



# **Application de la réaction multicomposante de Ugi à la synthèse de peptides complexes**

**Mémoire**

**Steve Jobin**

**Maîtrise en sciences pharmaceutiques**  
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

© Steve Jobin, 2017

# **Application de la réaction multicomposante de Ugi à la synthèse de peptides complexes**

**Mémoire**

**Steve Jobin**

Sous la direction de :

Éric Biron, directeur de recherche

# RÉSUMÉ

Les oligopeptides et les mini-protéines sont des outils moléculaires très utiles en biochimie et pour le développement de nouveaux médicaments. Leur utilisation comme agents thérapeutiques est très attrayante, car ce type de biomolécules possède plusieurs caractéristiques avantageuses recherchées comme une forte activité et une haute spécificité pour la cible, ainsi qu'une faible toxicité. La préparation de ces composés s'effectue majoritairement par voie chimique et est généralement efficace. Toutefois, certaines structures peptidiques plus complexes demeurent difficiles à synthétiser par les stratégies classiques, rendant pertinente la recherche de nouvelles méthodes de synthèse.

Dans le cadre de ce mémoire, la réaction multicomposante de Ugi a été ciblée comme ayant le potentiel de générer efficacement des structures peptidiques inédites. L'objectif du projet était de développer et d'appliquer une approche par réaction multicomposante de Ugi sur support solide pour la synthèse de peptides complexes et macrocycliques.

Dans un premier temps, la réaction de Ugi a été appliquée dans un contexte de couplage de fragments peptidiques. Cette méthode a ensuite permis la synthèse de peptides allant jusqu'à 30 acides aminés, démontrant ainsi son efficacité en tant qu'alternative intéressante dans la synthèse de longs peptides.

Par la suite, la réaction de Ugi a été utilisée pour simultanément lier et ancrer deux acides aminés à un support solide via leur squelette peptidique. L'objectif de cette approche était de synthétiser des peptides cycliques. La méthode montre que l'approche par réaction multicomposante de Ugi a permis la synthèse de composés mono- et bicycliques avec une importante économie de temps et de réactifs.

En résumé, la réaction de Ugi a été employée avec succès pour développer de nouvelles méthodes permettant la synthèse de peptides complexes. Les approches développées ont le potentiel de donner accès à des structures jusqu'alors difficilement atteignables afin d'exploiter l'immense diversité moléculaire accessible avec ce type de biomolécules.



## ABSTRACT

Oligopeptides and small proteins are useful tools in biochemistry and for molecular development of new therapeutic agents. Their use offers many advantages over small molecules, including a low toxicity and a strong binding on a particular target. Synthesis of such compounds mainly passes through a chemical pathway and works generally quite well. However, some complex peptide's structures cannot yet be accessed with existing methods, which makes place for the development of new synthesis strategies.

The main goal of this work that I did during my two master's years was to find new synthesis ways to access complex peptidic structures and take advantage of all the chemical diversity available with this class of biomolecules. To do so, Ugi multicomponent reaction on solid support was targeted as a useful chemical tool that could help us to achieve the synthesis of new complex and macrocyclic peptides.

First, this reaction was applied in a solid supported fragment coupling approach to access long peptides. This strategy does not require any prereactional modification of the building blocks, nor needing specific amino acids and does not exhibit any sign of epimerization at the ligation site. These characteristics make this method very interesting as an alternative synthetic method for long peptides production.

The Ugi reaction was then used to form, in a one-pot fashion, an amide bond between two amino acids while creating another bond with a solid supported aldehyde acting as a linker. The main goal of this new approach is to allow the synthesis of head-to-tail cyclic peptides on solid-support. This method was applied to the synthesis of linear, cyclic and bicyclic peptides which would be useful in the development of new therapeutics.

In conclusion, the Ugi multicomponent reaction was used for the synthesis of complex peptides. The developed methodologies allow synthesising new peptides that are unavailable up to now by chemical synthesis and that could exhibit some bioactive properties.

*“Always think like a proton : be positive”*

# TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>V</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>XI</b>
<b>ABBRÉVIATIONS</b> .....	<b>XV</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>XIX</b>
<b>AVANT-PROPOS</b> .....	<b>XXI</b>
<b>CHAPITRE 1</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
1.1 Les peptides : une classe unique d'agents thérapeutiques .....	3
1.2 Production des peptides .....	6
1.2.1 Protéines recombinantes .....	6
1.2.2 Synthèse chimique .....	7
1.2.3 Couplage de fragments .....	15
1.2.4 Synthèse de peptides cycliques .....	21
1.3 Réaction multicomposante de Ugi.....	24
<b>CHAPITRE 2</b> .....	<b>31</b>
<b>HYPOTHÈSE DE TRAVAIL ET OBJECTIFS</b> .....	<b>31</b>
2.1 Hypothèses de travail.....	33
2.2 Objectifs .....	34
<b>CHAPITRE 3</b> .....	<b>37</b>
<b>UTILISATION DE LA RÉACTION DE UGI DANS LE DESIGN ET LE DÉVELOPPEMENT D'UNE NOUVELLE MÉTHODE DE COUPLAGE DE FRAGMENTS PEPTIDIQUES</b> .....	<b>37</b>
Avant-propos.....	38
Résumé.....	39
Toward solid-phase peptide fragment ligation by a traceless-Ugi multicomponent approach ...	40
Supporting information.....	59

<b>CHAPITRE 4</b> .....	<b>87</b>
<b>SYNTHÈSE DE MACROCYCLES PEPTIDIQUES SUR SUPPORT SOLIDE PAR ANCRAGE DU SQUELETTE PEPTIDIQUE PAR RÉACTION DE UGI</b> .....	<b>87</b>
<b>AVANT-PROPOS</b> .....	<b>89</b>
Résumé.....	90
Solid-phase synthesis of macrocyclic peptides by backbone anchoring using a traceless Ugi multicomponent approach.....	91
Supporting information.....	103
Figure S2. NMR <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C spectras. ....	104
Figure S2. NMR <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C spectras. ....	129
<b>CHAPITRE 5</b> .....	<b>133</b>
<b>DISCUSSION ET CONCLUSION</b> .....	<b>133</b>
5.1 Discussion générale.....	135
5.2 Conclusion .....	139
<b>RÉFÉRENCES</b> .....	<b>141</b>



# LISTE DES TABLEAUX

## Chapitre 1

**Tableau 1.** Agonistes du GLP-1 présentement commercialisés ou en phase clinique. (p.4)

**Tableau 2.** Types d'ancrages les plus utilisés en synthèse peptidique et leurs conditions de clivage respectives. (p.10)

**Tableau 3.** Résumé des forces et faiblesses des techniques de liaisons de fragments présentées. (p.20)

## Chapitre 3

**Table 1.** Selection of optimal solvent for the on-resin Ugi-4CR. (p.50)

**Table 2.** Selection of the optimal reaction conditions for the on-resin Ugi-4CR in the synthesis of peptide **6**. (p.51)

**Table 3.** Crude purities and isolated yields for peptides prepared by solid-phase traceless-Ugi-4CR. (p.52)

**Table S1.** Selection of the optimal aldehyde and deprotection conditions for the synthesis of peptide **6**. (p.69)

**Table S2.** Evaluation of different Rink Amide resins for the synthesis of peptide **6**. (p.70)

**Table S3.** Calculated and observed mass for peptides **6-14**. (p.70)

**Table S4.** Crude purity and isolated yield for peptides **6-14**. (p.71)

## Chapitre 4

**Table 1.** Selection of the optimal reaction conditions for backbone anchoring by Ugi-4CR. (p.102)

**Table 2.** Crude purities and isolated yields for peptides prepared by Ugi-4CR backbone anchoring. (p.103)

**Table 3.** Crude purities and purified yields for linear (**7a-13a**), cyclic (**7b-13b**) and bicyclic (**9c-13c**) oligomers. (p.106)



# LISTE DES FIGURES

## Chapitre 1

**Figure 1.** Répartition de 108 médicaments à base de peptides commercialisés selon leur structure chimique et leur voie d'administration (**A**) et selon le nombre d'acides aminés de leur séquence primaire (**B**). (p.3)

**Figure 2.** Schéma de la synthèse peptidique sur support solide. GP = Groupement protecteur. (p.8)

**Figure 3.** Principales stratégies de protection orthogonale de la synthèse peptidique. L'approche Boc/Bzl (**A**) et l'approche Fmoc/tBu (**B**) sont les deux principales méthodes. (p.11)

**Figure 4.** Principaux agents déshydratants utilisés en synthèse peptidique. (p.12)

**Figure 5.** Mécanisme d'épimérisation en synthèse peptidique via la formation d'oxazolone. (p.12)

**Figure 6.** Mécanisme de la formation d'un lien peptidique via l'utilisation d'un réactif hybride, le HATU. (p.13)

**Figure 7.** Schéma de la synthèse peptidique sur support solide utilisé dans le cadre de ce mémoire. (p.14)

**Figure 8.** Schéma général du concept de synthèse convergente par couplage de fragments peptidiques. (p.15)

**Figure 9.** Mécanisme réactionnel de la NCL. (p.16)

**Figure 10.** Mécanisme réactionnel de la liaison de Staudinger. (p.17)

**Figure 11.** Schéma du couplage de fragments peptidiques par l'entremise d'isonitrile. (p.18)

**Figure 12.** Autres méthodes de couplage de fragments peptidiques via des  $\alpha$ -cétoacides hydroxylamine (KAHA) (**A**) des esters de salicylaldehydes (SAL) (**B**) et des ynamides (**C**). (p.19)

**Figure 13.** Façons de cycliser un peptide : tête-à-queue (**A**), tête-à-chaîne-latérale (**B**), chaîne-latérale-à-queue (**C**), et chaîne-latérale-à-chaîne-latérale (**D**). (p.21)

**Figure 14.** Stratégies d'ancrage sur un support solide pour la synthèse de peptides cycliques via les chaînes latérales (**A**) et le squelette peptidique (**B**). (p.23)

**Figure 15.** Comparatif entre synthèse séquentielle et synthèse par voie multicomposante. (p.24)

**Figure 16.** Mécanisme de la réaction multicomposante de Ugi (U-4CR). (p.25)

**Figure 17.** Applications de la U-4CR à la synthèse peptidique : Travaux d'Arabianian (2008) (**A**), travaux de Wessjohann (2016) (**B**) et travaux de Waki (1977) (**C**). (p.26)

**Figure 18.** Orientation des dipôles selon le champ magnétique induit. Représentation des dipôles sans contraintes (**A**), dans un champ électrique continu (**B**), et dans un champ électrique alternatif à haute fréquence (**C**). (p.28)

## **Chapitre 2**

**Figure 1.** Hypothèse mécanistique de déprotection du squelette amide post-U-4CR. (p.33)

**Figure 2.** Approche proposée pour lier deux fragments peptidiques par U-4CR. (p.34)

**Figure 3.** Approche proposée pour ancrer deux acides aminés sur un support solide par U-4CR. (p.35)

## **Chapitre 3**

**Scheme 1.** Peptide bond formation by a sequential Ugi-4CR and *N*-substituent cleavage described by Waki and Meinhofer. (p.46)

**Scheme 2.** Synthesis of model peptide fragments and solid-phase traceless Ugi-4CR ligation. (p.47)

**Figure 1.** HPLC and MS profiles of crude products after cleavage from resin and deprotection showing Ugi-4CR product **5c** and final peptide **6**. (**A**) After Fmoc removal on **4c** and treatment with TFA for 1 h. (**B**) After treatment of **5c** with TFA under MW heating at 60 °C for 45 min ( $\lambda = 220$  nm). (p.49)

**Figure 2.** (**A**) Synthesis of peptide **16** by coupling *N*-terminal fragment **15a** or **b** to peptide **1** and cleavage from resin and deprotection. (**B**) Enlarged HPLC traces ( $\lambda = 220$  nm) from 7.6 to 8.1 min of products obtained after Ugi-4CR with **15a** (top); Ugi-4CR with **15b** (middle) and coupling of **15a** with DIC/6-Cl-HOBt (bottom). (p.53)

