7.23 (m, 5H, Ph) <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 28.3 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C), 36.6 (NCH<sub>3</sub>), 39.9 (CH<sub>2</sub>Ph), 51.6 (NHCHCO), 51.7 (CH<sub>3</sub>)NCH<sub>2</sub>, 61.0 (CH<sub>2</sub>OH), 79.8 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C), 127.0, 128.5, 129.5, 136.3 (Ph) 155.2 (COOtBu), 173.2 (NCOCH).

**(S)-tert-butyl-1-(methyl(2-((4-nitrophenoxy)carbonyloxy)ethyl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-ylcarbamate (V.11)**



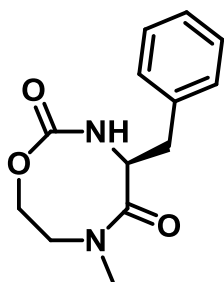
Under inert atmosphere, dipeptide I **IV.10** (0.3 g, 0.93 mmol) was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL) in presence of pyridine (82 μL, 1.02 mmol, 1.1 eq.). A solution of 4-nitrophenylchloroformate (0.37 g, 1.86

mmol, 2 eq.) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL) was added dropwise to the dipeptide solution. The mixture was stirred for 12 h at room temperature then CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL) was added and the organic layer was washed several times with NaHCO<sub>3</sub> solution (1 N). The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The desired compound **IV.11** was obtained after purification by flash chromatography (EtOAc/cyclohexane, 1 : 2) with 59% yield

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) : δ = 1.43 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C), 2.79 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.98 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Phe), 3.77 (dd, J = 5.2, 14.5 Hz, 2H, (CH<sub>3</sub>)NCH<sub>2</sub>), 4.31 (dd, J = 5.1, 9.97 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>OCOO), 4.85 (q, J = 7.9, 14.9 Hz, 1H, NHCHCO), 5.34 (m, 1H, NH), 7.24 (m, 5H, Ph), 7.39, 8.3 (m, 2H,

Ph-NO<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 27.7 ((CH<sub>3</sub>)C), 35.8 (NCH<sub>3</sub>), 39.4 (CH<sub>2</sub>Ph), 46.4 (CH<sub>3</sub>NCH<sub>2</sub>), 50.9 (NHCHCO), 66.0 (CH<sub>2</sub>OCOO) 79.3 ((CH<sub>3</sub>)C), 121.1, 124.7, 127.8, 128.7, 128.8, 135.5, 144.8, 151.6 (Ph), 154.5 (CH<sub>2</sub>OCOO), 154.8 (COOtBu), 171.8 (NCOCH).

**(S)-4-benzyl-6-methyl-1,3,6-oxadiazocane-2,5-dione (V.12 A)**

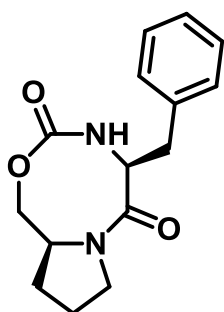


Carbonate derivative **V.11** (0.44 mmol) was dissolved in TFA (1 mL) at 0 °C under inert atmosphere. After 30 min stirring at 0 °C, TFA was removed by evaporation and the TFA salt formed was precipitated in cold Et<sub>2</sub>O.

The TFA salt from **V.11** (0.44 mmol) was dissolved in CH<sub>3</sub>CN (10 mL) then added dropwise to a solution of DIEA (280 μL, 1.51 mmol, 2 eq.) and HOBT (60 mg, 0.44 mmol, 1 eq.) in 25 mL of CH<sub>3</sub>CN. When the addition was completed, the mixture was stirred for 3 days at room temperature then solvent was concentrated under vacuum. The crude was dissolved in EtOAc and washed with a KHSO<sub>4</sub> solution (1M) and brine. The desired heterocycle **V.7** was purified by flash chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 1 : 20). Cyclic monomer **IV.12 A** was obtained with 39% yield and cyclic dimer **IV.13 A** was obtained with 20% yield

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) : δ = 3.0 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.02 (dd, J = 7.6, 14.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 3.17 (m, 1H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.28 (dd, J = 7.6, 14.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.15 (m, 1H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.20 (m, 1H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.75 (dd, J = 7.4, 8.9 Hz, 1H, NHCHCO), 6.10 (d, NHCHCO), 7.25 (m, 5H, Ph). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 35.7 (CH<sub>2</sub>Ph), 36.6 (NCH<sub>3</sub>), 52.9 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 54.0 (NHCHCO), 69.6 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 126.8, 128.6, 129.3, 136.9 (Ph), 157.7 NHCOO), 172.3 (NCOCH).

**(5S,10aS)-5-benzyltetrahydro-1H-pyrrolo[1,2-f][1,3,6]oxadiazocine-3,6(8H,9H)-dione (V.12 B)**

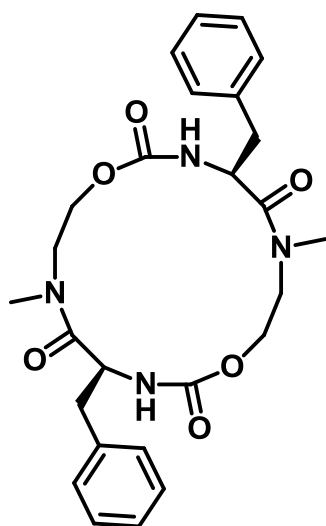


According to the procedure for the synthesis of **V.12 A**, cyclic monomer **V.12 B** was obtained with 30% yield.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 1.66-1.75 (m, 1H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 1.92-1.96 (m, 2H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.13-2.26 (m, 1H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.01 (dd, J = 7.6, 14.2 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 3.30 (dd, J = 7.2, 14.2 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 3.46-3.54 (m, 1H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.66-3.74 (m, 1H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.98 (dd, J = 10.0, 12.7 Hz, 1H, OCH<sub>2</sub>CH), 4.15 (dd, J = 2.1, 12.7 Hz, 1H,

OCH<sub>2</sub>CH), 4.34-4.43 (m, 1H, OCH<sub>2</sub>CH), 4.71-4.79 (m, 1H, NHCHCO), 5.29 (d, J = 9.3 Hz, 1H, NH), 7.24-7.38 (m, 5H, Ph). <sup>13</sup>C-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 22.82 (CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 28.74 (CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 35.48 (CH<sub>2</sub>Ph), 47.48 (CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 55.79 (OCH<sub>2</sub>CH), 59.47 (NHCHCO), 73.70 (OCH<sub>2</sub>CH), 126.75, 128.62, 129.40, 137.27 (Ph), 158.06 (OCONH), 171.00 (NCOCH). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 4.97 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 10-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [M + H]<sup>+</sup> = 275.0

**(4S,12S)-4,12-dibenzyl-6,14-dimethyl-1,9-dioxo-3,6,11,14-tetraazacyclohexadecane-2,5,10,13-tetraone (V.13 A)**



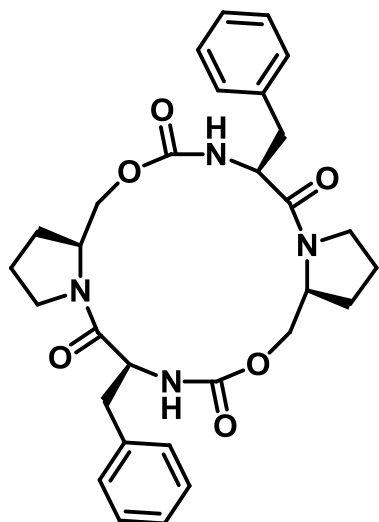
(m, 20 H, Ph).

According to the procedure for the synthesis of **V.12 A**, cyclic dimer **V.13 A** was obtained with 20% yield.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 1.93 (d, J = 15.8 Hz, 1H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.03 (d, J = 12.2 Hz, 1H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.38 (d, J = 13.7 Hz, 1H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.47 (d, J = 13.7 Hz, 1H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.67-2.94 (m, 16H, NCH<sub>3</sub>, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, CH<sub>2</sub>Ph), 3.12-3.19 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 3.14-3.38 (m, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 3.54-3.59 (td, J = 2.5, 12.3 Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.63-3.73 (m, 4H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.17-4.20 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.48-4.52 (m, 1H, NHCHCO), 4.65-4.89 (m, 7H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, NHCHCO), 5.73 (d, J = 9.2 Hz, 1H, NH), 5.8 (d, J = 7.0 Hz, 1H, NH), 5.84-5.87 (m, 2H, NH), 7.11-7.29

**(6S,10aS,16S,20aS)-6,16-dibenzyl-dodecahydrodipyrrolo[1,2-f:1',2'-**

**n][1,9,3,6,11,14]dioxatetraazacyclohexadecine-5,8,15,18(1H,10H)-tetraone (V.13 B)**

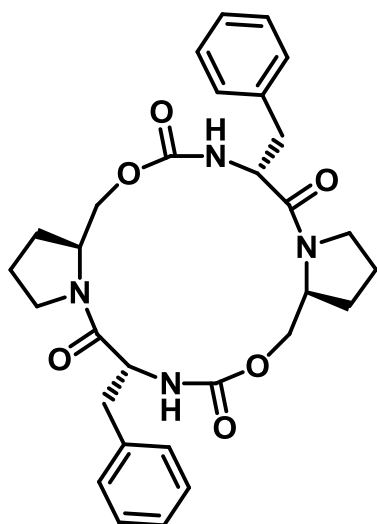


According to the procedure for the synthesis of **V.12 A**, cyclic dimer **V.13 B** was obtained with 7% yield.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 1.65-1.80 (m, 8H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.99-3.60 (m, 8H, CH<sub>2</sub>Ph, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.86-4.02 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH), 4.12-4.21 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH), 4.34-4.51 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH), 4.74-4.84 (m, 2H, NHCHCO), 5.70 (m, 1H, NH), 6.24 (m, 2H, NH), 7.19-7.34 (m, 10H, Ph). <sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 22.90 (CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 25.79 (CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 40.76 (CH<sub>2</sub>Ph), 45.06 (CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N),

53.59 (OCH<sub>2</sub>CH), 54.63 (NHCHCO), 63.97 (OCH<sub>2</sub>CH), 127.03, 128.49, 129.52, 136.28 (Ph), 155.35 (OCONH), 170.40 (NCOCH). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 6.90 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 10-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [M + H]<sup>+</sup> = 549.1

**(6R,10aS,16R,20aS)-6,16-dibenzylododecahydrodipyrrolo[1,2-f:1',2'-n][1,9,3,6,11,14]dioxatetraazacyclohexadecine-5,8,15,18(1H,10H)-tetraone (V.13 C)**



According to the procedure for the synthesis of **V.12 A**, cyclic dimer **V.13 C** was obtained with 13% yield.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K): δ = 1.41-1.55 (m, 6H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 1.84-1.95 (m, 2H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.54-2.63 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 2.85-2.98 (m, 4H, CH<sub>2</sub>Ph, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.36-3.43 (m, 2H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.61 (dd, J = 4.7, 11.4 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH), 4.40-4.48 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH), 4.54-4.67 (m, 4H, OCH<sub>2</sub>CH, NHCHCO), 5.93 (d, J = 9.3 Hz, 2H, NH), 7.18-7.31 (m, 10H, Ph). <sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298

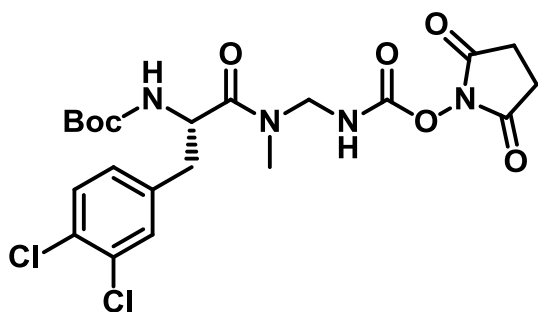
K): δ = 22.90 (CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 25.79 (CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 40.76 (CH<sub>2</sub>Ph), 45.06 (CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 53.59 (OCH<sub>2</sub>CH), 54.63 (NHCHCO), 63.97 (OCH<sub>2</sub>CH), 127.03, 128.49, 129.52, 136.28 (Ph), 155.35 (OCONH), 170.40 (NCOCH). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 6.75 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 10-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [M + Na]<sup>+</sup> = 571.3

## Compounds cited in chapter VI

- Compounds designed to bind calcium in the sPLA<sub>2</sub> active site: analogues of compound VI.6

### General procedure to synthesized 1,3,5-triazepan-2,6-diones exemplified for cyclo(-(3,4-dichloro)-Phe-gSar- CO)

#### Boc-(3,4-dichloro)-Phe-gSar-COOSu



**Boc-(3,4-dichloro)-Phe-Sar-OH** (2.85 g, 7.03 mmol) was dissolved in 15 mL of dry THF under



argon atmosphere, and NMM (0.93 mL, 8.44 mmol, 1.2 eq.) was added. The mixture was placed into a bath at -15 °C, and IBCF (1.1 mL, 8.44 mmol, 1.2 eq.) was added. The mixture was stirred at -15 °C for 30 min; the bath was then removed and a solution of NaN<sub>3</sub> (1.14 g, 17.58 mmol, 2.5 eq.) in water (0.5 mL) was added. The mixture was stirred at room temperature for 15 min. The reaction was quenched by addition of brine, and extracted by ethyl acetate (1 x 240 mL). The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated under vacuum **without heating**. The residue was dissolved in 40 mL of dry toluene under argon, and heated at 70°C. The *Curtius* rearrangement was followed by gas bubbling, when gas emission ceased, HO-Su (0.81 g, 7.03 mmol, 1.0 eq.) and pyridine (0.4 mL, 4.92 mmol, 0.7 eq.) were added. The reaction was stirred at 70°C for 40 additional minutes and allowed to cool to room temperature. Solvents were concentrated under vacuum to give a white foam which was used in the next step without purification

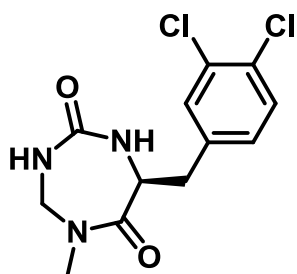
C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 6.98 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 30-100% B, 1 ml/min, 10 min).