**Figure S1.** HPLC profiles ( $\lambda = 220$  nm) and ESI-MS spectra of C-terminal fragments. (p.72)

**Figure S2.** HPLC profiles ( $\lambda = 220$  nm) and ESI-MS spectra of N-terminal fragments. (p.73)

**Figure S3.** HPLC profile ( $\lambda=220$  nm) and ESI-MS spectra of backbone amide protected peptide **5a**. (p.75)

**Figure S4.** HPLC profile ( $\lambda = 220$  nm) and ESI-MS spectra of backbone amide protected peptide **5b**. (p.76)

**Figure S5.** HPLC profile ( $\lambda = 220$  nm) and ESI-MS spectra of backbone amide protected peptide **5c**. (p.77)

**Figure S6.** HPLC-MS profiles ( $\lambda = 220$  nm) and HRMS spectra for peptides **6-14**. (p.79)

**Figure S7.** HPLC profiles ( $\lambda = 220$  nm) and ESI-MS spectra of peptides **16a** and **16b**. (p.90)

#### **Chapitre 4**

**Scheme 1.** Solid-phase traceless-Ugi-4CR ligation and backbone anchoring. (p.100)

**Figure S1.** HPLC profiles ( $\lambda = 220$  nm) and ESI-HRMS spectra. (p.120)

**Figure S2.** NMR  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  spectra. (p.135)



# ABBREVIATIONS

## Produits chimiques et solvants

<b>6-Cl HOBt</b>	6-Chloro-1-hydroxybenzotriazole
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	Chloroforme
<b>DBU</b>	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
<b>DIC</b>	Diisopropylcarbodiimide
<b>DCC</b>	Dicyclohexylcarbodiimide
<b>DCM</b>	Dichlorométhane
<b>DIEA</b>	<i>N,N</i> -Diisopropyléthylamine
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>DMF</b>	Diméthylformamide
<b>Fmoc</b>	9-Fluorénylméthoxycarbonyl
<b>HATU</b>	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N,N</i> -tétraméthyluronium hexafluorophosphate
<b>HBTU</b>	<i>N,N,N,N</i> -Tétraméthyl- <i>O</i> -(1- <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate
<b>HCTU</b>	<i>O</i> -(6-Chlorobenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N,N</i> -tétraméthyluronium hexafluorophosphate
<b>HFIP</b>	1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol
<b>HOAt</b>	1-Hydroxy-7-azabenzotriazole
<b>HOBt</b>	1-Hydroxybenzotriazole
<b>MeCN</b>	Acétonitrile
<b>MeOH</b>	Méthanol
<b>NMM</b>	<i>N</i> -Méthylmorpholine
<b>NMP</b>	<i>N</i> -Méthyl-2-pyrrolidone
<b>Pip</b>	Pipéridine
<b>PyAOP</b>	(7-Azabenzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
<b>PyBOP</b>	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
<b>TEA</b>	Triéthylamine
<b>TFA</b>	Acide trifluoroacétique
<b>TFE</b>	2,2,2-Trifluoroéthanol
<b>TIPS</b>	Triisopropylsilane
<b>THF</b>	Tétrahydrofurane
<b>TMOF</b>	Triméthylorthoformate

## Unités

°C	Degré Celsius
cm <sup>-1</sup>	Réciproque du centimètre
g	Gramme
h	Heure
Hz	Hertz
M	Molaire
mg	Milligramme
MHz	Mégahertz
min	Minute
mL	Millilitre
µL	Microlitre
mmol	Millimole
mol	Mole
m/z	Masse sur charge
nm	Nanomètre
ppm	Parties par million
cm	Centimètre
µm	Micromètre
mm	Millimètre
équiv.	Équivalents
m/v	Masse sur volume
v/v	Volume sur volume
mAu	Unité d'absorbance x 10 <sup>-3</sup>

## Méthodes d'analyse

APCI	« <i>Atmospheric pressure chemical ionization</i> »
APT	« <i>Attached proton test</i> »
ESI	Electrospray ionization
RP-HPLC	Chromatographie liquide à haute performance en phase inversée
RMN	Résonance magnétique nucléaire
2D RMN	Résonance magnétique nucléaire à 2 dimensions
<sup>1</sup> H RMN	Résonance magnétique nucléaire du proton
<sup>13</sup> C RMN	Résonance magnétique nucléaire du carbone
CCM/TLC	Chromatographie sur couche mince
UV	Ultraviolet



<b>MS</b>	Spectromètre de masse
<b>HRMS</b>	Spectromètre de masse à haute résolution
<b>HPLC-MS</b>	Chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse
<b>MO/MW</b>	Micro-ondes

### Résonnance Magnétique Nucléaire

<b><sup>1</sup>H</b>	Proton
<b>δ</b>	Déplacement chimique
<b>d</b>	Doublet
<b>dd</b>	Doublet de doublets
<b>s</b>	Singulet
<b>broad s</b>	Singulet large
<b>m</b>	Multiplet
<b>q</b>	Quadruplet
<b>t</b>	Triplet
<b>J</b>	Constante de couplage

### Autres

<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>GLP-1</b>	Glucagon-Like-Peptide-1
<b><i>t</i><sub>1/2</sub></b>	Temps de demi-vie
<b>GP</b>	Groupe protecteur
<b>GED</b>	Groupe électrodonneur
<b>U-4CR</b>	Ugi four components reaction
<b>λ</b>	Longueur d'onde
<b>ν</b>	Fréquence
<b>hν</b>	Énergie
<b>tp/rt</b>	Température pièce
<b>IPP/PPI</b>	Interaction protéine-protéine
<b>SPPS</b>	Solid-phase peptide synthesis
<b><i>t</i>Bu</b>	<i>tert</i> -Butyl
<b>Trt</b>	Trityl
<b>Fmoc</b>	9-Fluorénylméthoxycarbonyl
<b>Bzl</b>	Benzyl
<b>Boc</b>	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
<b>Pbf</b>	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl

<b>Pht</b>	Phtalimide
<b>OMe</b>	Méthoxy
<b>CM</b>	Résine ChemMatrix®
<b>PS</b>	Résine polystyrène
<b>TG</b>	Résine Tentagel™
<b>2-Cl TCP/CTC</b>	2-Chlorotrityl chloride
<b>Xaa</b>	Acide aminé quelconque
<b>BAL</b>	Backbone Amide Linker
<b>NCL</b>	Native Chemical Ligation
<b>KAHA</b>	Céto-acide hydroxylamine
<b>SAL</b>	Salicylaldehyde
<b>Calcd</b>	Calculé
<b>t<sub>R</sub></b>	Temps de retention

## REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Prof. Éric Biron pour sa confiance en moi, en plus de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer mes premiers pas dans le domaine de la recherche. Ton appui et tes conseils au cours de ma maîtrise étaient très pertinents et le résultat qui en ressort est une expérience multidisciplinaire que je n'aurais pu acquérir ailleurs.

Par la suite, je n'aurais jamais pu mener ce projet de maîtrise à terme sans les nombreux organismes subventionnaires qui m'ont soutenu financièrement, soit le Fond d'Enseignement et de la Recherche de la faculté de Pharmacie de l'Université Laval, la fondation du CHU de Québec, ainsi que le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie du Canada.

Évidemment, cette expérience n'aurait pas passé aussi vite sans l'ambiance qui régnait dans le laboratoire. À cette fin, j'aimerais remercier les membres de l'équipe de recherche, soit Simon, François, Katy et Xinxia. Également, une mention toute spéciale à Claire et Alexia, deux étudiantes françaises que j'ai eu la chance de superviser et qui ont effectué un travail colossal pendant leur court séjour de dix semaines dans le laboratoire, mais qui ont grandement apporté à mes projets de recherches qui ont ultimement mené à des publications.

Dans une autre catégorie, j'aimerais également remercier tous mes amis du secondaire, du Cégep et du baccalauréat en chimie avec qui je n'ai pas perdu contact.

Les derniers remerciements, mais non les moindres vont aux personnes les plus présentes dans ma vie c'est-à-dire mes parents, Denis et Jeannine, sans oublier ma complice de tous les jours, Jessica.



## AVANT-PROPOS

Le chapitre 3 a fait l'objet d'un article scientifique publié dans *Organic and Biomolecular Chemistry*, un journal avec comité de révision. La mise en page a été adaptée pour les besoins de ce présent mémoire. Étant premier auteur de ce papier, il a été inclus dans le présent mémoire. La contribution des auteurs à la rédaction de ce manuscrit est détaillée en avant-propos de ce chapitre 3.

Le chapitre 4 est constitué d'un manuscrit qui sera soumis bientôt à *Tetrahedron Letters*. Étant premier auteur en compagnie de mon directeur de recherche, ce manuscrit a été inclus dans la forme qui sera soumise au journal en question.

La publication suivante a également été effectuée pendant ma maîtrise :

Jobin S\*, Vézina-Dawod S\*, Herby C, Derson A, Biron E. Preparation of *N*-substituted *N*-arylsulfonyl glycines and their use in peptoid synthesis. *Org. Lett.*, **2015**, 17, 5626 –5629.

Toutefois, le sujet de cet article n'est pas en lien avec les travaux discutés dans le cadre de ce mémoire et ce manuscrit a donc été laissé de côté pour être remplacée par le manuscrit du chapitre 4.



# **Chapitre 1**

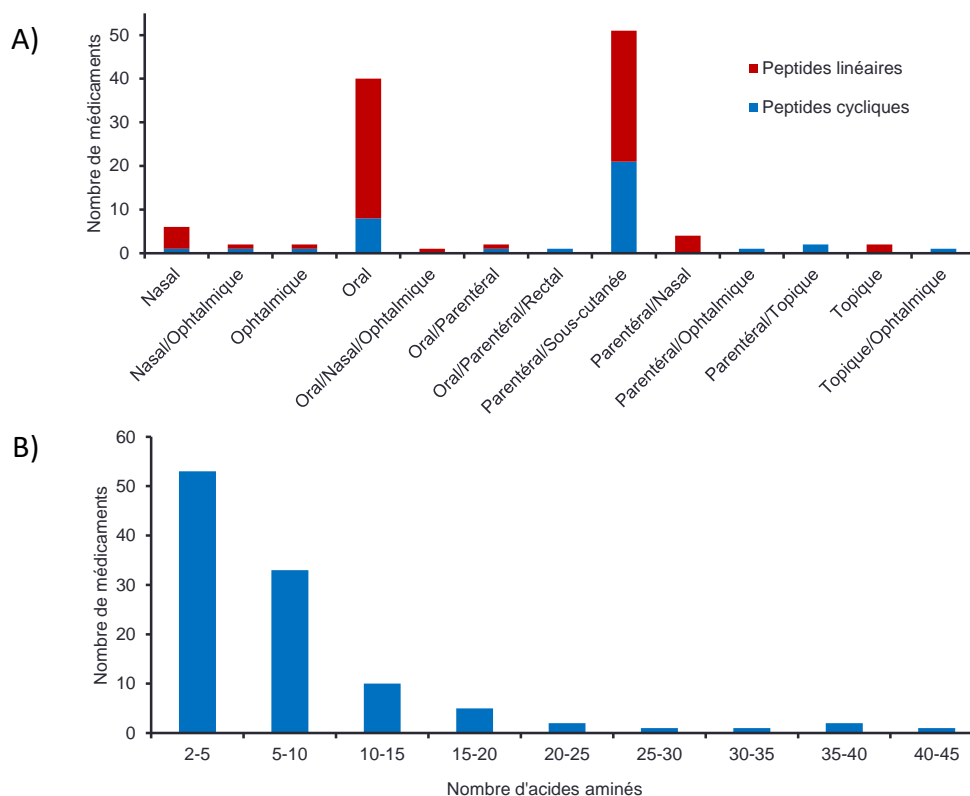
## **Introduction**





## 1.1 Les peptides : une classe unique d'agents thérapeutiques

Les peptides et les mini-protéines (<50 acides aminés) sont des outils moléculaires d'avant plan dans le développement de nouveaux agents thérapeutiques. Ils possèdent de nombreux avantages par rapport à l'utilisation de petites molécules organiques, dont le fait qu'ils possèdent une forte activité et une haute spécificité envers leur cible et qu'ils démontrent une faible toxicité et peu d'interactions médicamenteuses, limitant généralement les effets secondaires liés à leur consommation.<sup>1,2,3</sup> Ce type d'agent thérapeutique génère des revenus de plus en plus importants pour les compagnies pharmaceutiques avec des recettes qui atteignaient 14,1 milliards en 2011 et avec le potentiel d'augmenter à 25,4 milliards en 2018 selon les estimations, puisque présentement 140 médicaments à base de peptides sont en essais cliniques, et plus de 500 en essais précliniques.<sup>4</sup> Une étude de marché publiée en 2016 a d'ailleurs fait l'analyse de 108 médicaments à base de peptides approuvés par la FDA (Figure 1).<sup>5</sup>



**Figure 1.** Répartition de 108 médicaments à base de peptides commercialisés selon leur structure chimique et leur voie d'administration (A) et selon le nombre d'acides aminés de leur séquence primaire (B).