#### **CF<sub>3</sub>COOH·H-(3,4-dichloro)-PhegSarCOOSu**

The crude succinimidyl carbamate was dissolved in 2 mL of TFA at 0 °C and under inert atmosphere. The reaction was stirred at room temperature for 30 min, then TFA was removed by evaporation and the TFA salt formed was precipitated in cold Et<sub>2</sub>O. **CF<sub>3</sub>COOH·H-(3,4-dichloro)-PhegSarCOOSu** was obtained with 78% yield over two steps.

C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 5.33 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 10-100% B, 1 ml/min, 10 min).

#### **Cyclo((3,4-dichloro)-Phe-gSar-CO)**



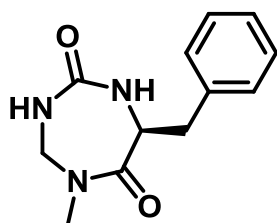
The TFA salt **CF<sub>3</sub>COOH·H-(3,4-dichloro)-PhegSarCOOSu** (1.18 g, 4.44 mmol) was dissolved in 50 mL of acetonitrile and the resulting solution was added dropwise to a solution of DIPEA (0.77 mL, 4.44 mmol, 2 eq.) in 50 mL of CH<sub>3</sub>CN. When the addition was completed, the mixture was stirred for an additional 3 h at room temperature

and solvent was evaporated. The crude was dissolved in EtOAc and washed with a KHSO<sub>4</sub> solution (1 M) and a NaHCO<sub>3</sub> saturated solution then the organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>

and concentrated under vacuum. The heterocycle **Cyclo((3,4-dichloro)-Phe-gSar-CO)** was purified by precipitation in cold Et<sub>2</sub>O.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 2.81 (dd, J = 7.3, 14.5 Hz, CHCH<sub>2</sub>Ph), 3.10 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.33 (dd, J = 6.3, 14.3 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>Ph), 4.06 (dd, J = 7.0, 15.7 Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 4.63 (m, 1H, CHCH<sub>2</sub>Ph), 5.24 (dd, J = 5.0, 15.6 Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 5.49 (s, 1H, NH), 7.00 (s, 1H, NH), 7.17 (dd, J = 1.9, 8.3 Hz, 1H, CHCHC(Cl)C(Cl)), 7.38-7.43 (m, 2H, Ph). <sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 33.92 (CH<sub>3</sub>N), 36.21 (CHCH<sub>2</sub>Ph), 54.38 (CHCH<sub>2</sub>Ph), 56.16 (NHCH<sub>2</sub>N), 128.99, 130.67, 130.79, 131.27, 132.67, 136.93 (Ph), 158.12 (NHCONH), 169.64 (NCOCH). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 6.29 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 30-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [2M + Na]<sup>+</sup> = 626.8

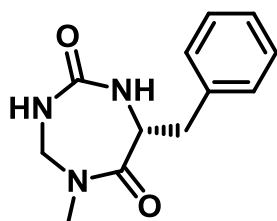
### Cyclo(Phe-gSar-CO)



According to the procedure for the synthesis of 1,3,5-triazepan-2,6-diones. **Cyclo(Phe-gSar-CO)** was obtained with 62% yield

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 2.85 (dd, J = 9.2, 14.4 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>Ph), 3.15 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.41 (dd, J = 5.0, 14.4 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>Ph), 4.08 (dd, J = 7.0, 15.6 Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 4.62 (s, 1H, NH), 4.66-4.71 (m, 1H, NHCHCO), 5.29 (dd, J = 5.4, 15.6 Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 5.78 (s, 1H, NH), 7.29-7.41 (m, 5H, Ph). <sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 33.86 (CH<sub>3</sub>N), 37.29 (CHCH<sub>2</sub>Ph), 54.56 (CHCH<sub>2</sub>Ph), 56.04 (NHCH<sub>2</sub>N), 127.21, 128.93, 129.32, 136.38 (Ph), 158.13 (NHCONH), 170.03 (NCOCH). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 4.18 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 10-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [M+H]<sup>+</sup> = 233.9

### Cyclo((D)-Phe-gSar-CO)



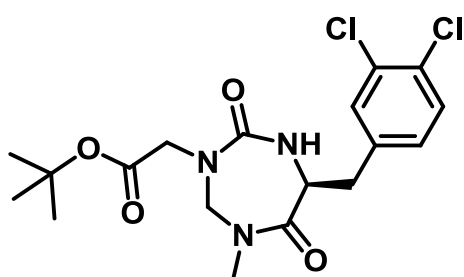
According to the procedure for the synthesis of 1,3,5-triazepan-2,6-diones. **Cyclo((D)-Phe-gSar-CO)** was obtained with 61% yield

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 2.78 (dd, J = 7.9, 14.4 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>Ph), 3.00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.22 (dd, J = 6.1, 14.2 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>Ph), 4.02 (dd, J = 7.2, 15.6 Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 4.73-4.79 (m, 1H, NHCHCO), 5.09 (s, 1H, NH), 5.21 (dd, J = 5.2, 15.6 Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>N), 6.09 (s, 1H, NH), 7.23-7.40 (m, 5H, Ph). <sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 33.86 (CH<sub>3</sub>N), 37.29 (CHCH<sub>2</sub>Ph), 54.56 (CHCH<sub>2</sub>Ph), 56.04 (NHCH<sub>2</sub>N), 127.21, 128.93, 129.32, 136.38 (Ph), 158.13 (NHCONH), 170.03 (NCOCH).

$C_{18}$ -HPLC  $t_R$  = 5.10 min (A : 0.1% TFA in  $H_2O$ , B : 0.1% TFA in  $CH_3CN$ , 0-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI):  $[2M+Na]^+$  = 489.2

**General procedure for synthesis of analogues of compound VI.6 exemplified by (S,E)-4-(6-(3,4-dichlorobenzyl)-1-methyl-4,7-dioxo-1,3,5-triazepan-3-yl)but-2-enoic acid (VI.16)**

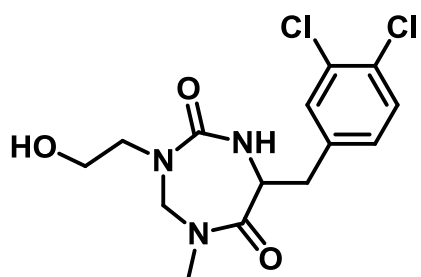
**(S)-tert-butyl 2-(6-(3,4-dichlorobenzyl)-1-methyl-4,7-dioxo-1,3,5-triazepan-3-yl)acetate – (III.30 L)**



Synthesised using the same procedure as compounds **III.30**. The desired compound was obtained with 49% yield.

$^1H$ -NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ , 298 K),  $\delta$  = 1.50 (s, 9H,  $C(CH_3)_3$ ), 2.82 (dd,  $J$  = 7.4, 14.4 Hz,  $CHCH_2Ph$ ), 3.16 (s, 3H,  $NCH_3$ ), 3.35 (dd,  $J$  = 5.5, 14.2 Hz, 1H,  $CHCH_2Ph$ ), 3.91 (d,  $J$  = 17.6 Hz, 1H,  $(CH_3)_3COOCCH_2N$ ), 4.19 (d,  $J$  = 15.7 Hz, 1H,  $NCH_2N$ ), 4.32 (d,  $J$  = 17.6 Hz, 1H,  $(CH_3)_3COOCCH_2N$ ), 4.57 (m, 2H,  $CHCH_2Ph$ , NH), 5.49 (d,  $J$  = 15.6 Hz, 1H,  $CHCH_2Ph$ ). 7.17 (dd,  $J$  = 1.9, 8.3 Hz, 1H,  $CHCHC(Cl)C(Cl)$ ), 7.42-7.45 (m, 2H, Ph).  $^{13}C$ -NMR (300MHz,  $CDCl_3$ , 298 K),  $\delta$  = 28.10 ( $CH_3$ ), 34.77 ( $NCH_3$ ), 37.42 ( $CH_2Ph$ ), 51.54 ( $OCCH_2N$ ), 55.75 (CH), 62.95 ( $NCH_2N$ ), 82.45 ( $C(CH_3)_3$ ), 128.96, 130.81, 131.32, 136.54 (Ph), 157.12, 168.90, 169.37 (CO).  $C_{18}$ -HPLC  $t_R$  = 8.27 min (A : 0.1% TFA in  $H_2O$ , B : 0.1% TFA in  $CH_3CN$ , 10-100% B, 1 ml/min, 10 min).

**7-(3,4-dichlorobenzyl)-3-(2-hydroxyethyl)-5-methyl-1,3,5-triazepane-2,6-dione (VI.13 B)**



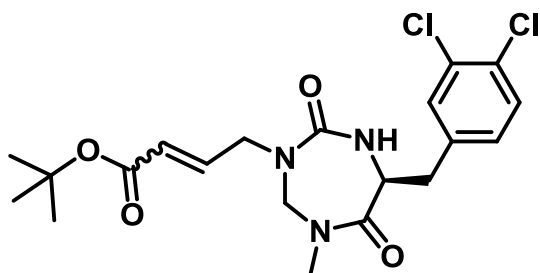
Acidic derivative from **III.30 L** was synthesized according to the general procedure for **III.31**.

Acidic derivative (0.27 g, 0.65 mmol) was dissolved in THF (10 mL) under inert atmosphere. NMM (85  $\mu$ L, 0.8 mmol, 1.2 eq.) was added, the mixture was cooled to  $-15^\circ C$  and IBCF (3.8 mL, 29.3 mmol, 1.05 eq.) was added. The mixture was stirred 25 min at  $-15^\circ C$ . Salts were quickly filtrated at  $0^\circ C$ . A solution of  $NaBH_4$  (70  $\mu$ g, 1.95 mmol, 3 eq.) in  $H_2O$  (2 mL) was added. After 15h at  $0^\circ C$ , the mixture was allowed to warm up to room temperature. Dilution in ethyl acetate was followed by a work up with brine. The organic layer was dried over  $Na_2SO_4$  and evaporated. The crude residue was purified by flash column

chromatography (MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 2 : 98, v/v then MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 3 : 97, v/v.) which afforded **VI.13 A** with 50% yield (123 mg) as a white powder.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN, 298 K): δ = 2.80 (dd, J = 7.6, 14.2 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>Ph), 3.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>N), 3.19 (dd, J = 6.1, 14.3 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>Ph), 3.32-3.64 (m, 4H, HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.32 (d, J = 15.9 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 4.69 (m, 1H, CHCH<sub>2</sub>Ph), 5.45 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>N, NH), 7.29 (dd, J = 2.0, 8.3 Hz, 1H, CHCHC(Cl)C(Cl)), 7.47 (d, J = 8.3 Hz, 1H, CHCHC(Cl)C(Cl)), 7.56 (d, J = 2.0 Hz, 1H, CCHC(Cl)C(Cl)). <sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 34.50 (CH<sub>3</sub>N), 36.98 (CH<sub>2</sub>Ph), 52.17 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 55.85 (NHCHCO), 61.76 (HOCH<sub>2</sub>), 63.11 (NCH<sub>2</sub>N), 129.07, 130.54, 131.02, 131.37, 132.42, 137.22 (Ph), 158.32 (NCON), 199.75 (NCOCH). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 6.15 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 10-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [2M + Na]<sup>+</sup> = 714.8

**(S)-tert-butyl-4-(6-(3,4-dichlorobenzyl)-1-methyl-4,7-dioxo-1,3,5-triazepan-3-yl)but-2-enoate (VI.15 B).**



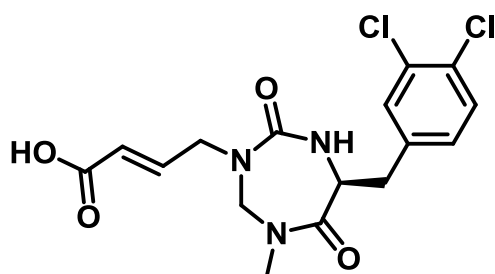
Under inert atmosphere, distilled CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.25 mL) was introduced in a flask. Oxalyl chloride (17 μL, 0.19 mmol, 1.5 eq.) was added, and the mixture was cooled to -20 °C. DMSO (28 μL, 0.39 mmol, 3 eq.) was added and the mixture was

stirred at -20 °C for 10 min. A solution of alcohol **VI.13 A** (45 mg, 0.13 mmol) in distilled CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.75 mL) was added dropwise, after that the mixture was stirred at -20 °C for an additional 20 min. DIPEA (136 μL, 0.78 mmol, 6 eq.) was added. After 5 min at -20 °C, the mixture was allowed to warm up to room temperature. H<sub>2</sub>O (2.5 mL) was added and the system was stirred at r.t. for 10 min. Extraction with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 x 25 mL) provided the organic layer which was worked up with KHSO<sub>4</sub> (1M) and brine. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated to give the aldehyde **VI.14 A**. Formation of **VI.14 A** was confirmed by HPLC C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 5.78 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 10-100% B, 1 ml/min, 10 min), and the compound was directly involved in the *Wittig* reaction. Under inert atmosphere, **VI.14 A** was dissolved in distilled CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL), addition of (Ph)<sub>3</sub>P=CHCOOtBu (73 mg, 0.19 mmol, 1.5 eq.) was followed by stirring at room temperature for 5 h. The reaction was quenched by addition of water, after separation the organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated. The crude residue was purified by flash column

chromatography (EtOAc /cyclohexane, 50 : 50, v/v then EtOAc /cyclohexane, 60 : 40, v/v). Only the *E* the isomer was isolated with  $(\text{Ph})_3\text{PO}$  as a contaminant.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ , 298K):  $\delta$  = 1.51 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ), 2.83 (dd,  $J$  = 7.9, 14.4 Hz,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 3.11 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.34 (dd,  $J$  = 5.5, 14.3 Hz,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 4.10-4.22 (m, 3H,  $\text{NCH}_2\text{CH}=\text{CH}$ ,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 4.57 (m, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 4.83 (s, 1H, NH), 5.31 (d,  $J$  = 15.6 Hz,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 5.87 (dt,  $J$  = 15.7, 1.9 Hz, 1H,  $\text{OCCH}=\text{CHCH}_2$ ), 6.76 (d,  $J$  = 15.8, 5.4 Hz, 1H,  $\text{OCCH}=\text{CHCH}_2$ ), 7.17 (dd,  $J$  = 2.0, 8.2 Hz, 1H,  $\text{CHCHC}(\text{Cl})\text{C}(\text{Cl})$ ). 7.41-7.61 (m, 6H, Ph,  $(\text{Ph})_3\text{P}=\text{O}$ ). 7.66-7.74 (m, 3H, Ph,  $(\text{Ph})_3\text{P}=\text{O}$ ).

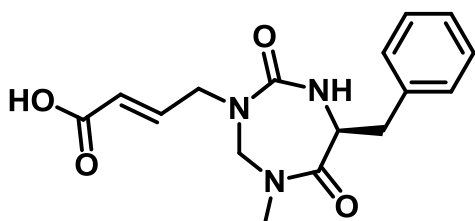
**(S,E)-4-(6-(3,4-dichlorobenzyl)-1-methyl-4,7-dioxo-1,3,5-triazepan-3-yl)but-2-enoic acid (VI.16)**



**VI.16** was obtained from **VI.15 B** (*E* isomer) according to the method described for the preparation of **III.31** in 24% yield.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO } d_6$ , 298 K),  $\delta$  = 2.81 (dd,  $J$  = 6.8, 14.2 Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 2.93 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.05 (dd,  $J$  = 6.4, 14.0 Hz,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 4.04-4.21 (m, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}$ ), 4.27 (d,  $J$  = 15.8 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 4.86 (m, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 5.61 (d,  $J$  = 15.8 Hz,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 5.82 (d,  $J$  = 15.3 Hz,  $\text{OCCH}=\text{CHCH}_2$ ), 6.48 (s, 1H, NH), 6.73 (dt,  $J$  = 4.9, 15.6 Hz, 1H,  $\text{OCCH}=\text{CHCH}_2$ ), 7.36 (dd,  $J$  = 2.0, 8.2 Hz, 1H,  $\text{CHCHC}(\text{Cl})\text{C}(\text{Cl})$ ), 7.56 (d,  $J$  = 8.3 Hz,  $\text{CHCHC}(\text{Cl})\text{C}(\text{Cl})$ ), 7.65 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H,  $\text{CCHC}(\text{Cl})\text{C}(\text{Cl})$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO } d_6$ , 298 K),  $\delta$  = 33.89 ( $\text{NCH}_3$ ), 35.62 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 49.60 ( $\text{CHCH}_2\text{N}$ ), 54.20 ( $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 61.37 ( $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 122.53 ( $\text{COCH}=\text{CH}$ ), 129.36, 130.50, 130.57, 131.01, 132.01, 139.97 (Ph), 145.19 ( $\text{COCH}=\text{CHCH}_2$ ), 156.50 ( $\text{NCONH}$ ), 167.33 ( $\text{COOH}$ ), 171.14 ( $\text{NCOCH}$ ).  $\text{C}_{18}$ -HPLC  $t_R$  = 6.53 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 10-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI):  $[2\text{M} + \text{Na}]^+ = 795.5$ , Crystallographic data, see Table page 337

**(S,E)-4-(6-benzyl-1-methyl-4,7-dioxo-1,3,5-triazepan-3-yl)but-2-enoic acid (VI.6)**



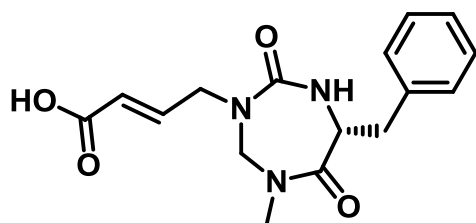
Synthesised using the same procedure as compounds **VI.16**. The desired compound was obtained with 54% yield.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO } d_6$ , 298K):  $\delta$  = 2.77-2.84 (m,

1H, CH<sub>2</sub>Ph), 2.93 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.08 (dd, J = 6.9, 14.1 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.04-4.20 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH), 4.26 (d, J = 15.9 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 4.85 (m, 1H, NCHCO), 5.60 (d, J = 15.9 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 5.83 (d, J = 15.7 Hz, 1H, OCCH=CHCH<sub>2</sub>), 6.31 (m, 1H, NH), 6.73 (dt, J = 4.8, 15.7 Hz, 1H, OCCH=CHCH<sub>2</sub>), 7.19-7.36 (m, 5H, Ph).

<sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>, 298K), δ = 33.90 (NCH<sub>3</sub>), 36.71 (CH<sub>2</sub>Ph), 49.68 (CHCH<sub>2</sub>N), 54.59 (CHCH<sub>2</sub>Ph), 61.43 (NCH<sub>2</sub>N), 122.62 (COCH=CH), 126.86, 128.57, 129.82, 138.53 (Ph), 145.22 (COCH=CHCH<sub>2</sub>), 156.51 (NCONH), 167.42 (COOH), 171.34 (NCOCH). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 5.17 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 10-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [M + H]<sup>+</sup> = 318.1, Crystallographic data, see Table page 336

### **Acide (R,E)-4-(6-benzyl-1-methyl-4,7-dioxo-1,3,5-triazepan-3-yl)but-2-enoïque (VI.17)**



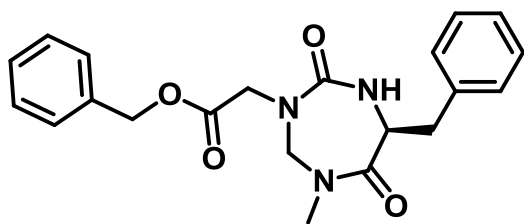
Synthesised using the same procedure as compounds **VI.16**. The desired compound was obtained with 46% yield

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>, 298K), δ = 2.79 (dd, J = 6.5, 14.2 Hz, CHCH<sub>2</sub>Ph), 2.91 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.06 (dd, J = 6.8, 14.0 Hz, CHCH<sub>2</sub>Ph), 4.08-4.13 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH), 4.24 (d, J = 15.9 Hz, NCH<sub>2</sub>N), 4.81-4.86 (m, 1H, NHCHCO), 5.58 (d, J = 15.9 Hz, NHCH<sub>2</sub>N), 5.81 (d, J = 15.5 Hz, HOOCCH=CH), 6.30 (s, 1H, NH), 6.67-6.76 (m, 1H, HOOCCH=CH), 7.16-7.35 (m, 5H, Ph). <sup>13</sup>C-NMR (400 MHz, DMSO d<sub>6</sub>, 298K), δ = 34.27 (NCH<sub>3</sub>), 37.04 (CH<sub>2</sub>Ph), 49.93 (CHCH<sub>2</sub>N), 54.93 (CHCH<sub>2</sub>Ph), 61.73 (NCH<sub>2</sub>N), 122.85 (COCH=CH), 127.10, 128.95, 130.29, 138.89 (Ph), 145.58 (COCH=CHCH<sub>2</sub>), 156.92 (NCONH), 167.74 (COOH), 171.52 (NCOCH). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 5.17 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 10-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [M+H]<sup>+</sup> = 318.

Compounds **VI.18**, **VI.19**, **VI.20**, **VI.21** : synthesised by M<sup>r</sup> Boeglin or M<sup>elle</sup> Lena

- **Compounds designed to bind the calcium in sPLA<sub>2</sub> active site, urea N,N'-dialkylation**

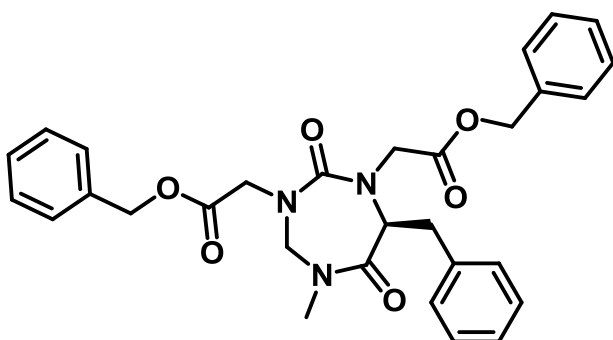
### **(S)-benzyl 2-(6-benzyl-1-methyl-4,7-dioxo-1,3,5-triazepan-3-yl)acetate (VI.23)**



Under argon, **cyclo(Phe-gSar-CO)** (1.82 g, 7.80 mmol) was dissolved in dry THF (150 mL) and NaH (95%) (0.54g, 23.4 mmol, 3 eq.) was added. Once effervescence had finished, *tert*-butyl bromoacetate (3.7 mL, 2.4 mmol, 3 eq.) was added and the reaction was stirred at room temperature for 30 h. THF was removed by evaporation and the crude product was dissolved in EtOAc and washed with H<sub>2</sub>O. Organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and the solvent was evaporated. Products from monoalkylation and dialkylation were isolated by chromatography on silica gel (EtOAc/cyclohexane, 50 : 50, v / v then EtOAc/cyclohexane, 70 : 30, v/v). The compound **VI.23** was obtained as a white solid with 53% yield (1.56 g) and compound VI.24 was obtained with 8% yield (0.34 g) also as white solid.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K),  $\delta$  = 2.84 (dd, J = 9.3, 14.4 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>Ph), 3.14 (s, 3H, CH<sub>3</sub>N), 3.40 (dd, J = 4.6, 14.5 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 4.07 (d, J = 17.9 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>CO), 4.21 (d, J = 15.8 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 4.45 (d, J = 17.9 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>Phe), 4.58 (s, 1H, NH), 4.62 (m, 1H, NHCHCO), 5.20 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 7.28-7.41 (m, 10H, Ph). <sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K),  $\delta$  = 34.70 (NCH<sub>3</sub>), 38.12 (CHCH<sub>2</sub>Ph), 50.77 (COCH<sub>2</sub>N), 55.85 (CHCH<sub>2</sub>PH), 62.81 (OCH<sub>2</sub>Ph), 67.29 (NCH<sub>2</sub>N), 127.35, 128.48, 128.61, 129.05, 129.39, 135.15, 136.18 (Ph), 157.14 (CO), 169.77 (CO), 169.89 (CO). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 7.43 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 10-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [M + Na]<sup>+</sup> = 404.0

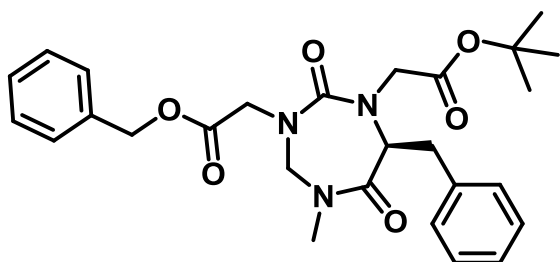
#### **(S)-benzyl 2,2'-(7-benzyl-5-methyl-2,6-dioxo-1,3,5-triazepane-1,3-diyl)diacetate (VI.24)**



<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K),  $\delta$  = 3.02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>N), 3.13 (d, J = 18 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>NCO), 3.26 (m, 2H, CHCH<sub>2</sub> Ph), 3.98 (d, J = 17.7 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>CO), 4.12-4.20 (m, 3H, NCH<sub>2</sub>CO, CHCH<sub>2</sub> Ph), 4.24 (dd, J = 7, 14.1 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 5.11 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 5.16-5.22 (m, 3H, NCH<sub>2</sub>N, OCH<sub>2</sub>Ph), 7.23-7.42 (m, 10H, Ph). <sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K),  $\delta$  = 35.21 (NCH<sub>3</sub>), 40.25 (CHCH<sub>2</sub>Ph), 50.49 (NCH<sub>2</sub>CO), 51.28 (NCH<sub>2</sub>CO), 65.10 (CHCH<sub>2</sub>Ph), 67.13 (OCH<sub>2</sub>Ph), 67.29 (OCH<sub>2</sub>Ph), 69.55 (NCH<sub>2</sub>N), 127.18, 128.48-128.71, 129.71, 135.20, 137.02 (Ph), 161.82 (CHCON), 168.97 (OCOCH<sub>2</sub>N), 169.45 (OCOCH<sub>2</sub>N). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 9.35 min (A :

0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 10-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [M + Na]<sup>+</sup> = 552.1