Il est possible de constater à la lumière de ces données que le nombre de peptides linéaires est plus important que ceux possédant une structure cyclique. Malgré leur énorme potentiel comme il en sera discuté à la section **1.2.4**, les peptides cycliques demeurent une classe sous-exploitée (70 linéaires contre 38 cycliques, Figure **1A**). De plus, on remarque que la grande majorité des peptides approuvés sont composés de quinze acides aminés et moins ce qui laisse beaucoup de place au développement de peptides de plus haut poids moléculaire jusqu'à présent peu explorés (Figure **1B**). Il faut toutefois noter un défaut de cette étude qui inclut des peptides composés de deux à cinq acides aminés, puisque ceux-ci possèdent un poids moléculaire très faible (<500 Da), ce qui fait que leur comportement s'apparente à celui des petites molécules organiques. Un faible poids moléculaire a pour effet d'augmenter la biodisponibilité orale, ce qui augmente le nombre de peptides biodisponibles oralement rapporté dans le cadre de cette étude, faussant légèrement les données. Malgré tout, les conclusions tirées de l'analyse restent les mêmes, soit que l'énorme diversité moléculaire disponible avec les peptides possédant plus de 15 acides aminés et les peptides cycliques demeure encore sous-exploitée.

Le plein essor des peptides est, entre autres, dû au fait qu'ils sont de bons modulateurs d'interactions protéines-protéines comparativement aux petites molécules.<sup>6,7,8,9</sup> Comme ces interactions sont omniprésentes dans le corps, elles sont impliquées dans beaucoup de dysfonctionnements. Les peptides sont donc indiqués pour une panoplie d'applications, allant des antibiotiques<sup>10,11,12</sup> aux agents anticancéreux,<sup>13,14</sup> en passant par les dysfonctionnements hormonaux, dont le diabète. C'est d'ailleurs dans ce domaine que les compagnies pharmaceutiques axent principalement leur recherche et le développement de peptides thérapeutiques, puisque les agonistes du récepteur *Glucagon-Like Peptide-1* (GLP-1) possèdent des propriétés hypoglycémiantes intéressantes pour le traitement du diabète de type 2 en stimulant la production d'insuline en plus de réduire l'appétit chez le patient, ce qui peut mener à une perte de poids.<sup>15,16</sup> Comme près de 40% des Américains sont considérés obèses selon une étude récente,<sup>17</sup> le marché potentiel pour des médicaments favorisant la perte de poids est bien établie. Plusieurs compagnies pharmaceutiques se sont évidemment lancées dans l'aventure de produire un analogue agoniste au GLP-1, ce qui a résulté en la production d'un grand nombre de peptides ayant entre 32 et 43 acides aminés (Tableau 1).

**Tableau 1.** Agonistes du GLP-1 présentement commercialisés ou en phase clinique.<sup>4</sup>

Compagnie	Nom commercial	Nom générique	Nombre d'acides aminés	Phase clinique**	Administration
Amylin Pharmaceuticals	Byetta™	exénatide	39	IV	Sous-cutanée deux fois par jour. <sup>18</sup>
Amylin Pharmaceuticals	Bydureon™	exénatide	39	IV	Sous-cutanée une fois par semaine. <sup>18</sup>
Novo Nordisk	Victoza™	liraglutide	32	IV	Sous-cutanée une fois par jour. <sup>19</sup>
Sanofi	Lyxumia™	lixisenatide	43	IV	Sous-cutanée une fois par jour. <sup>20</sup>
GlaskoSmithKline	Tanzeum™	ablglutide	ND*	IV	Sous-cutanée une fois par semaine. <sup>21</sup>
Novo Nordisk	-----	semaglutide	28	III	Sous-cutanée une fois par semaine. <sup>22</sup>
Eli Lilly	Trulicity™	dulaglutide	ND*	IV	Sous-cutanée une fois par semaine. <sup>23</sup>

\*Peptide injecté lié à l'albumine.

\*\* Phase IV implique la commercialisation du produit.

Avec cet exemple des agonistes du GLP-1, il est possible de remarquer les désavantages principaux de l'utilisation des peptides en tant que médicaments. En effet, leurs propriétés pharmacocinétiques posent problème dans certains cas, puisqu'ils sont faiblement biodisponibles oralement avec généralement une faible absorption au niveau du tractus gastro-intestinal et un faible temps de demi-vie dans le plasma sanguin.<sup>24,25</sup> Ainsi, ce n'est pas une classe de molécules qui offre une bonne complaisance pour le patient, car leur mode d'administration est généralement intrusif pour l'organisme, soit généralement par injection sous-cutanée ou intraveineuse. De plus, comme le médicament est rapidement dégradé par les protéases et peptidases, surtout présentes dans le foie et les reins, il faut l'injecter souvent afin de garder l'effet désiré (ex : exénatide  $t_{1/2} = 2.5h$ ).<sup>24</sup> C'est pourquoi les compagnies pharmaceutiques produisant de nouveaux agonistes des GLP-1 misent surtout sur un mode d'administration plus convivial afin que leur produit se démarque des concurrents (ex : Bydureon™, Tanzeum™, Trulicity™, semaglutide, etc.).<sup>26</sup>

Plusieurs méthodes existent afin d'augmenter le temps d'action d'un peptide. La stratégie du Bydureon™ est d'utiliser une capsule de poly-(D, L-lactide-coglycolyse) afin de libérer lentement l'exénatide de façon continue dans le corps.<sup>18,27</sup> D'autres méthodes reposant sur l'utilisation de modifications chimique des peptides sont rapportées afin d'augmenter leur temps de demi-vie. Notamment, il est possible d'effectuer une *N*-méthylation du squelette peptidique, de cycliser le peptide via un lactame ou une lactone, d'utiliser des acides aminés de stéréochimie dextrogyre, ou des acides-β-aminés afin d'éviter la dégradation par les peptidases et protéases.<sup>25,28</sup> Une autre façon beaucoup plus triviale consiste simplement à changer des acides aminés dans la séquence primaire.<sup>24</sup> Cependant, ces méthodes décrites ci-haut impliquent également la possibilité d'une modification structurale du peptide ce qui peut nuire à son efficacité. C'est pourquoi d'autres méthodes comme la PEGylation et la liaison à l'albumine bovine par une chaîne d'acide gras ont notamment été développées.<sup>29,30,31</sup>

## 1.2 Production des peptides

À la lumière des observations ci-dessus, il y a donc une demande croissante en peptides thérapeutiques dans l'industrie pharmaceutique. Présentement, la production des peptides et protéines est majoritairement assurée par deux voies principales, soit la fermentation pour générer des protéines recombinantes et la synthèse chimique. Ces méthodes, bien qu'utiles dans la majorité des cas, possèdent aussi leurs limitations qui restreignent l'accès à l'immense diversité moléculaire que nous offre cette classe de biomolécules.

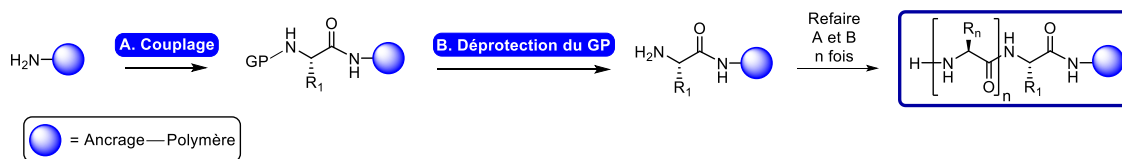
### 1.2.1 Protéines recombinantes

Dans cette première approche, une cellule eucaryote (animale ou levure comme *Saccharomyces cerevisiae*)<sup>32</sup> ou procaryote (e.g. *Escherichia coli*)<sup>33</sup> est utilisée pour produire la protéine cible suite à l'introduction du gène associé dans les cellules par transfection ou transformation. Chez les bactéries, le matériel génétique exogène est introduit à l'aide d'un plasmide qui contient le gène responsable et qui sera traduit pour produire le peptide ou la protéine d'intérêt (protéine recombinante).<sup>34</sup>

De façon générale, cette méthode fonctionne bien, mais elle possède de nombreux inconvénients. Tout d'abord, elle est utilisée majoritairement pour la production de protéines (>50 acides aminés) plutôt que pour la synthèse de peptides en raison des coûts liés à la méthode. En effet, pendant sa production par les micro-organismes, le composé d'intérêt se retrouve dans le milieu de fermentation en compagnie d'un mélange moléculaire complexe utilisé pour la croissance des cellules. Par conséquent, l'isolement de la molécule d'intérêt est souvent très ardu et coûteux, faisant souvent intervenir la chromatographie d'affinité afin de les purifier.<sup>35</sup> Un autre inconvénient est que seuls des acides- $\alpha$ -aminés de stéréochimie lévogyre peuvent être utilisés comme blocs de constructions de ces protéines. De ce fait, la production de protéines contenant des acides aminés non-naturels, des acides aminés dextrogyres, des *N*-méthylations et des lactames ou lactones (peptides cycliques), toutes des transformations utiles pour augmenter le temps de demi-vie de ces molécules, est difficile, voire impossible dans certains cas, par voie recombinante. Ainsi, la production de peptides par cette voie empêche l'incorporation de portions peptidomimétiques, rendant souvent les produits plus vulnérables à la dégradation enzymatique. C'est pourquoi, pour la suite de ce texte, la préparation de peptides exclura cette voie de synthèse, car d'autres méthodes permettent leur production plus rapidement et à moindre coût.

### 1.2.2 Synthèse chimique

La synthèse peptidique telle qu'on la connaît sous sa forme actuelle a pris son essor suite aux travaux révolutionnaires de Merrifield en 1963 sur la synthèse de peptides en phase solide (SPPS). Des travaux qui lui ont d'ailleurs mérité le prix Nobel de chimie en 1984.<sup>36,37</sup> Le concept général fait intervenir l'utilisation d'un polymère insoluble portant un groupement fonctionnel disponible, capable de réagir avec un autre groupement fonctionnel sur une molécule pour former une liaison covalente. Dans le cadre de la synthèse peptidique, la fonctionnalité sur le support solide réagit avec l'acide carboxylique d'un acide aminé protégé en N-terminal pour l'attacher au support solide. Le groupement protégeant l'amine peut par la suite être retiré et l'addition d'un autre acide aminé protégé est effectuée. Ces étapes itératives de couplage/déprotection peuvent être répétées un nombre *n* de fois pour obtenir le peptide désiré (Figure 2). Le relargage du peptide peut être effectué sous diverses conditions selon le type d'ancrage utilisé.



**Figure 2.** Schéma de la synthèse peptidique sur support solide.

GP = Groupement protecteur.

Les avantages de la synthèse sur support solide comparativement à la synthèse en solution plus traditionnelle sont nombreux. Puisque les résidus qui ont réagi sont attachés sur le support solide, toutes les impuretés subséquentes qui demeurent en solution peuvent être retirées simplement par filtration. Ces lavages faciles font également en sorte qu'un large excès de réactif peut être utilisé afin d'accélérer l'efficacité de la réaction (temps et rendements), puisque les réactifs excédentaires seront par le fait même éliminés par les lavages. Comme les réactions sont presque quantitatives, une purification n'est pas nécessaire entre chaque étape de synthèse, mais seulement à la toute fin de la synthèse, purification généralement simple effectuée par HPLC. Ainsi, comme en synthèse peptidique les étapes sont répétitives et que les manipulations sont simplifiées par le support solide, une automatisation de la synthèse de peptide a été développée.<sup>38</sup> Tous ces avantages font en sorte que l'utilisation de supports solides fonctionnalisés dépasse les applications en synthèse peptidique. En effet, le concept a également été appliqué en chimie des acides nucléiques,<sup>39</sup> en plus d'innombrables autres exemples en synthèse organique classique,<sup>40,41</sup> sans compter les applications en chimie combinatoire pour la synthèse et le criblage de chimiothèques hautement diversifiées, notamment en utilisant la méthode «one-bead one-compound».<sup>42,43</sup>

Au cours des années suivant cette découverte, les polymères, les ancrages, les groupements protecteurs et les réactifs agissant comme agents de couplage ont grandement évolué, de sorte que la synthèse de peptides est devenue très polyvalente et efficace. Chacun de ces aspects sera repris individuellement dans les lignes qui suivent.