**(S)-benzyl 2-(7-benzyl-1-(2-tert-butoxy-2-oxoethyl)-5-methyl-2,6-dioxo-1,3,5-triazepan-3-yl)acetate (VI.25)**

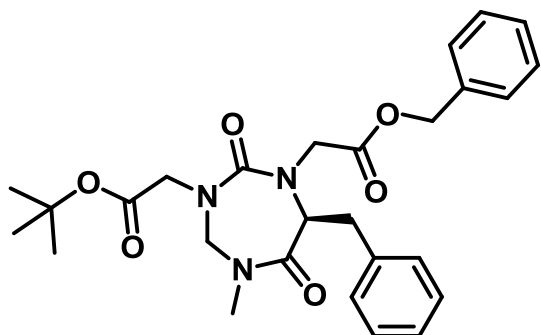


Under argon atmosphere, compound **VI.23** (0.5 g, 1.31 mmol) was dissolved in dry THF (5 mL) and cooled to -78 ° C. After 2 hours at -78 ° C, LiMHDS (0.33 g, 1.97 mmol, 1.5 eq.) was added dropwise and the mixture was stirred for an additional 1h and 15 min at -78 ° C. *tert*-butyl bromoacetate (290 µL, 1.97 mmol, 1.5 eq.) was added and the mixture was stirred at -78 ° C for 1:45 and then 12 h at room temperature. The reaction was quenched by addition of KHSO<sub>4</sub> solution (1M), the organic phase was extracted with EtOAc and washed with saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> and dried over MgSO<sub>4</sub> then concentrated under vacuum. The crude was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/cyclohexane 20 : 80 (v / v) then 40 : 60 (v / v) and finally 60: 40 (v / v)). The compound **VI.25** was obtained as a colourless oil with 46% yield (0.3 g).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 1.43 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C); 2.99 (d, J = 17.8 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>COOtBu); 3.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>N); 3.25 (d, J = 6.6 Hz, 2H, CHCH<sub>2</sub>Ph); 3.95 (d, J = 17.7 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>COOCH<sub>2</sub>Ph); 4.07-4.16 (m, 3H, NCH<sub>2</sub>COOCH<sub>2</sub> Ph, NCH<sub>2</sub>COOtBu, CHCH<sub>2</sub> Ph); 4.27 (d, J = 14.1 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N); 5.21 (s, 2H, OCH<sub>2</sub> Ph); 5.24 (d, J = 14.6 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N); 7.23-7.41 (m, 10H, Ph). <sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 28.04 (CCH<sub>3</sub>); 35.26 (NCH<sub>3</sub>); 40.19 (CHCH<sub>2</sub>Ph); 50.36 (NCH<sub>2</sub>COOtBu); 51.95 (NCH<sub>2</sub>COOCH<sub>2</sub>Ph); 65.16 (OCH<sub>2</sub>Ph); 67.23 (CHCH<sub>2</sub>Ph); 69.47 (NCH<sub>2</sub>N); 81.94 (CCH<sub>3</sub>); 127.10; 128.68; 129.78; 135.19; 137.10 (Ph); 161.94 (NCON); 168.63 (NCOCH); 169.12 (NCH<sub>2</sub>COOtBu); 169.55 (NCH<sub>2</sub>COOCH<sub>2</sub> Ph). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 7.83 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 30-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [M + Na]<sup>+</sup> = 518.0

**(S)-benzyl 2-(7-benzyl-3-(2-tert-butoxy-2-oxoethyl)-5-methyl-2,6-dioxo-1,3,5-triazepan-1-yl)acetate :**



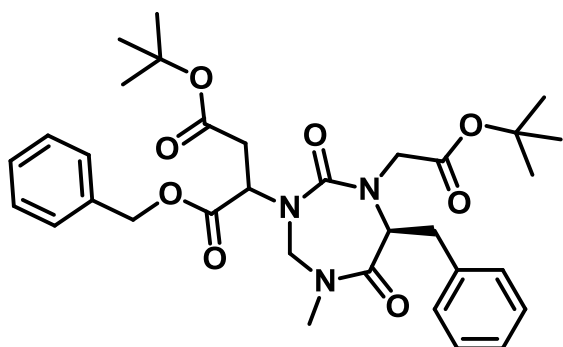


Synthesised using the same procedure as compound **VI.25**.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K),  $\delta$  = 1.51 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ); 3.05 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{N}$ ); 3.16-3.34 (m, 3H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ,  $\text{NCH}_2\text{COOBn}$ ), 3.87 (d,  $J$  = 17.3 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{COOtBu}$ ); 4.03 (d,  $J$  = 17.3 Hz,

$\text{NCH}_2\text{COOtBu}$ ); 4.12-4.28 (m, 3H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ,  $\text{NCH}_2\text{COOCH}_2\text{Ph}$ ,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ); 5.10 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ); 5.15-5.22 (m, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ); 7.24-7.40 (m, 10, Ph).  $^{13}\text{C-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K),  $\delta$  = 28.08 ( $\text{CH}_3\text{C}$ ); 35.18 ( $\text{CH}_3\text{N}$ ); 40.45 ( $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ); 51.32 ( $\text{NCH}_2\text{COOtBu}$ ); 51.37 ( $\text{NCH}_2\text{COOCH}_2\text{Ph}$ ); 65.10 (CH), 67.05 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 69.80 ( $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 82.33 ( $(\text{CH}_3)\text{C}$ ), 127.17, 128.46, 128.63, 128.73, 129.72, 135.28, 137.16 (Ph), 161.19, 168.69, 169.10, 169.58 (CO).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 7.82 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 30-100% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 518.0$

**di-tert-butyl 2-((S)-7-benzyl-3-(2-(benzyloxy)-2-oxoethyl)-5-methyl-2,6-dioxo-1,3,5-triazepan-1-yl)succinate (VI.26)**

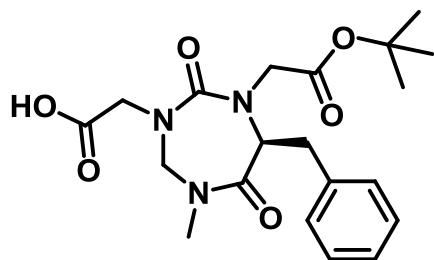


Synthesised using the same procedure as compound **VI.25** but using 2.5 equivalents of LiHMDS and 4 equivalents of tert-butyl bromoacetate. Compound **VI.25** was obtained with 23% yield and compound **VI.26** was obtained with 19% yield. Presence of two diastereoisomers.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K),  $\delta$  = 1.40-1.46 (m, 36 H,  $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ); 2.64 (dd,  $J$  = 10.0, 16.8 Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{COOtBu}$ ), 2.76 (d,  $J$  = 17.9 Hz, 2H,  $\text{NCH}_2\text{COOBn}$ ), 2.87-3.27 (m, 12H,  $\text{NCH}_3$ ,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ,  $\text{CHCH}_2\text{COOtBu}$ ), 3.91 (d,  $J$  = 17.7 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{COOBn}$ ), 4.00-4.08 (m, 3H,  $\text{NCH}_2\text{COOBn}$ ,  $\text{NCHCO}$ ), 4.38 (dd,  $J$  = 8.4, 14.0, 2H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 4.62 (dd,  $J$  = 6.3, 7.4 Hz, 1H,  $\text{NCH}(\text{CH}_2)\text{COOtBu}$ ), 4.96 (dd,  $J$  = 4.4, 10.0 Hz, 1H,  $\text{NCH}(\text{CH}_2)\text{COOtBu}$ ), 5.19 (s, 4H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 5.33 (dd,  $J$  = 14.5, 23.21, 2H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 7.25-7.38 (m, 20H, Ph).  $^{13}\text{C-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298K),  $\delta$  = 26.96, 28.03 ( $\text{CCH}_3$ ), 34.76, 35.14 ( $\text{NCH}_3$ ), 40.56, 41.16 ( $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 52.23, 52.36 ( $\text{NCH}(\text{CH}_2)\text{COOtBu}$ ), 55.96 ( $\text{NCH}_2\text{COOCH}_2\text{Ph}$ ), 59.01, 62.16 ( $\text{NCH}(\text{CH}_2)\text{COOtBu}$ ), 65.19 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 70.15 ( $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 70.41 ( $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 81.65, 81.86, 82.01 ( $\text{CCH}_3$ ), 127.04; 127.15,

128.31, 128.49, 128.64, 128.80, 129.61, 129.88, 135.23, 137.24, 137.47 (Ph), 161.79, 162.81 (NCON), 168.54, 168.61 (NCOCH), 169.07, 169.19 (NCH<sub>2</sub>COOCH<sub>2</sub>Ph), 170.20, 170.91 (NCH<sub>2</sub>COOtBu). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 9.57 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 30-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [M + Na]<sup>+</sup> = 632.1

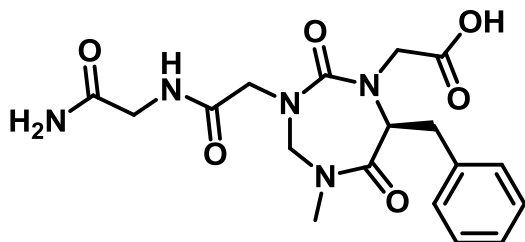
**(S)-2-(7-benzyl-1-(2-tert-butoxy-2-oxoethyl)-5-methyl-2,6-dioxo-1,3,5-triazepan-3-yl) acetic acid (VI.28)**



Under argon, compound **VI.33** (0.3 g, 0.61 mmol) was dissolved in MeOH (15 mL), then Pd/C (10 wt%) (12 mg) was added and the reaction mixture was again placed under hydrogen atmosphere. The reaction was stirred 2 h at room temperature then Pd/C was filtered and MeOH was concentrated under vacuum. Compound **VI.28** was obtained with 72% yield (0.18 g) as a white solid.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 1.45 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.11 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.15 (d, J = 17.7 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>COOtBu), 3.26-3.29 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph). 3.81 (d, J = 17.5 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>COOH), 3.95 (d, J = 17.2 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>COOH). 4.13 (d, J = 17.7. 1H, NCH<sub>2</sub>COOtBu), 4.17-4.22 (m, 1H, CHCH<sub>2</sub>), 4.29 (d, J = 14.3 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 5.18 (d, 1H, 14.3 Hz, NCH<sub>2</sub>N), 7.23-7.38 (m, 5H, Ph). <sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 28.04 (CH<sub>3</sub>), 35.46 (NCH<sub>3</sub>), 39.96 (CH<sub>2</sub>Ph), 50.78 (NCH<sub>2</sub>CO), 51.83 (NCH<sub>2</sub>CO), 64.79 (CH), 69.8017 (NCH<sub>2</sub>N), 82.31 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 127.31, 128.74, 129.81, 136.59 (Ph), 161.64, 168.29, 168.91, 171.56 (CO). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 4.45 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 30-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [M + Na]<sup>+</sup> = 428.

**General procedure to functionalise N,N'-dialkylated triazepane-2,6-dione with an amide functionality exemplified by (S)-2-(3-(2-(2-amino-2-oxoethylamino)-2-oxoethyl)-7-benzyl-5-methyl-2,6-dioxo-1,3,5-triazepan-1-yl)acetic acid (VI.31 A)**

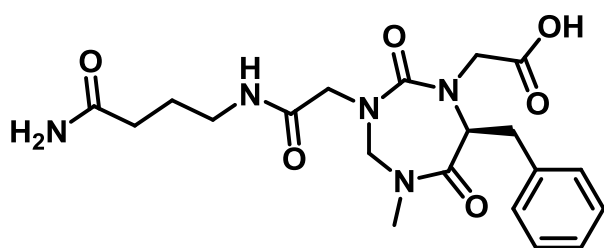


*Sieber* resin (81 mg, 0.05 mmol) was swollen in DMF (1 mL) then 1 ml of a piperidine solution in DMF (1: 4, v/v) was added. The resin was stirred for 20 min at room temperature and then filtered (Fmoc cleavage step was done twice). After

washing the resin with DMF (4 x 2 mL), amino acid Fmoc-Gly-OH (32 mg, 0.11 mmol, 2 eq.) in solution in DMF was added with HOBT (14 mg, 0.11 mmol, 2 eq.) and DIC (16  $\mu$ L, 0.11 mmol, 2 eq.). The resin was stirred for 2 h and then filtered and the coupling step was repeated once under same conditions. Once the coupling was completed, the resin was filtered and washed with DMF (4 x 2 mL). The Fmoc group was removed by a piperidine solution in DMF (1: 4, v/v) (1ml) (x 2). Then compound **VI.28** (28 mg, 0.07 mmol, 1.3 eq.) in solution in DMF (1 mL) with HOBT (14 mg, 0.11 mmol, 2 eq.) and DIC (16  $\mu$ L, 0.11 mmol, 2 eq.) were added and the resin was stirred for 3 h at room temperature. Once the pairing is completed, the resin was filtered and washed with DMF (4 x 2 mL), MeOH (4 x 2 mL), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 x 2 mL) and Et<sub>2</sub>O (4 x 2 mL) then allowed to dry under vacuum. The compound **VI.31 A** was cleaved from the resin with a TFA solution in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1: 4, v/v) (x 10), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and TFA were removed by evaporation and the heterocycle was purified by precipitation in a mixture of Et<sub>2</sub>O/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The product **VI.31 A** was obtained as a white solid with 25% yield (0.01 mmol).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O, 298 K),  $\delta$  = 2.94 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.16 (dd, J = 8.1, 13.9 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 3.32 (dd, J = 6.2, 14 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 3.74 (d, J = 17.9 Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>CO), 3.80-3.86 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3.92-4.03 (m, 3H, NCH<sub>2</sub>), 4.21 (dd, J = 6.3, 7.9 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>Ph), 4.75 (m, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 5.02 (d, J = 15.3 Hz, NCH<sub>2</sub>N), 7.14-7.31 (m, 5H, Ph). <sup>13</sup>C-NMR (300MHz, D<sub>2</sub>O, 298 K),  $\delta$  = 34.90 (NCH<sub>3</sub>), 38.59 (CH<sub>2</sub>Ph), 41.96 (NH<sub>2</sub>COCH<sub>2</sub>NH), 51.12 (NCH<sub>2</sub>COOH), 51.90 (NCH<sub>2</sub>CONH), 63.19 (CH), 69.56 (NCH<sub>2</sub>N), 127.40, 128.77, 129.52, 135.72 (Ph), 161.40, 170.76, 171.91, 173.78, 174.23 (CO). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 4.31 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 10-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [M + H]<sup>+</sup> = 428.1

**(S)-2-(3-(2-(4-amino-4-oxobutylamino)-2-oxoethyl)-7-benzyl-5-methyl-2,6-dioxo-1,3,5-triazepan-1-yl)acetic acid (VI.31 B)**

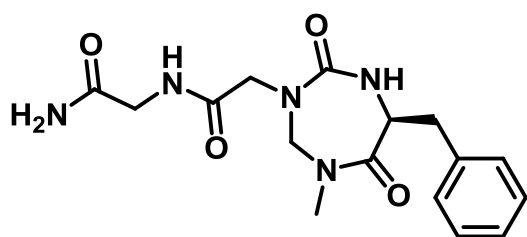


Compound **VI.31 B** was obtained with 79% yield as a white solid.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O, 298 K),  $\delta$  = 1.65-1.74 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.18 (t, J = 7.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 2.94 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.11-3.20 (m, 3H, CH<sub>2</sub>Ph, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 3.32 (dd, J = 6.1, 13.9 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 3.75 (d, J = 17.9 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>CONH), 3.85 (dd, J = 16.9, 27 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>COOH), 4.99 (d, J = 17.9 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>CONH), 4.21 (dd, J = 6.3, 7.9 Hz, 1H, CH), 4.7 (H<sub>2</sub>O + NCH<sub>2</sub>N), 4.98 (d, J = 15.4 Hz, 1H,

NCH<sub>2</sub>N), 7.14-7.31 (m, 5H, Ph). <sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O, 298 K), δ = 25.19 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 32.29 (CH<sub>3</sub>), 33.87 (CH<sub>2</sub>Ph), 38.47 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 39.35 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 50.36 (NCH<sub>2</sub>COOH), 51.55 (NCH<sub>2</sub>CONH), 63.53 (CH), 68.70 (NCH<sub>2</sub>N), 126.76, 128.25, 129.40, 136.82 (Ph), 161.28, 169.96, 171.58, 177.0 (CO). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 4.42 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 10-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [M + H]<sup>+</sup> = 433.8

**(S)-N-(2-amino-2-oxoethyl)-2-(6-benzyl-1-methyl-4,7-dioxo-1,3,5-triazepan-3-yl)acetamide (VI.32 A)**

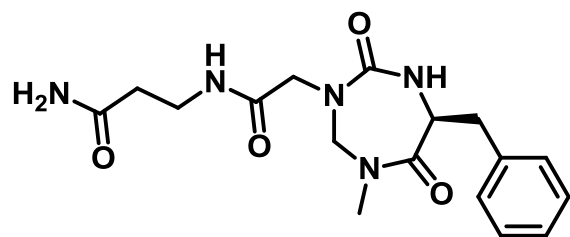


Synthesis of compound **VI.32 A** was identical to the compound **VI 31 A**. During the synthesis, **VI.28** was replaced by the acidic derivative corresponding to **III.30 B**. The compound **VI.32 A** was obtained with 94% yield (16.5 mg) as a white

solid.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO, 298 K), δ = 2.79 (dd, J = 6.8, 14.3 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>Ph), 2.99 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.08 (dd, J = 6.5, 14.0 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>Ph), 3.63 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>), 3.91 (d, J = 16.5 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>CONH), 4.08 (d, J = 16.5 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>CONH), 4.35 (d, J = 15.9 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 4.79 (m, 1H, CHCH<sub>2</sub>Ph), 5.60 (d, J = 15.8 Hz, NCH<sub>2</sub>N), 6.32 (d, J = 3.1 Hz, 1H, NH<sub>2</sub>), 7.1 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 7.18-7.38 (m, 5H, Ph), 8.17 (t, J = 5.7 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>NH). <sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K), δ = 33.21 (NCH<sub>3</sub>), 36.95 (CH<sub>2</sub>Ph), 41.74 (H<sub>2</sub>NCOCH<sub>2</sub>), 52.13 (NCH<sub>2</sub>CONH), 55.31 (NHCHCO), 62.62 (NCH<sub>2</sub>N), 126.55, 128.27, 129.15, 137.03 (Ph), 158.48 (NCON), 170.90 (H<sub>2</sub>NCO), 171.14 (NHCOCH<sub>2</sub>N), 173.08 (NCOCH). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 4.40 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 10-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [M + Na]<sup>+</sup> = 370.2

**(S)-4-(2-(6-benzyl-1-methyl-4,7-dioxo-1,3,5-triazepan-3-yl)acetamido)propanamide (VI.32 B)**



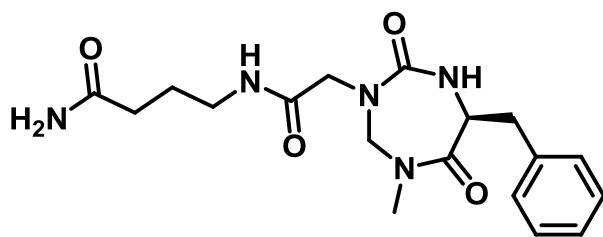
Synthesis of compound **VI.32 B** was identical to the compound **VI 32 A**. The compound **VI.32 B** was obtained with 88% yield (16 mg) as a white solid.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO, 298 K), δ = 2.23 (t, J = 7.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>), 2.79 (dd, J = 6.8, 14.3 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>Ph), 2.98 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.08

(dd,  $J = 6.5, 14.0$  Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ) 3.24 (dd,  $J = 6.9, 13.0$  Hz, 2H,  $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 3.83 (d,  $J = 16.6$  Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{CONH}$ ), 4.05 (d,  $J = 16.5$  Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{CONH}$ ), 4.29 (d,  $J = 15.9$  Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 4.78 (m, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 5.56 (d,  $J = 15.8$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 6.19 (d,  $J = 3.3$  Hz, 1H,  $\text{NH}_2$ ), 6.82 (s, 1H,  $\text{NH}_2$ ), 7.19-7.38 (m, 5H, Ph), 7.89 (t,  $J = 5.5$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 298 K),  $\delta = 33.27$  ( $\text{CH}_3\text{N}$ ), 34.60 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 35.61, 36.99 ( $\text{OCCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 51.81 ( $\text{NCH}_2\text{CONH}$ ), 55.30 ( $\text{NHCHCO}$ ), 62.52 ( $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 126.48, 128.13, 129.11, 133.27 (Ph), 162.69 ( $\text{NCON}$ ), 170.72 ( $\text{H}_2\text{NCO}$ ), 171.19 ( $\text{NHCOCH}_2\text{N}$ ), 179.46 ( $\text{NCOCH}$ ).

$\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R = 4.41$  min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 10-100% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)} : [\text{2M} + \text{Na}]^+ = 745.0$ , Crystallographic data, see Table page 338

**(S)-4-(2-(6-benzyl-1-methyl-4,7-dioxo-1,3,5-triazepan-3-yl)acetamido)butanamide (VI.32 C)**

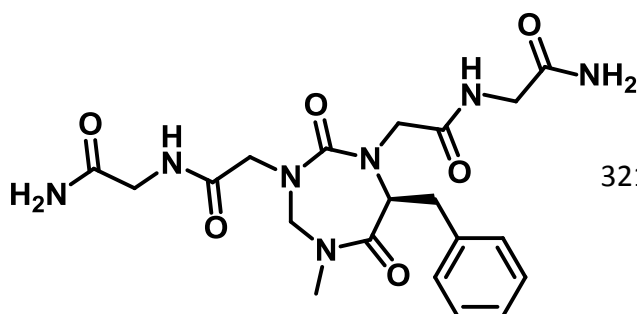


Synthesis of compound **VI.32 C** was identical to the compound **VI 32 A**. The compound **VI.32 C** was obtained with 92% yield (17.3 mg) as a white solid.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, DMSO, 298 K),  $\delta = 1.62$

(m, 2H,  $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ) 2.06 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CONH}_2$ ), 2.79 (dd,  $J = 6.8, 14.3$  Hz, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 2.99-3.12 (m, 6H,  $\text{CH}_3\text{N}$ ,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ,  $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 3.84 (d,  $J = 16.5$  Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{CONH}$ ), 4.06 (d,  $J = 16.5$  Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{CONH}$ ), 4.31 (d,  $J = 15.8$  Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 4.78 (m, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 5.58 (d,  $J = 15.7$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 6.20 (d,  $J = 3.1$  Hz, 1H,  $\text{NH}_2$ ), 6.73 (s, 1H,  $\text{NH}_2$ ), 7.19-7.38 (m, 5H, Ph), 7.86 (t,  $J = 5.5$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K),  $\delta = 30.54$  ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 37.72 ( $\text{NCH}_3$ ), 38.69 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 43.84 ( $\text{H}_2\text{NCOCH}_2$ ), 44.12 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$ ), 57.11 ( $\text{NCH}_2\text{CONH}$ ), 59.44 ( $\text{NHCHCO}$ ), 67.20 ( $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 131.52, 133.41, 134.71, 143.42 (Ph), 161.67 ( $\text{NCON}$ ), 174.26 ( $\text{H}_2\text{NCO}$ ), 175.81 ( $\text{NHCOCH}_2\text{N}$ ), 179.31 ( $\text{NCOCH}$ ).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R = 4.52$  min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 10-100% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)} : [\text{M} + \text{Na}]^+ = 398.3$

**(S)-2,2'-(7-benzyl-5-methyl-2,6-dioxo-1,3,5-triazepane-1,3-diyl)bis(N-(2-amino-2-oxoethyl)acetamide) (VI.34 A)**



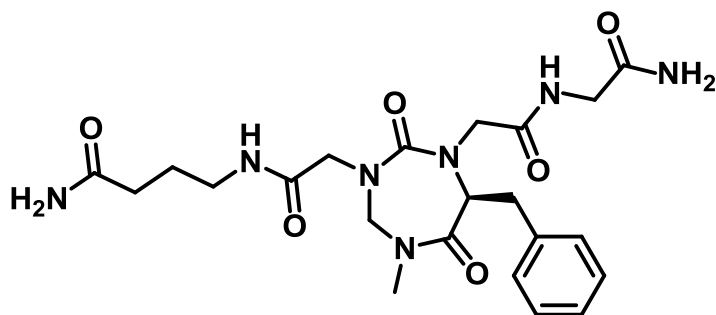
Synthesis of compound **VI.34 A** was identical to the compound **VI 31 A** with

**VI.31 A** as starting material. The compound **VI.34 A** was obtained with 22% yield as a white solid

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 298 K),  $\delta$  = 2.89 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.12 (dd,  $J$  = 8.0, 13.7 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 3.29 (dd,  $J$  = 6.0, 14 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 3.68-3.97 (m, 8H,  $\text{CH}_2$ ), 4.21 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 1H, CH), 4.74 ( $\text{H}_2\text{O}$  +  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 4.95 (d,  $J$  = 15.5 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 7.09-7.25 (m, 10H, Ph), 8.22 (t,  $J$  = 6.1 Hz, 1H, NH), 8.30 (t,  $J$  = 5.8 Hz, 1H, NH).  $^{13}\text{C-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 298 K),  $\delta$  = 34.92 ( $\text{CH}_3$ ), 38.36 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 40.02 ( $\text{NHCH}_2\text{CONH}_2$ ), 41.91 ( $\text{NHCH}_2\text{CONH}_2$ ), 51.81 ( $\text{NCH}_2\text{CONH}$ ), 52.12 ( $\text{NHCH}_2\text{CONH}_2$ ), 63.19 (CH), 68.44 ( $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 127.41, 128.76, 129.53, 135.65 (Ph), 161.45, 170.67, 171.84, 171.92, 174.16, 174.21 (CO).

$\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_{\text{R}}$  = 3.82 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 10-100% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$  :  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 461.8$

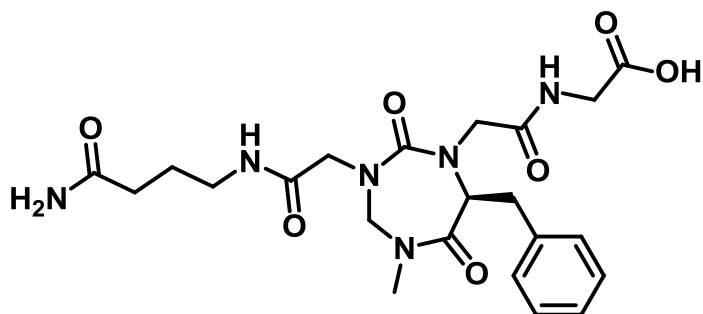
**(S)-4-(2-(1-(2-(2-amino-2-oxoethylamino)-2-oxoethyl)-7-benzyl-5-methyl-2,6-dioxo-1,3,5-triazepan-3-yl)acetamido)butanamide (V.34 B)**



Synthesis of compound **VI.34 B** was identical to the compound **VI.34 A**. The compound **VI.34 B** was obtained with 53% yield as a white solid.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 298 K),  $\delta$  = 1.67-1.74 (m, 2H,  $\text{NH}_2\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 2.18 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 2H,  $\text{NH}_2\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 2.95 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ). 3.11-3.22 (m, 3H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ,  $\text{NH}_2\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 3.33 (dd,  $J$  = 6.4, 14.2 Hz, 1H,  $\text{NH}_2\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ). 3.74-3.92 (m, 5H,  $\text{NHCOCH}_2\text{N}$ ,  $\text{NCH}_2\text{CONH}$ ,  $\text{NHCH}_2\text{COOH}$ ), 4.01 (d,  $J$  = 16.8 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{CONH}$ ), 4.22 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 1H, CH), 4.75 ( $\text{H}_2\text{O}$  +  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 4.96 (d,  $J$  = 15.4 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 7.15-7.31 (Ph).  $^{13}\text{C-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 298 K),  $\delta$  = 25.04 ( $\text{NH}_2\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 32.64 ( $\text{CH}_3$ ), 35.36 ( $\text{NH}_2\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 38.81 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 38.98 ( $\text{NH}_2\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 42.33 ( $\text{NHCH}_2\text{COOH}$ ), 52.28, 52.53 ( $\text{COCH}_2\text{N}$ ), 63.64 (CH), 68.84 ( $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 127.80, 136.11 (Ph), 161.73, 171.09, 171.38, 172.32, 174.61, 179.41 (CO).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_{\text{R}}$  = 3.99 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 10-100% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$   $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 512.1$