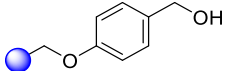
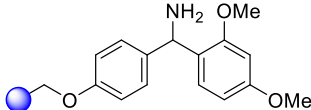
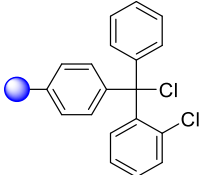
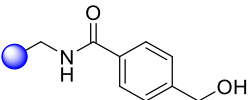
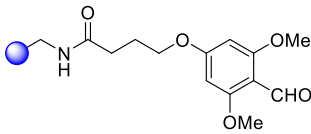
### ***Support solide polymérique***

Les premières expériences ont tout d'abord été effectuées sur une résine de polystyrène et de divinylbenzène chlorométhylée (1%).<sup>36</sup> Des études ont par la suite portées sur la capacité du polymère à bien se gonfler dans différents solvants pour augmenter la surface réactionnelle, et de fait, augmenter l'efficacité des réactions. En effet, bien que le polystyrène se gonfle généralement bien dans les solvants apolaires, on ne peut en dire autant dans les solvants polaires, où la résine a plutôt tendance à se replier sur elle-même, diminuant la surface de contact avec le solvant et les réactifs.<sup>44</sup> C'est pourquoi des efforts ont été déployés pour créer des polymères pouvant être compatibles avec des conditions physiologiques, soit qui peuvent gonfler comme il se doit dans l'eau. De fait, la résine Tentagel™, un mélange de polystyrène et de polyéthylène glycol a fait ses marques dans le marché de la synthèse sur support solide.<sup>45</sup> La résine ChemMatrix® composé uniquement de polyéthylène glycol est aussi une résine intéressante en ce sens qu'elle est relativement polaire. Cette propriété est notamment utile dans la synthèse de longs peptides puisqu'elle prévient le phénomène de repliement de la chaîne peptidique hydrophobe en raison des nombreux groupements protecteurs des chaînes latérales. Les puretés des longs peptides synthétisés sur polystyrène s'en voient généralement diminuées en raison de l'hydrophobicité du support solide qui interagit avec le peptide.<sup>46</sup>

### ***Ancrage***

Dans un autre ordre d'idée, une fois la synthèse du peptide terminée, il faut aussi être en mesure de le retirer du support solide, soit par un clivage spécifique au site d'ancrage. Ainsi, si initialement le peptide était largué en présence d'acide fluorhydrique, un produit demandant des précautions relatives à son utilisation, une panoplie de sites d'ancrage pouvant être clivé sous des conditions beaucoup plus conviviales ont été développées (Tableau 2).<sup>47</sup> Il est donc important de choisir le type d'ancrage de la résine en fonction du peptide qui est désiré. Il est à noter qu'il existe d'autres façons d'ancrer le peptide au support solide que par son acide carboxylique terminal. En effet, il est également possible de l'ancrer par son squelette amide.<sup>48</sup> L'utilité d'une telle approche est notamment la synthèse de peptides cycliques comme il en sera discuté à la section 1.2.4 et au chapitre 4.

**Tableau 2.** Types d'ancrages les plus utilisés en synthèse peptidique et leurs conditions de clivage respectives.<sup>47</sup>

Nom de l'ancrage	Structure chimique	Conditions de clivage	C-terminal après clivage	Groupements protecteurs compatibles
Merrifield <sup>36</sup>		HF	COOH	Boc/Bzl
Hydroxymethyl		HF	COOH	Boc/Bzl
Wang		95% TFA	COOH	Fmoc/tBu
Rink		95% TFA	CONH <sub>2</sub>	Fmoc/tBu
2-Chlorotrityl chloride (2Cl-TCP)		20% HFIP ou 1% TFA dans le DCM	COOH	Fmoc/tBu
Hydroxymethyl benzoic acid (HMBA)		Nucléophiles divers (R-OH, R-NH <sub>2</sub> , OH')	COOR CONHR	Fmoc/tBu
Tris-alkoxy backbone amide linker (BAL) <sup>48</sup>		5% TFA/DCM	Au choix	Fmoc/tBu

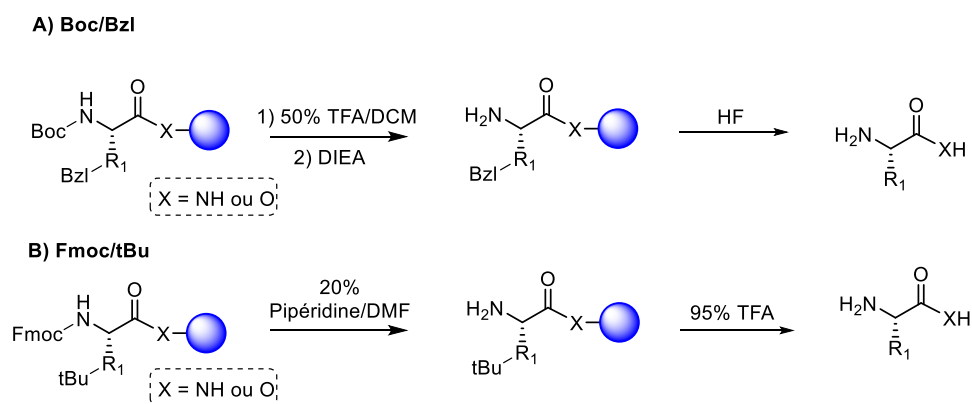
### Groupements protecteurs

Comme chaque ancrage possède ses propres caractéristiques, il est important de choisir les bons groupements protecteurs afin de pouvoir effectuer la déprotection sélective de l'amine tout en gardant les chaînes latérales fonctionnalisées protégées et en demeurant ancré sur le support solide. À cette fin, plusieurs stratégies de protection d'amines et de groupements de chaînes latérales ont été développées.<sup>49</sup> Afin de simplifier le tout, il est possible de les classer en deux grandes classes, soit les méthodes Boc/Bzl<sup>36</sup> et Fmoc/tBu.<sup>50</sup> Si, la première méthode est compatible avec les ancrages clivables en milieu fortement acide et requière donc des équipements spéciaux, la seconde est compatible avec des ancrages plus acidosensibles. Principalement, les ancrages peuvent être clivés en présence d'acide trifluoroacétique à 95%, les 5% restant étant composés de «scavenger» qui trappent les carbocations générés. Ce sont généralement des



trialkylsilane, des thioéthers, du phénol, des thiols ou même de l'eau. L'ajout de ces réactifs empêche les carbocations de se lier à nouveau aux chaînes latérales et évite un clivage incomplet de la résine en déplaçant l'équilibre vers la formation des produits.

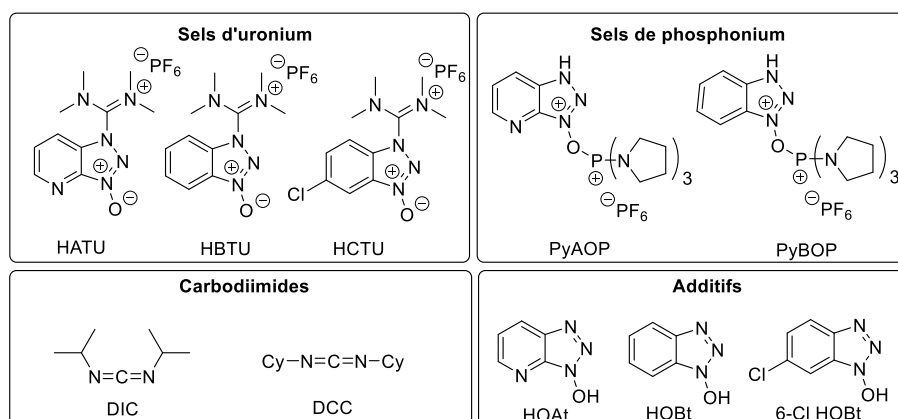
Il faut donc au moins trois degrés d'orthogonalité pour effectuer la synthèse des peptides : une protection de l'amine, une protection des chaînes latérales et le clivage du support solide (Figure 3). Il est toutefois à noter que dans certaines situations, la déprotection des chaînes latérales et le clivage du support solide peuvent être effectués simultanément afin d'économiser du temps.



**Figure 3.** Principales stratégies de protection orthogonale de la synthèse peptidique. L'approche Boc/Bzl (A) et l'approche Fmoc/tBu (B) sont les deux principales méthodes.

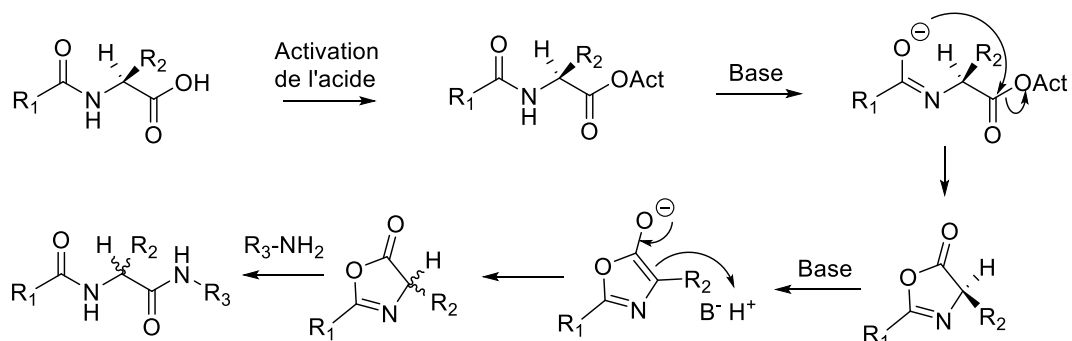
### Agents de couplages

Le dernier aspect à considérer pour la synthèse des peptides est l'agent de couplage qui doit être utilisé pour former le lien amide entre chaque acide aminé. En effet, le corps humain utilise des enzymes pour que cette réaction ait lieu. Le comportement de ces enzymes a d'ailleurs été répliqué dans la synthèse par voie enzymatique, sans néanmoins démontrer une efficacité supérieure à la synthèse chimique.<sup>51</sup> Ainsi, en synthèse chimique, comme aucune enzyme n'est impliquée, il faut activer l'acide carboxylique pour que la condensation ait lieu. Pour ce faire, une multitude d'agents de couplage a été développée (Figure 4).<sup>52</sup>



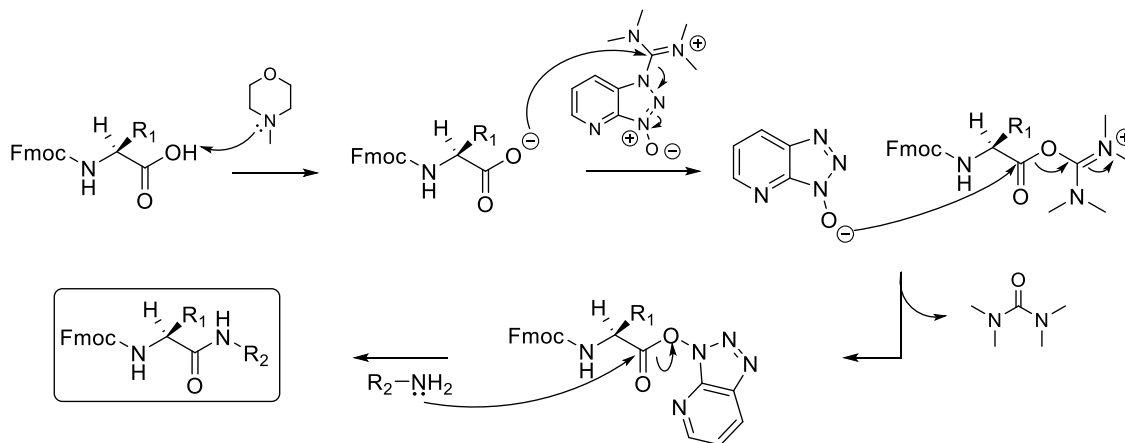
**Figure 4.** Principaux agents déshydratants utilisés en synthèse peptidique.