**General procedure to functionalise N,N'-dialkylated triazpane-2,6-dione by an acidic function exemplified for (S)-2-(2-(3-(2-(4-amino-4-oxobutylamino)-2-oxoethyl)-7-benzyl-5-methyl-2,6-dioxo-1,3,5-triazepan-1-yl)acetamido)acetic acid (VI.37 A)**



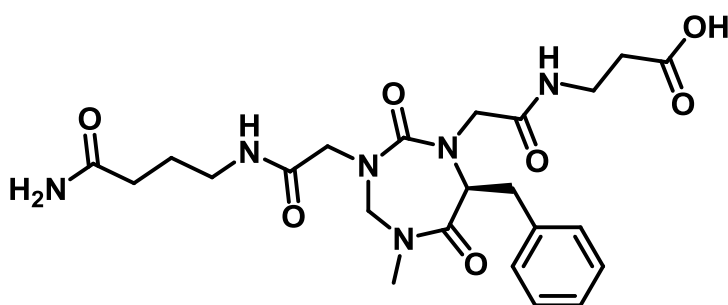
Under argon atmosphere, Fmoc-Gly-OH (84 mg, 0.28 mmol, 10 eq.) was dissolved in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL). The solution was cooled to 0 ° C and DIC (22 μL, 0.14 mmol, 5 eq.) was added and the mixture was stirred

for 30 min at 0 ° C. The CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was removed by concentration and the mixture was diluted in DMF (1 mL) and then added to the Wang resin (L = 0.44 mmol.g<sup>-1</sup>, 64 mg, 0.028 mmol) which had been previously swollen in DMF for 20 min. DMAP (3 mg, 0.003 mmol, 0.1 eq.) was added and the resin was stirred at room temperature for 3 h then filtered and washed with DMF (× 2). The coupling reaction was carried out a second time under same conditions. The Fmoc group was removed by a DBU solution in DMF (2 : 98) (1 mL). After resin filtration and washing with DMF (x 3), a solution of compound **VI.31 B** (16 mg, 0.037 mmol, 1.3 eq.) in DMF (1 mL) was added with BOP (25 mg, 0.057 mmol, 2 eq.) and DIEA (30 μL, 0.170 mmol, 6 eq.). The resin was stirred for 1 h at room temperature before being filtered and washed with DMF (× 3), MeOH (3 x), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x) and Et<sub>2</sub>O (x 3) and dried under vacuum. Cleavage of the resin was performed by TFA/H<sub>2</sub>O/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (95: 2.5: 2.5) solution (2 mL) for 2 h. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the **VI.37 A** was precipitated in cold Et<sub>2</sub>O. The desired compound **VI.37 A** was obtained with 36% yield (5 mg) as a white solid.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O, 298 K), δ = 1.63-1.74 (m, 2H, NH<sub>2</sub>COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 2.18 (t, J = 7.8 Hz, 2H, NH<sub>2</sub>COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 2.94 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.11-3.20 (m, 3H, CH<sub>2</sub>Ph, NH<sub>2</sub>COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 3.33 (dd, J = 6.1, 14.0 Hz, 1H, NH<sub>2</sub>COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 3.74-3.90 (m, 5H, NHCOCH<sub>2</sub>N, NCH<sub>2</sub>CONH, NHCH<sub>2</sub>COOH), 4.03 (d, J = 16.8 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>CONH), 4.22 (t, J = 6.9 Hz, 1H, CH), 4.79 (d, J = 15.3 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 4.91 (d, J = 15.3 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 7.15-7.31 (Ph).

$^{13}\text{C-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 298 K),  $\delta$  = 25.04 ( $\text{NH}_2\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 32.64 ( $\text{CH}_3$ ), 35.36 ( $\text{NH}_2\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 38.80 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 38.98 ( $\text{NH}_2\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 42.33 ( $\text{NHCH}_2\text{COOH}$ ), 52.28, 52.52 ( $\text{COCH}_2\text{N}$ ), 63.64 ( $\text{CH}$ ), 68.84 ( $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 125, 127.80, 136.11 ( $\text{Ph}$ ), 161.74, 171.09, 171.38, 172.32, 174.61, 179.41 ( $\text{CO}$ ).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 4.10 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 10-100% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 490.8$

**(S)-3-(2-(3-(2-(4-amino-4-oxobutylamino)-2-oxoethyl)-7-benzyl-5-methyl-2,6-dioxo-1,3,5-triazepan-1-yl)acetamido)propanoic acid (VI.37 B)**

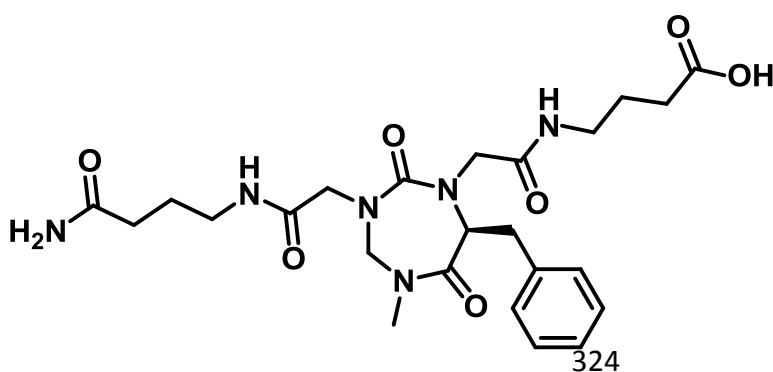


Compound **VI.37 B** was obtained with 44% yield (6 mg) as a white solid.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 298 K),  $\delta$  = 1.65-1.75 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.19 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 2H,

$\text{OCCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 2.48 (t,  $J$  = 6.3 Hz, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ ), 2.95 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.12-3.19 (m, 3H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ,  $\text{OCCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 3.25-3.37 (m, 3H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ ), 3.66 (d,  $J$  = 16.6 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_3\text{CONH}_2$ ), 3.77 (d,  $J$  = 17.0 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$ ), 3.87 (d,  $J$  = 17.0 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$ ), 3.91 (d,  $J$  = 16.6 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_3\text{CONH}_2$ ), 4.18 (t,  $J$  = 6.6 Hz, 1H,  $\text{NCHCO}$ ), 4.78 (d,  $J$  = 15.3 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 4.89 (d,  $J$  = 15.3 Hz, 1H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 7.13-7.31 (m, 5H,  $\text{Ph}$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 298 K),  $\delta$  = 25.06 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 33.92 ( $\text{CH}_3$ ), 33.99 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 35.47 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 38.79, 38.82 ( $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 52.15 ( $\text{NCH}_2\text{CONH}$ ), 63.10 ( $\text{NHCHCO}$ ), 68.75 ( $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 127.83, 129.19, 129.93, 136.26 ( $\text{Ph}$ ), 161.74 ( $\text{NCON}$ ), 171.07 ( $\text{CH}_2\text{CONHCH}_2$ ), 179.43 ( $\text{H}_2\text{NCO}$ ,  $\text{NCOCH}$ ), 179.85 ( $\text{COOH}$ ).  $\text{C}_{18}\text{-HPLC}$   $t_R$  = 4.22 min (A : 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , B : 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 10-100% B, 1 ml/min, 10 min).  $\text{MS(ESI)}$ :  $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 527.2$

**(S)-4-(2-(3-(2-(4-amino-4-oxobutylamino)-2-oxoethyl)-7-benzyl-5-methyl-2,6-dioxo-1,3,5-triazepan-1-yl)acetamido)butanoic acid (VI.37 C)**



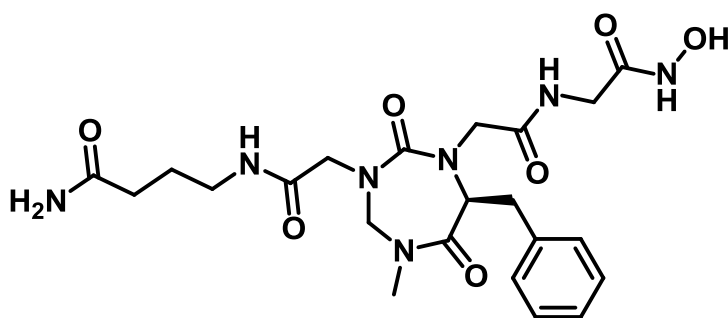
Compound **VI.37 C** was obtained with 50% yield (7 mg) as a white solid.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 298K),  $\delta$  = 1.64-1.74 (m, 4H,



CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.16-2.32 (m, 4H, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.95 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.09-3.21 (m, 5H, CH<sub>2</sub>Ph, OCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 3.31 (dd, J = 6.2, 14.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 3.67 (d, J = 16.6 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CONH<sub>2</sub>), 3.79 (d, J = 17.3 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH), 3.88 (d, J = 17.3 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH), 3.90 (d, J = 16.6 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CONH<sub>2</sub>), 4.19 (t, J = 6.8 Hz, 1H, NCHCO), 4.78 (d, J = 15.2 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 4.93 (d, J = 15.3 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 7.14-7.31 (m, 5H, Ph). <sup>13</sup>C-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O, 298 K), δ = 24.20 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 25.07 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 31.42 (CH<sub>3</sub>), 32.26 (CH<sub>2</sub>Ph), 35.38 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 38.80, 38.98 (NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 52.21, 52.55 (NCH<sub>2</sub>CONH), 66.29 (NHCHCO), 68.87 (NCH<sub>2</sub>N), 127.95, 129.06, 129.92, 136.36 (Ph), 161.69 (NCON), 171.39 (CH<sub>2</sub>CONHCH<sub>2</sub>), 178.61 (H<sub>2</sub>NCO, NCOCH), 179.64 (COOH). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 4.38 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 10-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [M + Na]<sup>+</sup> = 541.2

**Procedure for the synthesis of N,N'-dialkylated triazpane-2,6-dione functionalised by an hydroxamic function (S)-4-(2-(7-benzyl-1-(2-(2-(hydroxyamino)-2-oxoethylamino)-2-oxoethyl)-5-methyl-2,6-dioxo-1,3,5-triazepan-3-yl)acetamido)butanamide (VI.40)**



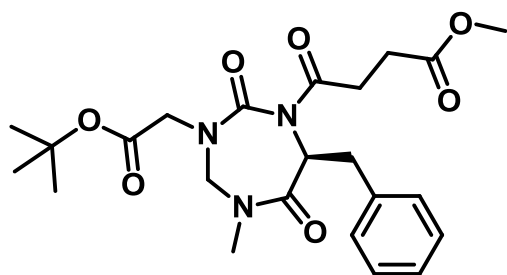
The Fmoc group of the N-Fmoc-2-hydroxyalanine chlorotriyl resin (L = 0.61 mmol.g<sup>-1</sup>, 46 mg, 0.028 mmol) was removed by DBU solution (2%) in DMF (1 mL). Then, Fmoc-Gly-OH (16 mg, 0.06

mmol, 2 eq.) in solution in 1 mL of DMF was added with HOBt (8 mg, 0.06 mmol, 2 eq.) and DIC (9 μL, 0.06 mmol, 2 eq.). The resin was stirred for 2 h and then filtered and the coupling step was repeated once under same conditions. Once the coupling was completed, the resin was filtered and washed with DMF (4 x 2 mL) then Fmoc group was removed by a DBU solution in DMF (2 : 98, v/v) (1mL) (x 2). The compound **VI.31 B** (18 mg, 0.04 mmol, 1.5 eq.) in solution in DMF (1 mL) with HOBt (8 mg, 0.06 mmol, 2 eq.) and DIC (9 μL, 0.06 mmol, 2 eq.) was added then the resin was stirred for 2 h at room temperature. Once the coupling was completed, the resin was filtered and washed with DMF (4 x 2 mL), MeOH (4 x 2 mL), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 x 2 mL) and Et<sub>2</sub>O (4 x 2 mL) then dried under vacuum. The compound **VI.40** was cleaved from the resin with a solution of TFA in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 : 99) (10 x), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and TFA were

removed by evaporation and the heterocycle was purified by precipitation in a mixture Et<sub>2</sub>O/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Compound **VI.40** was obtained as a white solid with 14% yield.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O, 298 K), δ = 2.10-2.30 (m, 2H, NH<sub>2</sub>COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 2.74 (t, J = 7.4 Hz, 2H, NH<sub>2</sub>COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 3.50 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.67-3.79 (m, 3H, CH<sub>2</sub>Ph, NH<sub>2</sub>COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 3.84-3.94 (m, 1H, NH<sub>2</sub>COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 4.28-4.58 (m, 5H, NHCOCH<sub>2</sub>N, NCH<sub>2</sub>CONH, NHCH<sub>2</sub>COOH), 4.75-4.82 (m, 1H, CH), 5.31 (d, J = 15.4 Hz, NCH<sub>2</sub>N), 5.51 (d, J = 15.2 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>N), 7.68-7.88 (Ph). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 3.92 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 10-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [M+Na]<sup>+</sup> = 528.1

**Procedure to synthesize N-alkylated-N'-acetylated 1,3,5-triazepane-2,6-dione : (S)-methyl 4-(7-benzyl-3-(2-tert-butoxy-2-oxoethyl)-5-methyl-2,6-dioxo-1,3,5-triazepan-1-yl)-4-oxobutanoate (VI.41)**



Under inert atmosphere, compound **III.30 B** (0.15 g, 0.43 mmol) was dissolved in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL) then 2,4,6-collidine (0.10 mL, 0.86 mmol, 2 eq.) was added followed by methyl-4-chloro-4-oxobutanoate (0.11 mL, 0.86 mmol, 2 eq.) which was added dropwise. The reaction mixture was stirred 24 h at

40 °C then the reaction was quenched by addition of a NaHCO<sub>3</sub> saturated solution. The organic layer was washed with a solution of KHSO<sub>4</sub> (1M) and with a brine solution then dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced vacuum. The crude was purified by column chromatography on silica gel (MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 : 99, v / v) and (2 : 98, v / v). The desired compound **VI.41** was obtained as a colourless oil with 63% yield (0.13 g).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN, 298 K), δ = 1.50 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 2.42-2.61 (m, 4H, NCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 2.93 (dd, J = 11.1, 14.3 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>Ph), 3.03 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.37 (dd, J = 3.1, 14.4 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>Ph), 3.59 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.07-4.29 (m, 3H, NCH<sub>2</sub>COOtBu, NCH<sub>2</sub>N) 4.47-5.52 (m, 2H, NHCHCO, NHCH<sub>2</sub>N), 7.19-7.33 (m, 5H, Ph). <sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN, 298 K), δ = 28.09 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C), 28.79 (NCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 30.11 (NCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 36.46 (NCH<sub>3</sub>), 39.73 (CHCH<sub>2</sub>Ph), 50.69 (OCH<sub>3</sub>), 51.85 (NCH<sub>2</sub>COOtBu), 58.87 (CHCH<sub>2</sub>Ph), 64.25 (NCH<sub>2</sub>N), 83.20 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C), 126.82, 128.13, 129.84, 136.55 (Ph), 157.61 (NCONH), 167.13 (CH<sub>2</sub>COOtBu), 168.74 (NCOCH), 171.05 (NCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 173.40 (COOCH<sub>3</sub>). C<sub>18</sub>-HPLC t<sub>R</sub> = 7.90 min (A : 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN, 0-100% B, 1 ml/min, 10 min). MS(ESI): [M + Na]<sup>+</sup> = 483.9

- **Procedure for sPLA<sub>2</sub> inhibition tests**

Biological tests were performed by Christine Payre and Gérard Lambeau in Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire in Valbonne (06560).

**Preparation of Recombinant Human sPLA<sub>2</sub>s :**

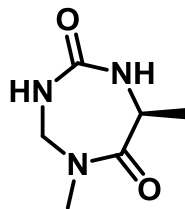
Recombinant hGIB, hGIIA, hGV, and hGX sPLA<sub>2</sub>s were produced in *E. coli*.<sup>11a</sup>

**sPLA<sub>2</sub> Assays for Inhibition Analysis:**

sPLA<sub>2</sub> assays were performed using radiolabeled *E. coli* membranes as substrate as described.<sup>11a, 270</sup> Assays were carried in a final volume of 300  $\mu$ L. The binding buffer was 100 mM Tris, pH 8.0, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1% bovine serum albumin. In these assays, the inhibitors were first preincubated with sPLA<sub>2</sub>s for 10 min in 100  $\mu$ L of binding buffer. Two hundred milliliters of *E. coli* substrate (containing 100,000 dpm of 3H-oleate labeled phospholipids) diluted in binding buffer was then added, and the reaction was continued for 15 min at room temperature. sPLA<sub>2</sub> activity was stopped by addition of 300  $\mu$ L of a solution containing 0.1 M EDTA, pH 8.0, and 1% free fatty acid bovine serum albumin. After centrifugation at 14000g for 3 min, supernatants containing the hydrolyzed phospholipids were collected and counted. The concentrations of human sPLA<sub>2</sub>s were adjusted to ensure hydrolysis rates within the linear range of enzymatic assays.

## Crystallographic data

### Cyclo((L)-Ala-gSar-CO) (A1, B7)



Program(s) used to solve structure: SHELXS97 (Sheldrick, 1990); program(s)

used to refine structure: SHELXL97 (Sheldrick, 1997).

Empirical formula: C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

Molecular weight: 157.17

Temperature: 293 K

Wavelength: 1.54178 Å

Crystal system: Monoclinic

Space group: P2<sub>1</sub>

Unit cell dimensions:	a = 4.165 Å	α = 90°
	b = 7.729 Å	β = 93.09°
	c = 11.442 Å	γ = 90°

Volume: 367.8 Å<sup>3</sup>

Z: 1

Density (calculated): 1.419 Mg.m<sup>-3</sup>

Radiation: Cu Kα

Absorption coefficient: 0.91 mm<sup>-1</sup>

F(000): 168

Theta range for data collection: 6.9° to 72.1°

Index ranges: -5 < h < 5, -8 < k < 7, -14 < l < 14

Reflexion collected: 4173

Independent reflexion: 1242 [Rint = 0.082]

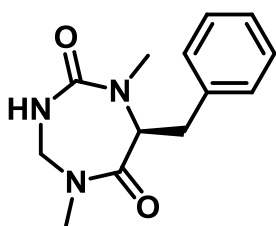
Data / restraints / parameters: 1242 / 1 / 101

Goodness-of-fit on F<sup>2</sup>: 0.96

Final R indices [I > 2σ(I)]: R1 = 0.0780, wR2 = 0.157

R indices (all data): R1 = 0.0953, wR2 = 0.166

Largest diff. peak and hole: 0.46 e Å<sup>-3</sup> and -0.30 e Å<sup>-3</sup>

**Cyclo((N-Me)Phe -gSar-CO) (A1, B16)**Empirical formula : C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

Molecular weight: 247.13

Temperature: 293 K

Wavelength: 1.54178 Å

Crystal system: Orthorhombic

Space group: P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>

Unit cell dimensions: a = 6,632 Å      α = 90°

b = 13,427 Å      β = 90°

c = 14,257 Å      γ = 90°

Volume: 1269.5 Å<sup>3</sup>

Z: 1

Density (calculated): 1.294 Mg.m<sup>-3</sup>

Radiation: Cu Kα

Absorption coefficient: 0.73 mm<sup>-1</sup>

F(000): 528

Theta range for data collection: 6.6° and 71.9°

Index ranges: -7 &lt; h &lt; 4, -9 &lt; k &lt; 15, -16 &lt; l &lt; 16

Reflexion collected: 5081

Independent reflexion: 2226 [Rint = 0.052]

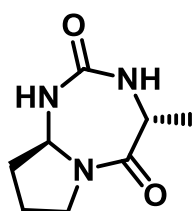
Data / restraints / parameters: 2226 / 0 / 168

Goodness-of-fit on F<sup>2</sup>: 0.90

Final R indices [I &gt; 2σ(I)]: R1 = 0.045, wR2 = 0.093

R indices (all data): R1 = 0.066, wR2 = 0.107

Largest diff. peak and hole: 0.28 e Å<sup>-3</sup> and -0.24 e Å<sup>-3</sup>

**Cyclo((D)Ala -g((L)-Pro)-CO) (A2, B32)**Empirical formula : C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

Molecular weight : 183.21

Temperature: 293 K

Wavelength: 1.54178 Å

Crystal system:

Space group: P1

Unit cell dimensions : a = 6,562(5) Å      α = 90°

b = 9,727(6) Å      β = 90°

c = 13,650(6) Å      γ = 90°

Volume: 871.42 (11) Å<sup>3</sup>

Z: 4

Density (calculated): 1.397 Mg.m<sup>-3</sup>

Radiation: Cu Kα

Absorption coefficient: 0.85 mm<sup>-1</sup>

F(000): 392

Crystal size:

Theta range for data collection: 7.5° to 65.1°

Index ranges: -7 &lt; h &lt; 7, -11 &lt; k &lt; 11, -15 &lt; l &lt; 15

Reflexion collected: 5103

Independent reflexion: 1390 [Rint = 0.055]

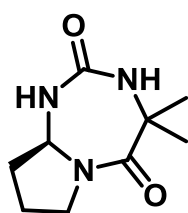
Data / restraints / parameters: 1390 / 0 / 127

Goodness-of-fit on F<sup>2</sup>: 1.22

Final R indices [I &gt; 2σ(I)]: R1 = 0.059, wR2 = 0.123

R indices (all data): R1 = 0.073, wR2 = 0.150

Largest diff. peak and hole: 0.50 e Å<sup>-3</sup> and -0.34 e Å<sup>-3</sup>

**Cyclo(Aib-g((L)-Pro)-CO) (A2, B28)**Empirical formula : C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

Molecular weight : 197.23

Temperature: 293 K

Wavelength: 1.54178 Å

Crystal system: monoclinic

Space group: P2<sub>1</sub>

Unit cell dimensions :	a = 9.165 Å	α = 90°
	b = 10,015 Å	β = 102.4°
	c = 10,896 Å	γ = 90°

Volume: 976.78(6) Å<sup>3</sup>

Z: 2

Density (calculated): 1.341 Mg.m<sup>-3</sup>

Radiation: Cu Kα

Absorption coefficient: 0.797 mm<sup>-1</sup>

F(000): 424

Theta range for data collection: 5.735 to 64.993°

Index ranges: -9 &lt; h &lt; 10, -11 &lt; k &lt; 11, -12 &lt; l &lt; 12

Reflexion collected: 11974

Independent reflexion: 1612 [R(int) = 0.1503]

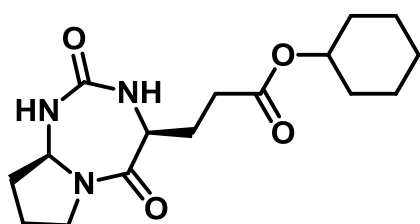
Data / restraints / parameters: 1612 / 0 / 128

Goodness-of-fit on F<sup>2</sup>: 1.327

Final R indices [I&gt;2sigma(I)]: R1 = 0.1202, wR2 = 0.3047

R indices (all data): R1 = 0.1716, wR2 = 0.3603

Largest diff. peak and hole: 0.677 and -0.569 e.Å<sup>-3</sup>

**cyclo(Glu(OcHx)-g((L)-Pro)-CO) (A2, B6)**Empirical formula : C<sub>16</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

Molecular weight : 323.39

Temperature: 293 K

Wavelength: 1.54178 Å

Crystal system: monoclinic

Space group: P2<sub>1</sub>

Unit cell dimensions:

a = 7.112 Å	α = 90°
b = 7.224(5) Å	β = 102.17°
c = 16.343(4) Å	γ = 90°

Volume: 820.9 (3) Å<sup>3</sup>

Z: 2

Density (calculated): 1.308 Mg.m<sup>-3</sup>

Radiation: Cu Kα

Absorption coefficient: 0.78 mm<sup>-1</sup>

F(000): 348

Theta range for data collection: 6.7° to 72.1°

Index ranges: -8 &lt; h &lt; 5, -7 &lt; k &lt; 4, -19 &lt; l &lt; 18

Reflexion collected: 1805

Independent reflexion: 1465 [Rint = 0.045]

Data / restraints / parameters: 1465 / 1 / 209

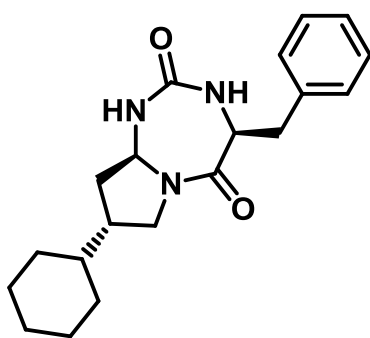
Goodness-of-fit on F<sup>2</sup>: 0.83

Final R indices [I &gt; 2σ(I)]: R1 = 0.083, wR2 = 0.183

R indices (all data): R1 = 0.165, wR2 = 0.255

Largest diff. peak and hole: 0.45 e Å<sup>-3</sup> and -0.29 e Å<sup>-3</sup>



**cyclo(Phe-g((L)-(4-(S)-cyclohexyl)Pro)-CO) (A4, B1)**Empirical formula : C<sub>20</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

Molecular weight : 341.45

Temperature: 293 K

Wavelength: 1.54178 Å

Crystal system: monoclinic

Space group: P1

Unit cell dimensions:	a = 25.466 Å	α = 90°
	b = 13.16 Å	β = 92.44°
	c = 6.988 Å	γ = 90°

Volume: 2339.8(8) Å<sup>3</sup>

Z: 4

Density (calculated): 1.222 Mg.m<sup>-3</sup>

Radiation: Cu Kα

Absorption coefficient: 0.720 mm<sup>-1</sup>

F(000): 920

Theta range for data collection: 6.72° to 71.85°

Index ranges: -31 &lt; h &lt; 31, -11 &lt; k &lt; 14, -8 &lt; l &lt; 8

Reflexion collected: 16542

Independent reflexion: 3861 [Rint = 0.043]

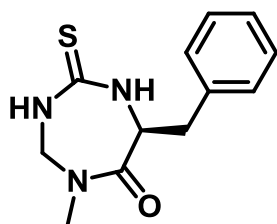
Data / restraints / parameters: 3861 / 7 / 295

Goodness-of-fit on F<sup>2</sup>: 1.12

Final R indices [I &gt; 2σ(I)]: R1 = 0.063, wR2 = 0.145

R indices (all data): R1 = 0.073, wR2 = 0.145

Largest diff. peak and hole: 0.41 e Å<sup>-3</sup> and -0.38 e Å<sup>-3</sup>

**cyclo(Phe-gSar-CS) (IV.1)**Empirical formula : C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>OS

Molecular weight : 249.33

Temperature: 293 K

Wavelength: 1.54178 Å

Crystal system: Orthorhombic

Space group: P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>

Unit cell dimensions: a = 8,723(2) Å      α = 90°

b = 14,426 Å      β = 90°

c = 28,938 Å      γ = 90°

Volume: 3641.6 (7) Å<sup>3</sup>

Z: 4

Density (calculated): 1.364 Mg.m<sup>-3</sup>

Radiation: Cu Kα

Absorption coefficient: 2.27 mm<sup>-1</sup>

F(000): 1584

Theta range for data collection: 6.7° to 71.9°

Index ranges: -5 &lt; h &lt; 10, -9 &lt; k &lt; 16, -34 &lt; l &lt; 25

Reflexion collected: 9381

Independent reflexion: 5019 [Rint = 0.037]