En comparant les structures des molécules présentées à la Figure 4, il est possible de remarquer des similitudes. L'utilisation des carbodiimides est une excellente façon de former des liens amides, cependant, des problèmes d'épimérisation peuvent survenir avec l'utilisation de ces agents de couplages seuls. En effet, l'attaque désirée de l'amine sur l'acide carboxylique est une réaction relativement lente comparativement à la réaction acide-base intramoléculaire qui peut survenir dans de telles conditions, ce qui provoque la formation d'une oxazolone (Figure 5).<sup>52</sup> Les oxazolones sont des molécules où l'hybridation du carbone en alpha du carbonyle devient  $sp^2$ , qui est donc plan, impliquant la perte de la stéréochimie du peptide.



**Figure 5.** Mécanisme d'épimérisation en synthèse peptidique via la formation d'oxazolone.

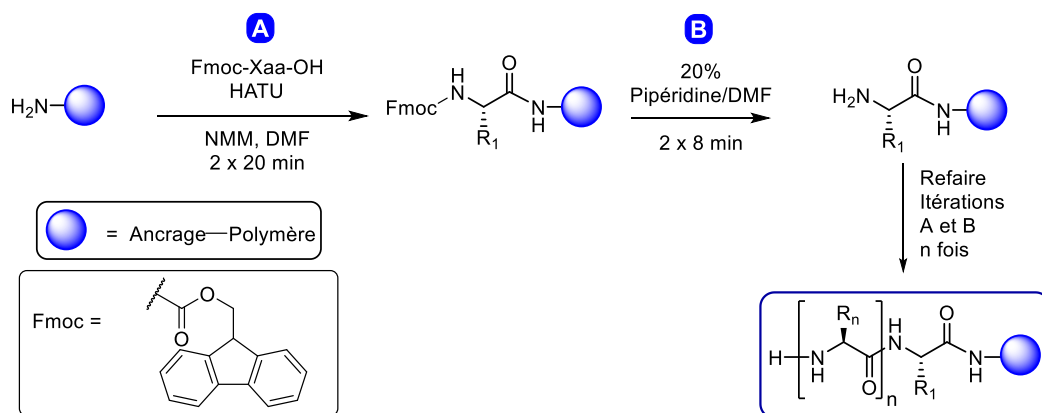
Dans l'optique de réduire cette épimérisation, l'ajout d'additifs comme des hydroxybenzotriazoles est généralement la méthode favorisée.<sup>53</sup> L'idée derrière cette addition est que l'attaque de l'alcool sur l'intermédiaire est plus rapide que l'attaque de l'amine, mais l'ester activé résultant est beaucoup moins sensible à la formation d'une oxazolone. De cette façon, les dérivés uroniums et phosphoniums présentés à la Figure 4 constituent en fait la combinaison entre un carbodiimide et un additif benzotriazole.<sup>54</sup> L'utilisation de ces agents de couplages nécessite la présence d'une faible base tertiaire comme la *N*-méthylmorpholine (NMM) ou la *N,N*-diisopropyléthylamine (DIEA) afin de former le carboxylate sans toutefois déprotéger l'amine de son groupement protecteur carbamate. Le mécanisme de cette réaction est décrit à la Figure 6. Cet ajout de base est cependant problématique dans une approche de couplage de fragments de peptides comme il en sera discuté à la section 1.2.3.



**Figure 6.** Mécanisme de la formation d'un lien peptidique via l'utilisation d'un réactif hybride, le HATU.

### La SPPS en résumé

Ayant couvert la synthèse peptidique sous quatre principaux aspects, le schéma de synthèse général de la Figure 2 peut désormais être précisé (Figure 7). Pour la suite de ce mémoire, la SPPS fera référence à cette méthode, puisque c'est cette dernière qui a été utilisée lors des travaux présentés. Il est à noter que les chaînes latérales d'acides aminés fonctionnalisés sont protégées via des groupements labiles en milieu acide (ex. tBu, Boc, Trt, Pbf) et les ancrages généralement sélectionnés sont aussi sensibles dans ces conditions (ex : Rink, 2-Cl TCP, BAL).

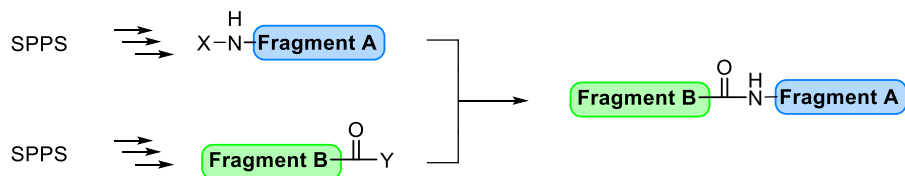


**Figure 7.** Schéma de la synthèse peptidique sur support solide utilisé dans le cadre de ce mémoire.

Bien que la synthèse peptidique sur support solide ait connu un essor formidable au cours des dernières décennies pour devenir une méthodologie bien rodée, quelques difficultés techniques demeurent. Bien que chaque étape soit presque quantitative, il n'en demeure pas moins que la synthèse d'un peptide de 30 acides aminés demande au moins 60 étapes réactionnelles. Ainsi, même si seulement 1% d'impureté survient à chaque étape, au bout de 60 étapes, seulement 45% du peptide désiré peut théoriquement être obtenu. De plus, lorsque les chaînes peptidiques s'allongent, des structures secondaires peuvent être formées ce qui peut diminuer l'efficacité des couplages. Notamment, le fait que chaque groupement fonctionnel sur les chaînes latérales doit être protégé fait en sorte que les peptides sont relativement hydrophobes. Cette caractéristique peut causer le repliement de la chaîne peptidique via l'interaction des chaînes hydrophobes avec le polymère, ce qui diminue significativement l'accès au N-terminal du peptide. C'est pourquoi, de façon générale, cette méthode de synthèse de peptides est limitée aux peptides possédant moins de 30 résidus d'acides aminés.<sup>55</sup> Pour atteindre des structures peptidiques d'une longueur supérieure, il faut généralement passer par des approches de couplages de fragments peptidiques comme il en sera discuté dans la prochaine section (Section 1.2.3).

### 1.2.3 Couplage de fragments

Les méthodes de couplages de fragments peptidiques reposent sur le principe qu'il est possible d'obtenir une chaîne plus longue en ajoutant non pas les acides aminés un à un, mais bien en bloc (Figure 8). C'est donc une méthode de synthèse convergente en ce sens que deux fragments peuvent être synthétisés en parallèle avant d'être jumelés ensemble via la formation d'un lien amide.



**Figure 8.** Schéma général du concept de synthèse convergente par couplage de fragments peptidiques.

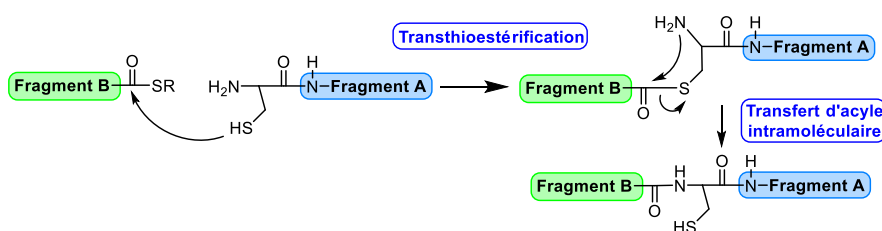
Une multitude de méthodes existent afin de coupler des fragments peptidiques.<sup>56,57,58</sup> Dans le cadre de ce mémoire, je ne ferai état que de quelques-unes de ces méthodes, soit les plus utilisées, ou d'autres méthodes récentes qui possèdent un grand potentiel d'être utiles dans un avenir rapproché.

#### **Agents de couplages**

D'emblée, il serait trivial de penser que la façon traditionnelle de former un lien amide entre deux fragments peptidiques devrait être la même que lors de la SPPS, soit en activant l'acide carboxylique, puis former un ester activé à l'aide d'un agent de couplage.<sup>59</sup> Il faut cependant tenir compte que lors de la SPPS, les acides aminés sont protégés en N-terminal via un carbamate, alors que dans le cadre d'un couplage de fragments, l'amine est en fait protégée via un lien amide avec le reste du peptide. Ce simple changement fait en sorte que la labilité du proton de l'azote responsable de la formation d'oxazolone est augmentée lors de l'utilisation de fragments, ce qui affecte la stéréochimie de l'acide aminé à l'extrémité C-terminal du fragment N-terminal via la formation d'une oxazolone comme décrite précédemment (Figure 4). Ainsi, avec cette épimérisation au site de liaison, l'utilisation des agents de couplage n'est pas recommandée pour lier deux fragments peptidiques.

## Native Chemical Ligation

Sans aucun doute, le domaine du couplage de fragment peptidique a connu son essor le plus important en 1994 avec les travaux de Dawson sur la «Native Chemical Ligation» (NCL).<sup>60</sup> Comme démontré à la Figure 9, la NCL fait interagir une cystéine en N-terminal du fragment C-terminal et un thioester en C-terminal du fragment N-terminal. Après une transthioestérification, un transfert d'acyle S-N survient via l'attaque de l'amine sur le thioester, venant former le lien peptidique désiré en régénérant la cystéine.



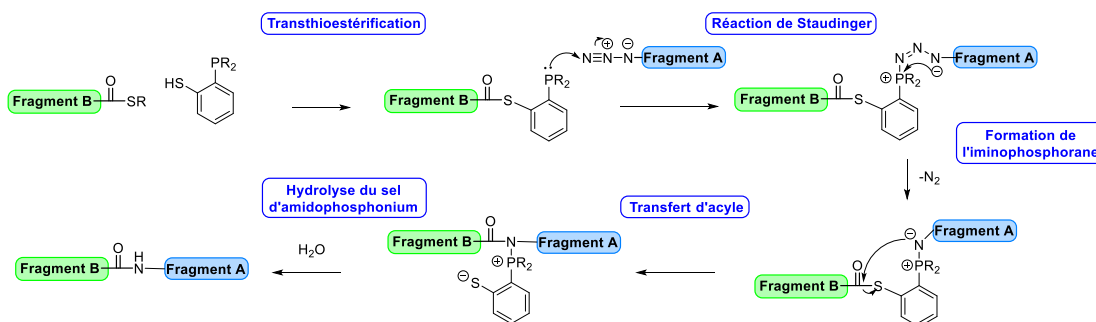
**Figure 9.** Mécanisme réactionnel de la NCL.

Cette découverte est jusqu'à ce jour la plus importante dans le domaine de la synthèse peptidique via une approche de couplage de fragments.<sup>61</sup> En effet, elle permet de lier de façon stéréosélective deux fragments peptidiques sans que leurs groupements fonctionnels soient protégés. Cet aspect est très important, car il est parfois difficile de solubiliser des peptides totalement protégés, alors que les peptides non protégés sont généralement solubles dans l'eau.<sup>56</sup> La NCL a notamment permis la synthèse chimique de protéines de longueurs impressionnantes qui seraient impossibles à synthétiser si ce n'est que par voie recombinante.<sup>62,63</sup> Toutefois, il est important de remarquer que les rendements totaux des synthèses ne sont pas très élevés, ce qui est notamment dû au fait que le précurseur thioester doit être synthétisé, puis purifié avant d'être utilisé, ce qui diminue les rendements. Au-delà de cet inconvénient, un problème majeur est la nécessité d'avoir une cystéine dans la séquence des acides aminés désirées. Sachant que cet acide aminé est seulement présent naturellement à 1,1% dans les protéines,<sup>61</sup> il est fort probable que la séquence désirée ne possède pas de cystéine, et qu'il soit alors impossible d'utiliser la NCL.

Plusieurs méthodes ont d'ailleurs été mises au point pour contourner les limites de la méthode et la rendre plus universelle.<sup>64,65</sup> Parmi celles-ci, on dénombre notamment des méthodes nécessitant des modifications post-NCL, dont des désulfuration (pour obtenir au site de liaison soit une alanine,<sup>66,67</sup> une phénylalanine,<sup>68</sup> une valine,<sup>69</sup> une asparagine,<sup>70</sup> etc.) ou des méthylations (pour obtenir une méthionine).<sup>71</sup> Il faut cependant remarquer que l'ajout d'étapes additionnelles diminue encore une fois les rendements et augmente les temps de synthèse qui sont déjà généralement longs pour la NCL.<sup>63,72</sup>

### Liaison de Staudinger

Une autre méthode très populaire pour lier deux fragments peptidiques est l'utilisation de la réaction de Staudinger. Classiquement, cette réaction consiste en une réduction d'un azide en amine. Cependant, en présence du phosphinothioester correspondant, un transfert d'acyle intramolécule survient afin de former un lien amide (Figure 10).<sup>73</sup>



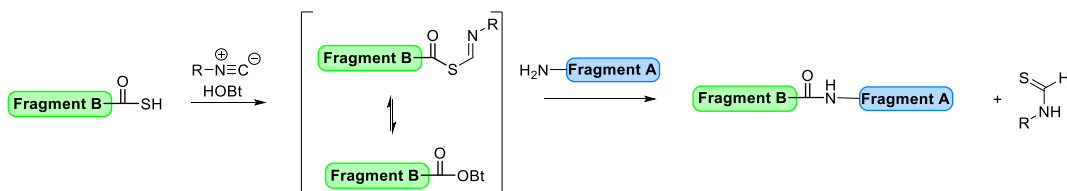
**Figure 10.** Mécanisme réactionnel de la liaison de Staudinger.

La transthioestérification entre un thioester quelconque en C-terminal du fragment peptidique N-terminal et un thiol portant une phosphine, un phosphinothiol, initie la liaison de Staudinger. Par la suite, la phosphine attaque l'azide qui est positionné en N-terminal du fragment C-terminal afin de former un intermédiaire iminophosphorane via l'élimination d'une molécule d'azote moléculaire. Par la suite, via un transfert d'acyle intramolécule, l'azote très nucléophile de l'imino-phosphorane attaque le thioester pour former un sel d'amidophosphonium qui peut finalement être hydrolysé en présence d'eau pour donner le peptide lié désiré.

En plus d'être une méthode qui conserve la stéréochimie du peptide au site de liaison et qui s'effectue en conditions douces comme la NCL, la liaison de Staudinger offre quelques avantages par rapport à cette dernière.<sup>74,75,76</sup> Notamment, une cystéine au site de liaison n'est plus nécessaire pour lier deux fragments peptidiques, ce qui est un grand avancement en soi.<sup>73,77</sup> De plus, cette réaction a le potentiel d'être compatible avec les conditions physiologiques et peut s'avérer utile entre autres pour marquer certaines protéines produites par voie recombinante ou des cellules qui porteraient des fonctionnalités azides en surface.<sup>78,79</sup> La liaison de Staudinger a permis au cours du début des années 2000, la synthèse de protéines en utilisant la force combinée de cette réaction avec la NCL, ce qui en fait une méthode alternative intéressante.<sup>80</sup> Toutefois, il faut aussi se rendre compte que pour la liaison de Staudinger, il est nécessaire à priori d'effectuer des modifications sur les fragments N-terminal et C-terminal, ce qui rajoute du temps à la synthèse en plus d'en diminuer sérieusement le rendement global.

### Utilisation d'isonitriles

Une autre façon de coupler des fragments peptidiques est d'utiliser la chimie des isonitriles. Depuis les premiers travaux de Danishefsky en 2008 qui portaient sur la formation d'anhydride mixte de carboxylate de formimidate via la simple réaction entre un isonitrile et un acide carboxylique,<sup>81</sup> la chimie de formation de lien amide à partir de cette méthodologie a été développée ultérieurement, entre autres grâce à la découverte de la réactivité accrue des thioacides en tant que donneur d'acyles.<sup>82,83</sup> De la simple formation d'un lien amide entre deux acides aminés, cette approche avec les isonitriles a rapidement évolué en une méthode de couplage de fragments peptidiques (Figure 11).<sup>84,85</sup>



**Figure 11.** Schéma du couplage de fragments peptidiques par l'entremise d'isonitrile.



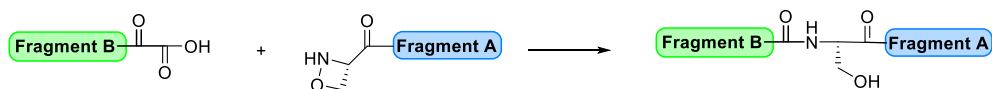
Une fois le fragment thioacide synthétisé, ce dernier forme un intermédiaire soit avec l'isonitrile ou le benzotriazole, ce dernier étant ajouté en tant qu'additif pour améliorer l'efficacité de la réaction. Par la suite, l'amine libre du fragment C-terminal attaque le carbone très électrophile du thioester afin de former le lien peptidique. Il est à noter que cette attaque de l'amine est en compétition avec l'acylation intramoléculaire qui donnerait plutôt le thioanhydride mixte de carboxylate formimidate, produit que donnerait la simple réaction entre l'isonitrile et le thioacide. Néanmoins, l'attaque intermoléculaire est généralement favorisée, encore une fois en raison du benzotriazole ajouté.

Cette méthodologie a été appliquée à la synthèse de plusieurs peptides, dont notamment l'ocytocine et la dihydroocytocine,<sup>86</sup> des dérivés de la cyclosporine,<sup>87</sup> la vasopressine,<sup>88</sup> et autres peptides et glycopeptides.<sup>85,89</sup> Toutefois, une modification pré réactionnelle est nécessaire pour transformer l'acide carboxylique en C-terminal du fragment N-terminal en thioacide afin que la réaction opère. En plus, il faut aussi tenir compte de problèmes d'épimérisation parfois observés, notamment avec la phénylalanine en C-terminal du fragment N-terminal.<sup>88</sup>

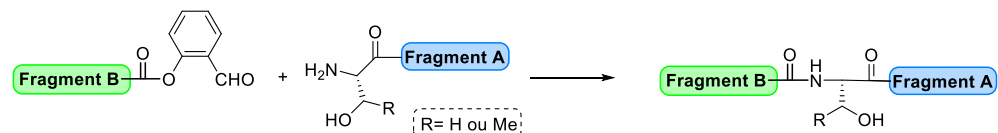
### Autres méthodes

Au-delà de ces principales méthodes de couplages de fragments peptidiques, des efforts plus récents pour développer des méthodes de couplages plus universelles ont aussi été mises de l'avant. C'est notamment le cas des méthodes utilisant des  $\alpha$ -cétoacides hydroxylamine (KAHA),<sup>90</sup> des esters de salicylaldehydes (SAL),<sup>91</sup> ou des ynamides.<sup>92</sup>

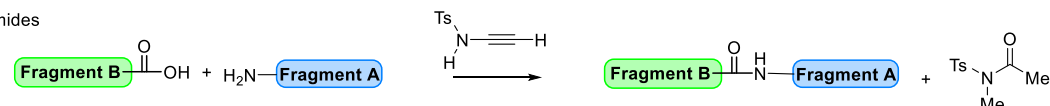
A) KAHA



B) SAL



C) Ynamides



**Figure 12** Autres méthodes de couplage de fragments peptidiques via des  $\alpha$ -cétoacides hydroxylamine (KAHA) (A) des esters de salicylaldehydes (SAL) (B) et des ynamides (C).

De ces trois méthodes (Figure 12), les approches KAHA et SAL ont trouvé leur application dans la synthèse de protéines, en dépit des modifications préalables et la nécessité de retrouver une sérine ou une thréonine dans la séquence du peptide désiré.<sup>90,91,93</sup> Pour ce qui est de la méthode utilisant les ynamides comme agent de couplage, seulement la preuve de concept en liant deux dipeptides a jusqu'à présent été effectuée, laissant place dans un futur proche à des tentatives de synthèse de protéines par cette approche. Le seul inconvénient à cette façon de faire est la stabilité et la difficulté synthétique des ynamides, en plus de temps de réaction relativement longs.

Ainsi, à la lumière de toutes les procédures pour lier des fragments peptidiques énumérées ci-haut, il est possible de remarquer qu'aucune de ces méthodes n'est parfaite. Le tableau 3 indique d'ailleurs les forces et les faiblesses de chacune, de sorte que certaines structures peptidiques complexes demeurent inaccessibles par les méthodes de synthèse existantes.

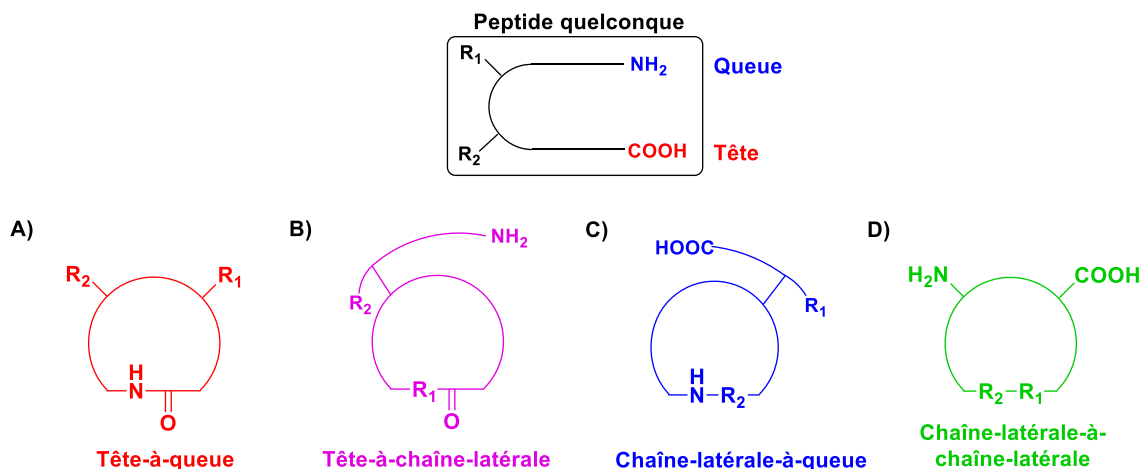
**Tableau 3.** Résumé des forces et faiblesses des techniques de liaisons de fragments présentées.

<b>Technique</b>	<b>Accessibilité et stabilité des réactifs</b>	<b>Absence d'épimérisation au site de liaison</b>	<b>Aucune modification pré réactionnelle</b>	<b>Aucune restriction de résidu au site de liaison</b>
Agents de couplage	<b>x</b>		<b>x</b>	<b>x</b>
NCL	<b>x</b>	<b>x</b>		
Staudinger	<b>x</b>	<b>x</b>		<b>x</b>
Isonitrile	<b>x</b>			<b>x</b>
KAHA	<b>x</b>	<b>x</b>		
SAL	<b>x</b>	<b>x</b>		
Ynamides		<b>x</b>	<b>x</b>	<b>x</b>

**x** = Condition respectée

## 1.2.4 Synthèse de peptides cycliques

Dans un autre ordre d'idée, la synthèse de peptides cycliques emploie pratiquement les mêmes stratégies que pour le couplage de fragments sauf que la liaison s'effectue à l'intérieur du même fragment. Dans ce cas précis, il faut favoriser une réaction intramoléculaire et éviter les réactions intermoléculaires en diluant le peptide à cycliser. La cyclisation peut s'effectuer de quatre façons différentes, soit tête-à-queue, tête-à-chaîne-latérale, chaîne-latérale-à-queue et chaîne-latérale-à-chaîne-latérale (Figure 13).<sup>94</sup>

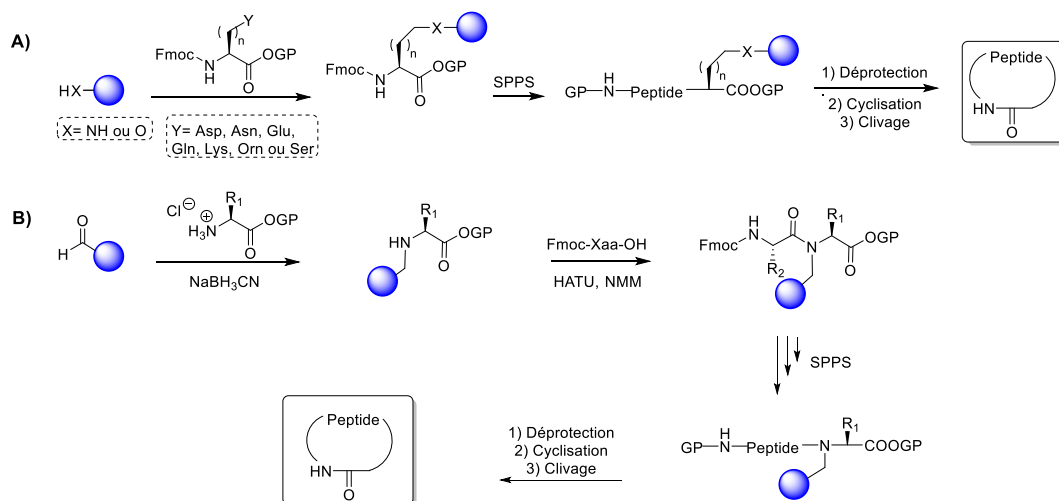


**Figure 13.** Façons de cycliser un peptide : tête-à-queue (A), tête-à-chaîne-latérale (B), chaîne-latérale-à-queue (C) et chaîne-latérale-à-chaîne-latérale (D).