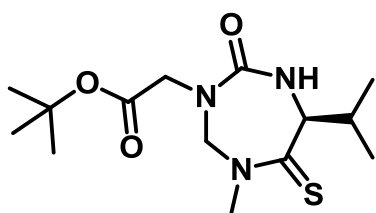
Data / restraints / parameters: 5019 / 0 / 461

Goodness-of-fit on F<sup>2</sup>: 0.71

Final R indices [I &gt; 2σ(I)]: R1 = 0.049, wR2 = 0.129

R indices (all data): R1 = 0.054, wR2 = 0.140

Largest diff. peak and hole: 0.58 e Å<sup>-3</sup> and 0.58 e Å<sup>-3</sup>

**(S)-tert-butyl 2-(6-isopropyl-1-methyl-4-oxo-7-thioxo-1,3,5-triazepan-3-yl)acetate (IV.32)**Empirical formula : C<sub>14</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S

Molecular weight : 315.43

Temperature: 293 K

Wavelength: 1.54178 Å

Space group: P1

Unit cell dimensions:      a = 5,412(1) Å      α = 96.27°  
                                          b = 10,318(8) Å      β = 93.9°  
                                          c = 15,501 Å      γ = 101.19°

Volume: 840.6 (2) Å<sup>3</sup>

Z: 2

Density (calculated): 1.238 Mg.m<sup>-3</sup>

Radiation: Cu Kα

Absorption coefficient: 1.83 mm<sup>-1</sup>

F(000): 336

Theta range for data collection: 2.9° to 72.1°

Index ranges: -5 &lt; h &lt; 4, -12 &lt; k &lt; 12, -19 &lt; l &lt; 18

Reflexion collected: 5544

Independent reflexion: 2226 [Rint = 0.236]

Data / restraints / parameters: 2226 / 0 / 191

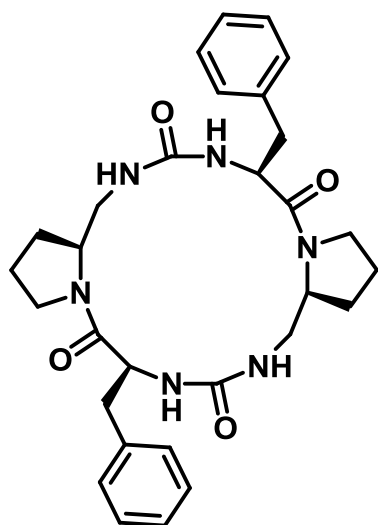
Goodness-of-fit on F<sup>2</sup>: 1.46

Final R indices [I &gt; 2σ(I)]: R1 = 0.175, wR2 = 0.445

R indices (all data): R1 = 0.214, wR2 = 0.501

Largest diff. peak and hole: 0.64 e Å<sup>-3</sup> and -0.64 e Å<sup>-3</sup>

**6S,10aS,16S,20aS)-6,16-dibenzyltetradecahydrodipyrrolo[2,1-e:2',1'-  
m][1,3,6,9,11,14]hexaazacyclohexadecine-5,8,15,18(1H,19H)-tetraone (V.8 A)**



Empirical formula :  $C_{30}H_{38}N_6O_4$

Molecular weight : 546.66

Temperature: 293 K

Wavelength: 1.54178 Å

Crystal system: Triclinic

Space group: P1

Unit cell dimensions:  $a = 14.900(3)$  Å  $\alpha = 88.09^\circ$

$b = 15.020(6)$  Å  $\beta = 73.96^\circ$

$c = 15.409(8)$  Å  $\gamma = 77.22^\circ$

Volume:  $3202.4(7)$  Å<sup>3</sup>

Z: 4

Density (calculated):  $1.104$  Mg.m<sup>-3</sup>

Radiation: Cu K $\alpha$

Absorption coefficient:  $0.64$  mm<sup>-1</sup>

F(000): 1064

Theta range for data collection:  $6.5^\circ$  to  $72.0^\circ$

Index ranges:  $-18 < h < 18$ ,  $-18 < k < 18$ ,  $-17 < l < 14$

Reflexion collected: 45523

Independent reflexion: 19898 [Rint = 0.084]

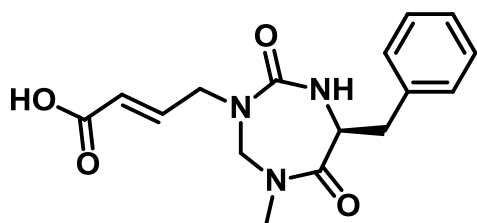
Data / restraints / parameters: 19898 / 4 / 1570

Goodness-of-fit on F<sup>2</sup>: 0.99

Final R indices [ $I > 2\sigma(I)$ ]: R1 = 0.098, wR2 = 0.223

R indices (all data): R1 = 0.193, wR2 = 0.281

Largest diff. peak and hole:  $0.55$  e Å<sup>-3</sup> and  $-0.28$  e Å<sup>-3</sup>

**(S,E)-4-(6-benzyl-1-methyl-4,7-dioxo-1,3,5-triazepan-3-yl)but-2-enoic acid (VI.6)**Empirical formula : C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

Molecular weight : 317.3

Temperature: 100K

Wavelength: 1.54178 Å

Crystal system: orthorhombic

Space group: P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>

Unit cell dimensions: a = 5.6572(4) Å      α = 90°

b = 12.8106(9) Å      β = 90°

c = 21.7721(16)Å      γ = 90°

Volume: 1577.9(2) Å<sup>3</sup>

Z: 4

Density (calculated): 1.146 Mg.m<sup>-3</sup>

Radiation: Cu Kα

Absorption coefficient: 0.74 mm<sup>-1</sup>

F(000): 544

Theta range for data collection: not mentioned

Index ranges: - 5 &lt; h &lt; 5, -11 &lt; k &lt; 12, -20 &lt; l &lt; 16

Reflexion collected: 11041

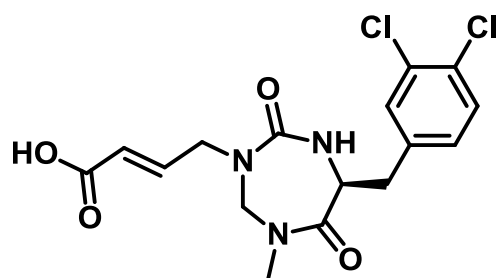
Independent reflexion: 1600 [Rint = 0.0596]

Data / restraints / parameters: 1600 / 0 / 210

Goodness-of-fit on F<sup>2</sup>: 1.060

Final R indices [I&gt;2sigma(I)]: R1 = 0.0385 , wR2 = 0.0764

R indices (all data): R1 = 0.0596, wR2 = 0.0826

**(S,E)-4-(6-(3,4-dichlorobenzyl)-1-methyl-4,7-dioxo-1,3,5-triazepan-3-yl)but-2-enoic acid****(VI.16)**Empirical formula : C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

Molecular weight : 386.2

Temperature: 566 K

Wavelength: 1.54178 Å

Crystal system: orthorhombic

Space group: P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>

Unit cell dimensions: a = 5.7924(0) Å α = 90°

b = 13.6272(3) Å β = 90°

c = 22.1186(16) Å γ = 90°

Volume: 1745.91(14) Å<sup>3</sup>

Z: 4

Density (calculated): 1.469 Mg.m<sup>-3</sup>

Radiation: Cu Kα

Absorption coefficient: 3.589 mm<sup>-1</sup>

F(000): 800

Theta range for data collection: 6.799 to 68.237°

Index ranges: - 6 &lt; h &lt; 5, -16 &lt; k &lt; 15, -22 &lt; l &lt; 26

Reflexion collected: 13634

Independent reflexion: 3109 [R(int) = 0.0252]

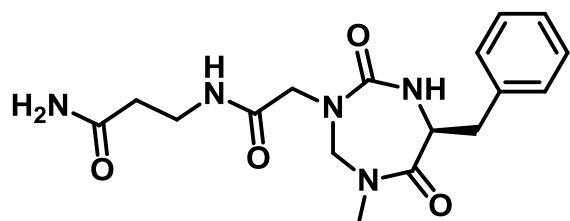
Data / restraints / parameters: 3109 / 0 / 227

Goodness-of-fit on F<sup>2</sup>: 1.061

Final R indices [I&gt;2sigma(I)]: R1 = 0.0449, wR2 = 0.1210

R indices (all data): R1 = 0.0875, wR2 = 0.1801

Largest diff. peak and hole: 0.340 e.Å<sup>-3</sup> and -0.449 e.Å<sup>-3</sup>

**(S)-4-(2-(6-benzyl-1-methyl-4,7-dioxo-1,3,5-triazepan-3-yl)acetamido)propanamide (VI.32)****B)**Empirical formula : C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>

Molecular weight : 361.4

Temperature: 566 K

Wavelength: 1.54178 Å

Crystal system: monoclinic

Space group: P2<sub>1</sub>

Unit cell dimensions: a = 9.3405(4) Å      α = 90°

b = 9.2618(4) Å      β = 97.919(7)°

c = 10.5633(7) Å      γ = 90°

Volume: 905.12(8) Å<sup>3</sup>

Z: 2

Density (calculated): 1.326 Mg.m<sup>-3</sup>

Radiation: Cu Kα

Absorption coefficient: 0.801 mm<sup>-1</sup>

F(000): 384

Theta range for data collection: 6.764 to 68.229°

Index ranges: - 6 &lt; h &lt; 11, -10 &lt; k &lt; 11, -12 &lt; l &lt; 12

Reflexion collected: 7425

Independent reflexion: 2882 [R(int) = 0.0231]

Data / restraints / parameters: 2882 / 1 / 238

Goodness-of-fit on F<sup>2</sup>: 1.163

Final R indices [I&gt;2sigma(I)]: R1 = 0.0432, wR2 = 0.0878

R indices (all data): R1 = 0.0938, wR2 = 0.1377

Largest diff. peak and hole: 0.254 e.Å<sup>-3</sup> and -0.330 e.Å<sup>-3</sup>

1. Singer, A. G.; Ghomashchi, F.; Le Calvez, C.; Bollinger, J.; Bezzine, S.; Rouault, M.; Sadilek, M.; Nguyen, E.; Lazdunski, M.; Lambeau, G.; Gelb, M. H., *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 48535-48549.
2. Ancian, P.; Lambeau, G.; Lazdunski, M., *Biochemistry* **1995**, *34* (40), 13146-13151.

Le squelette 1,3,5-triazépane-2,6-dione est un hétérocycle à sept chaînons dérivé de dipeptides et accessible en quatre étapes en solution. Une voie de synthèse en parallèle sur support solide de cet hétérocycle a été élaborée. Cette synthèse, qui repose sur les principes de "catch and release" et de cyclo-clivage, a permis la création d'une chimiothèque de plus d'une centaine de composés. Pour augmenter la diversité du squelette 1,3,5-triazépane-2,6-dione, des modifications post-cyclisation peuvent avoir lieu telles que des réactions de N-mono-alkylation ou de N,N-di-alkylation de l'urée, des réactions d'acylation ou bien des réactions de thionation des fonctions carbonyles. De même, la synthèse des cycles analogues aux 1,3,5-triazépane-2,6-diones des tailles plus importantes a été examinée conduisant à l'obtention de plusieurs macrocycles.

Les 1,3,5-triazépane-2,6-diones présentent un fort potentiel pour la recherche de molécules d'intérêt thérapeutique puisque le cycle est rigide, non-planaire et possède une bonne capacité de distribution des pharmacophores dans l'espace. Des molécules de cette famille présentent une activité inhibitrice modérée mais spécifique sur les phospholipases A<sub>2</sub> sécrétées humaines de type V et X. La recherche de nouveaux inhibiteurs de sPLA<sub>2</sub> par une étude de relation structure/activité, par création d'une pince à calcium ou par simulation moléculaire a conduit à l'identification de nouveaux composés actifs.

Mots clés : hétérocycle, dipeptide, chimiothèque, urée, synthèse en parallèle, synthèse sur support solide, thiourée, macrocycles, phospholipases A<sub>2</sub> sécrétées.

The 1,3,5-triazepane-2,6-dione scaffold is a seven membered heterocycle derived from dipeptides and accessible in a four steps synthesis in solution. A parallel solid phase synthesis of this heterocycle was developed. This strategy, based on "catch and release" and cyclo-cleavage processes, had created a library containing more than one hundred compounds. To increase the diversity of 1,3,5-triazepane-2,6-dione moieties, some post-cyclisation modifications were performed, e.g. urea N-mono-alkylation or N,N-di-alkylation, acylation, and carbonyl thionation. Synthesis of larger cycles was also investigated and several macrocycles were obtained.

The 1,3,5-triazepane-2,6-diones have a strong pharmacological interest, because their cycle is rigid, non-planar and can allow multiple presentation of pharmacophores in space. Some 1,3,5-triazepane-2,6-diones have shown a small but specific activity on the groups V and X of the human secreted phospholipases A<sub>2</sub>. Structure/activity relationships, clamp synthesis to bind calcium or virtual screening were the strategies used to identify new active compounds.

Key words : heterocycle, dipeptide, library, urea, parallel synthesis, synthesis on solid support, thiourea, macrocycles, secreted phospholipase A<sub>2</sub>.