Les avantages d'utiliser ces structures macrocycliques par rapport aux peptides linéaires en temps qu'agents thérapeutiques sont nombreux. Premièrement, le fait de cycliser le peptide via un lien homodétique (lien amide) diminue la polarité de la molécule, puisqu'elle perd sa forme zwitterionique prédominante en conditions physiologiques. Ce changement a pour effet de faciliter la pénétration cellulaire par voie passive de ces molécules. De plus, le fait d'éliminer les extrémités N- et C-terminales les rends résistants aux exopeptidases, en plus d'avoir une résistance accrue envers les endopeptidases, ce qui augmente grandement le temps de demi-vie des peptides cycliques dans le plasma sanguin par rapport à leurs analogues linéaires.<sup>95,96</sup> La rigidité conformationnelle des peptides cycliques favorise et stabilise également le mimétisme de structures secondaires des protéines, ce qui diminue le coût entropique nécessaire à la liaison de ces molécules au site actif d'une protéine, puisqu'une préorganisation des atomes dans l'espace facilite l'*emboîtement* dans le site actif.<sup>95</sup>

L'obtention de tels composés peut s'effectuer à partir d'extractions de produits naturels, puisque certains peptides cycliques bioactifs comme la gramicidine et la cyclosporine A sont de cette origine.<sup>97,98</sup> Bien qu'il soit également possible d'obtenir ces peptides par voie recombinante,<sup>99</sup> la méthode de prédilection demeure toutefois la synthèse chimique.<sup>100</sup> Pour ce faire, la cyclisation du peptide désiré peut être faite en solution ou sur support solide. Bien que la plupart des méthodes de couplages de fragments puissent être appliquées pour cycliser un peptide en solution, la réaction de macrocyclisation demande dans tous les cas des conditions sous haute dilution pour réduire au maximum les réactions intermoléculaires. L'approche de macrocyclisation sur support solide offre plusieurs avantages comme décrite précédemment (section **1.2.2**) en plus de créer un effet de pseudo-dilution. Ceci s'explique par le fait que le peptide linéaire soit immobilisé sur un support solide avec un faible taux de substitution, ce qui fait en sorte qu'il est peu probable pour celui-ci d'effectuer une réaction intermoléculaire. Les réactifs peuvent donc être utilisés en excès, ce qui accélère la réaction. Plusieurs autres facteurs sont à considérer pour effectuer une macrocyclisation peptidique efficace, dont notamment le nombre d'atomes dans le macrocycle en formation, l'incorporation d'éléments inducteurs de tournant ou de liens amides en conformation *cis*, l'utilisation d'acides aminés de stéréochimie dextrogyre, etc.

Tandis que l'approche classique d'ancrage d'un peptide en synthèse peptidique sur support solide par son C-terminal peut fonctionner pour la cyclisation chaîne-latérale-à-chaîne-latérale et chaîne-latérale-à-queue, la cyclisation tête-à-queue a nécessité l'élaboration de nouvelles techniques d'ancrage des peptides sur le support solide polymérique. La façon classique étant d'attacher le peptide par son extrémité C-terminale, l'ancrage agit généralement en tant que groupement protecteur de cette position, rendant cette portion de la molécule inerte. Afin que cette extrémité soit apte à réagir, deux approches principales ont été développées, soit l'ancrage par des chaînes latérales d'acides aminés et l'ancrage par le squelette amide du peptide (Figure **14**).



**Figure 14.** Stratégies d'ancrage sur un support solide pour la synthèse de peptides cycliques via les chaînes latérales (A) et le squelette peptidique (B).

### ***Ancrage par les chaînes latérales***

La première façon imaginée pour laisser l'extrémité C-terminale libre a été d'ancrer le peptide au support solide par une chaîne latérale fonctionnalisée dans sa séquence (Figure 14A). Bien que cette méthode fonctionne bien et ait été développée pour ancrer plusieurs chaînes latérales d'acides aminés dont notamment Asp, Glu, Asn, Gln, Lys, Orn et Ser,<sup>101</sup> il est évident que cette méthode est restreinte par la présence d'un de ces acides aminés dans la séquence du peptide à synthétiser.<sup>102</sup>

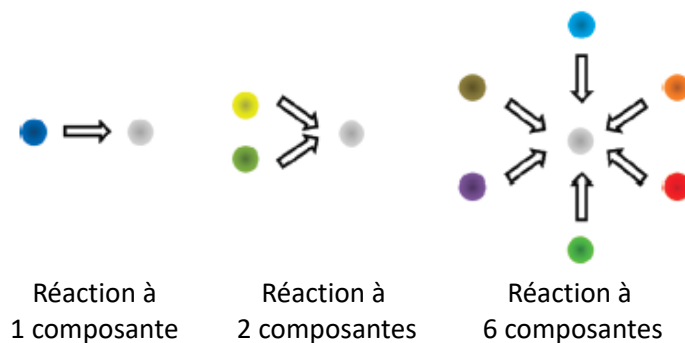
### ***Ancrage par le squelette amide***

Applicable à beaucoup plus de synthèse de peptides cycliques que l'ancrage par chaînes latérales, cette méthode développée en 1998 par Jensen *et al.*<sup>48</sup> fait intervenir un support solide fonctionnalisé aldéhyde (*Backbone Amide Linker*: BAL). Le premier acide aminé est ancré sur le support polymérique par le biais d'une amination réductive, formant une amine secondaire qui est par la suite acylée (Figure 14B). La synthèse est par la suite continuée par voie classique et la cyclisation peut avoir lieu en retirant sélectivement les groupements protecteurs désirés. Bien qu'utile dans la synthèse de plusieurs peptides cycliques, cette méthode nécessite des temps de réaction relativement longs, en plus d'un grand excès de réactifs initiaux. De plus, l'acylation s'effectue sur une amine secondaire très encombrée, ce qui diminue dans certains cas l'efficacité de la réaction.

### 1.3 Réaction multicomposante de Ugi

#### *Réactions multicomposantes*

De façon traditionnelle, la synthèse chimique d'un composé organique doit s'effectuer en plusieurs étapes successives qui induisent, chacune à leur façon, diverses modifications au substrat pour générer la molécule désirée. Dans une réaction multicomposante, plusieurs réactifs de départ (3 ou plus) réagissent en une seule étape afin de former le composé cible de façon convergente (Figure 15). Cette façon de faire la synthèse d'un composé possède plusieurs avantages, dont un principe d'économie d'atomes, puisque généralement la grande majorité des atomes utilisés se retrouvent dans le produit final, les rendements générés à partir de ces réactions sont plus élevés que la synthèse du même produit par synthèse séquentielle, notamment dû au fait que la synthèse s'effectue en une seule étape, faisant en sorte que le nombre de purifications est forcément moindre.<sup>103</sup>



**Figure 15.** Comparatif entre synthèse séquentielle et synthèse par voie multicomposante.<sup>103</sup>

Plusieurs réactions multicomposantes classiques ont démontré leur efficacité au fil des ans, entre autres, la réaction de Biginelli,<sup>104</sup> Strecker,<sup>105</sup> Passerini, etc. Ces réactions multicomposantes ont d'ailleurs attirés d'avantage l'attention des chercheurs vers la fin du XX<sup>e</sup> siècle avec l'engouement des scientifiques pour la synthèse orientée sur la diversité, concept très utile dans un contexte de chimie combinatoire, puisqu'une grande quantité de produits peuvent être synthétisés en peu de temps.<sup>106</sup>

## Réaction de Ugi

Parmi les réactions multicomposantes qui ont été développées jusqu'à présent, la réaction de Ugi est certainement une des plus connue et utilisée.<sup>107</sup> Développée en 1959 par Ivar Karl Ugi, cette réaction généralement à quatre composantes fait réagir successivement en une seule étape une amine, un aldéhyde, un acide carboxylique et un isonitrile afin de former un produit *bis*-amide (Figure 16).

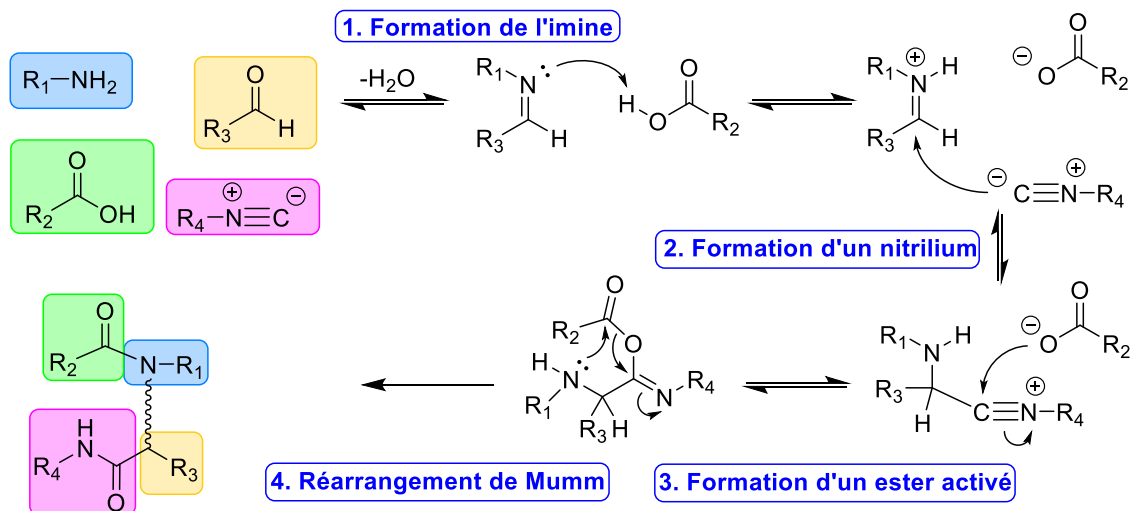


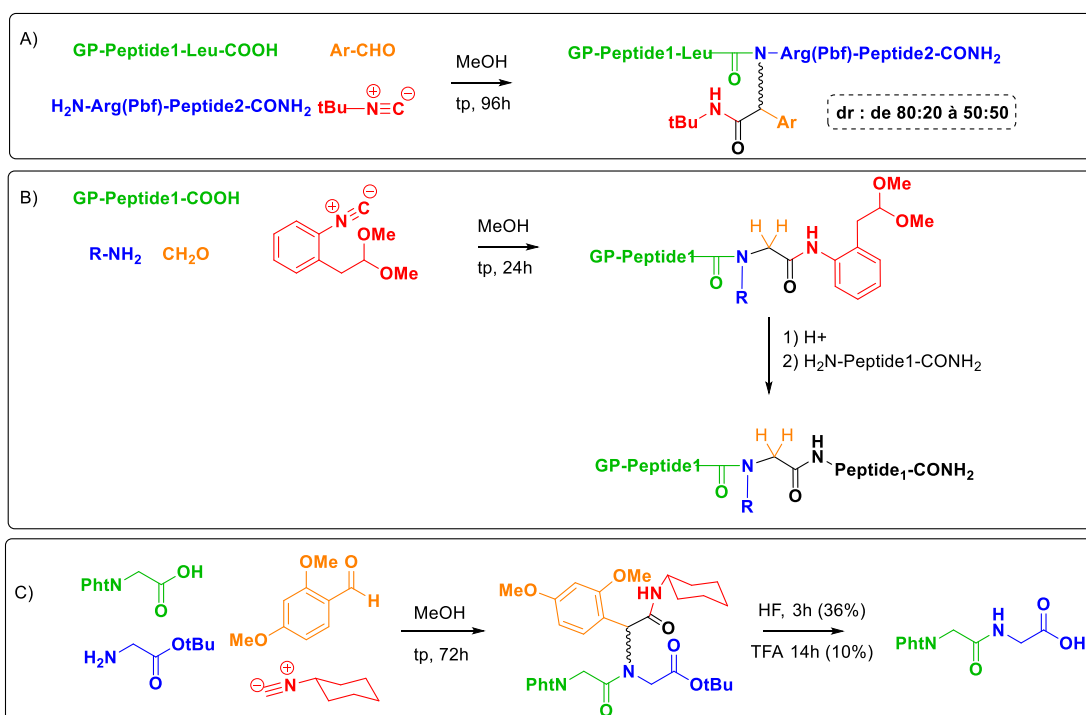
Figure 16. Mécanisme de la réaction multicomposante de Ugi (U-4CR).

La réaction de Ugi à quatre composantes (U-4CR) débute par une déshydratation entre l'amine et l'aldéhyde ou la cétone afin de former un intermédiaire imine. Ce dernier va par la suite arracher le proton acide de l'acide carboxylique afin de générer un carboxylate et un iminium. Cet intermédiaire réactionnel qui est en fait une version beaucoup plus électrophile de l'imine se fait par la suite attaquer par le carbone nucléophile de l'isonitrile afin de former un nitrilium. Cette nouvelle entité moléculaire possédant aussi un carbone très nucléophile se fait aussitôt attaquer par le carboxylate formé préalablement pour former un ester activé. Par la suite, l'étape ultime de la réaction consiste en un réarrangement intramoléculaire, le réarrangement de Mumm, un transfert d'acyle O-N, qui provoque la formation de deux liens amides, et donc du produit final. Si toutes les étapes décrites précédemment étaient en équilibre, le réarrangement de Mumm forme un produit thermodynamiquement très stable, ce qui a pour effet que la dernière étape est irréversible, faisant en sorte que la réaction de Ugi est généralement très efficace.<sup>108</sup>

## Applications de la réaction de Ugi

Cette réaction a trouvé son application dans une multitude de facettes de la chimie, mais a notamment été utilisée dans le domaine de la synthèse de molécules peptidomimétiques. Plus précisément, comme elle permet l'obtention de composés complexes en une seule étape, la U-4CR est utilisée dans la synthèse d'hétérocycles peptidomimétiques.<sup>109,110</sup>

Comme la réaction de Ugi forme entre autres un lien amide entre une amine et un acide carboxylique, plusieurs travaux ont aussi été effectués afin d'utiliser cette dernière pour former des macrocycles peptidiques via des composés bifonctionnels.<sup>111,112,113,114</sup> La synthèse de peptides linéaires a également été tentée à partir de cette réaction, mais la molécule résultante est *N*-alkylée au site de liaison (Figure 17A et 17B).<sup>115</sup> Certains voient cette *N*-alkylation comme un moyen de pouvoir ajouter de la diversité par l'intermédiaire d'isonitriles convertibles,<sup>116</sup> alors que d'autres ont imaginé des méthodes pour pouvoir cliver ce lien, et ainsi donner le peptide naturel comme produit final.<sup>117</sup> Les résultats préliminaires de cet article de 1977 n'ont cependant pas été repris étant donné les faibles rendements de clivage de la partie *N*-alkylée (Figure 17C).



**Figure 17.** Applications de la U-4CR à la synthèse peptidique : Travaux d'Arabianian (2008) (A), travaux de Wessjohann (2016) (B) et travaux de Waki (1977) (C).



### **Désavantages de la réaction de Ugi**

Quelques inconvénients surviennent toutefois avec l'utilisation de cette réaction. Premièrement, du point de vue technique, l'utilisation d'isonitrile doit être effectuée avec grandes précautions en raison de leur forte odeur. Ivar Karl Ugi affirme lui-même que *«le développement de la chimie des isonitriles a fort probablement été retardé par leur odeur caractéristique qui est décrite comme étant très spécifique et presque suffocante»*.<sup>118</sup>

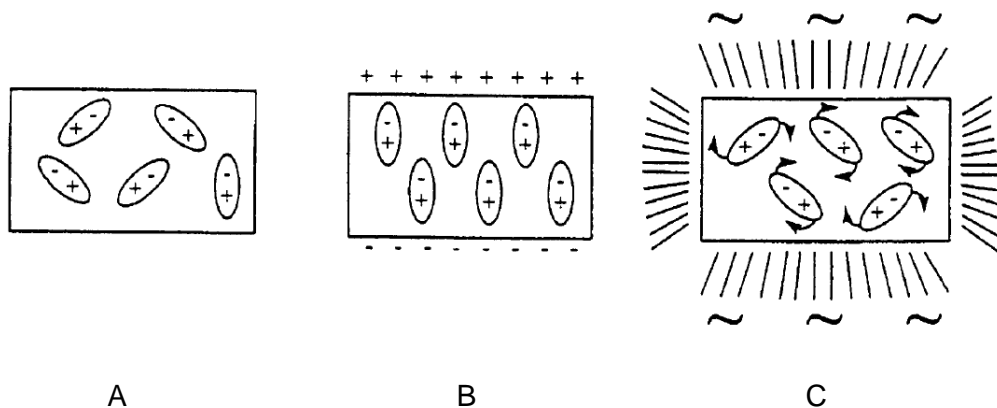
Un autre problème plus important de l'utilisation de cette réaction est le manque de stéréosélectivité du centre chiral formé. Bien que cela ne constitue pas un défaut en soit dans une optique de chimie combinatoire puisque le dédoublement de stéréochimie donne plus de produits en moins de temps, on ne peut en dire autant dans leur utilisation dans le cadre d'une synthèse totale où l'arrangement des atomes dans l'espace importe.<sup>119,120</sup>

### **Conditions de la réaction de Ugi**

La U-4CR était classiquement effectuée dans le méthanol, puisque ce solvant effectue des liens H avec l'eau générée par la déshydratation entre l'amine et l'aldéhyde, empêchant cette dernière de réagir pour former des sous-produits non désirés.<sup>121</sup> En général, il est maintenant reconnu que la réaction de Ugi performe très bien dans les solvants organiques polaires protiques. Initialement, la U-4CR était majoritairement utilisée pour synthétiser de petits hétérocycles qui utilisaient des réactifs qui sont généralement solubles dans de telles conditions. Cependant, pour effectuer de la macrocyclisation de peptides ou de la liaison de fragments, le méthanol n'est certainement pas le solvant de prédilection pour solubiliser des peptides de 15 acides aminés et plus, surtout si toutes les chaînes latérales du peptide sont protégées.<sup>56</sup> C'est pourquoi, d'autres conditions de solvants ont été développées au cours des dernières années pour que la réaction puisse s'effectuer aussi bien avec des molécules hydrophiles qu'hydrophobes. Parmi les conditions de solvants intéressantes pour la réaction de Ugi, on dénombre notamment l'utilisation de MeOH/DCM (1 :1),<sup>40</sup> THF/MeOH (1 :1),<sup>122</sup> CHCl<sub>3</sub>/MeOH (1 :1),<sup>123</sup> CHCl<sub>3</sub>/MeOH/TMOF (1 :1 :1),<sup>124</sup> MeCN/MeOH (1 :1),<sup>125</sup> 2,2,2-trifluoroéthanol (TFE)<sup>111</sup> et finalement de 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropan-2-ol (HFIP).<sup>126</sup> Les deux dernières options sont relativement intéressantes, car ce sont des solvants reconnus pour améliorer la solubilité des peptides protégés.<sup>56</sup>

Comme la réaction de Ugi a été effectuée maintes fois sur support solide polymérique, le choix du solvant pour faire gonfler la résine est également important pour pouvoir tirer profit au maximum de cet outil. Ainsi, le méthanol n'est pas non plus le solvant de choix pour réussir à faire gonfler adéquatement les supports solides de polystyrène, ce qui explique l'utilisation de mélanges tels que DCM/MeOH dans ces cas en particulier.<sup>127</sup> L'utilisation de support solide à base de polyéthylène glycol pourrait peut-être permettre d'utiliser d'autres systèmes de solvants plus polaires étant donné sa capacité à gonfler dans ce type de solvants.<sup>40, 46</sup>

Outre ces aspects de solubilité et de gonflage de polymères, le temps de réaction est également un facteur intéressant à considérer pour la U-4CR. Si traditionnellement elle s'effectue entre 24 et 72 heures à température pièce,<sup>113,128,129</sup> il a été rapporté que l'utilisation de micro-ondes peut substantiellement accélérer la réaction afin qu'elle se termine en 20 minutes.<sup>40,130</sup> L'utilisation des micro-ondes en synthèse organique a été grandement utile depuis sa découverte en 1986 par Gedye.<sup>131</sup> Au niveau moléculaire, "l'effet micro-ondes" peut s'expliquer via l'orientation des dipôles des molécules dans l'espace (Figure 18).<sup>132</sup>



**Figure 18.** Orientation des dipôles selon le champ magnétique induit. Représentation des dipôles sans contraintes (**A**), dans un champ électrique continu (**B**), et dans un champ électrique alternatif à haute fréquence (**C**).<sup>132</sup>

Il est possible de remarquer que les molécules contenant des dipôles bougent beaucoup lorsqu'irradier sous micro-ondes, créant une polarisation diélectrique.<sup>133</sup> Ceci a pour effet de mieux répartir la température dans le mélange réactionnel lorsque le solvant est polaire, ce qui peut améliorer la cinétique d'une réaction. Toutefois, l'effet le plus important des micro-ondes consiste à stabiliser les états de transition portant un dipôle. Ainsi, lorsqu'une transition d'une molécule relativement neutre à un état de transition polaire est nécessaire à une réaction, cette dernière est généralement lente à température pièce. De fait, sous micro-ondes, l'état de transition est stabilisé, ce qui le rend plus accessible via le niveau fondamental, accélérant la réaction.<sup>132</sup> Comme dans le cas de la réaction de Ugi, beaucoup d'états de transitions possédant des dipôles entrent en jeu, il n'est pas surprenant que les micro-ondes accélèrent cette réaction.



## **Chapitre 2**

### **Hypothèse de travail et objectifs**

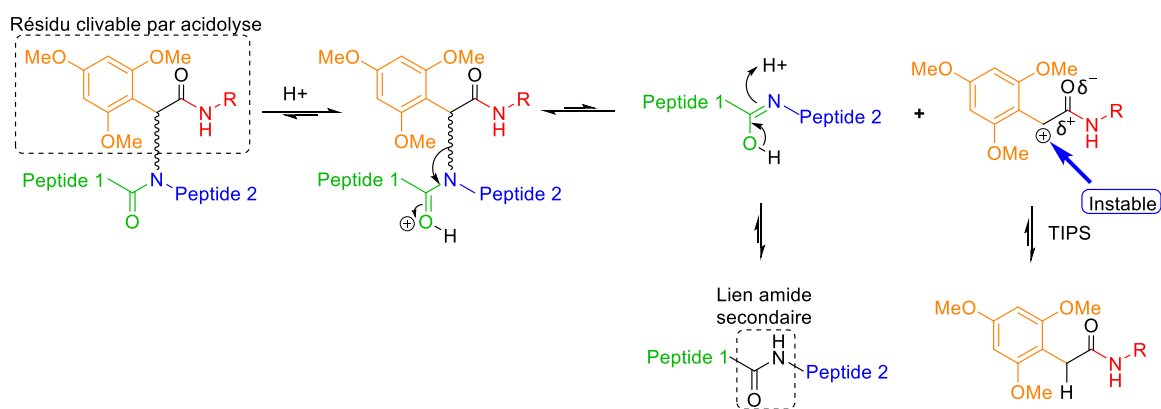


## 2.1 Hypothèses de travail

À la lumière de ce qui a été énoncé jusqu'à présent, les peptides sont une classe de molécules qui attirent beaucoup l'attention, notamment en tant qu'agents thérapeutiques. Toutefois, bien que plusieurs approches de couplages de fragments peptidiques et de cyclisation existent, aucune ne semble être parfaite, ce qui laisse place aux nouvelles découvertes dans le domaine afin de pouvoir accéder à des structures peptidiques inédites et prometteuses.

La réaction de Ugi est d'autant plus intéressante à ces fins, car elle permet l'obtention de composés complexes en une seule étape via une grande force thermodynamique de réaction, et forme notamment un lien amide entre l'amine et l'acide carboxylique utilisés dans la réaction. De plus, cette réaction a été démontrée compatible avec le support solide, en plus de pouvoir se compléter rapidement sous irradiations de micro-ondes.

Les études préliminaires réalisées par Waki en 1977 ont notamment attiré notre attention puisqu'il fait état d'une déprotection sélective post-U-4CR de l'amide tertiaire contenant un aldéhyde électrodonneur et un isonitrile (Figure 1). Bien qu'ils soient capables de cliver via acidolyse le groupement labile sur le squelette amide nouvellement formé seulement avec de faibles rendements, nous nous sommes intéressés au principe de base en nous disant qu'il était possible d'optimiser ce clivage sélectif et de l'appliquer à différentes facettes de la chimie des peptides. En utilisant notamment un aldéhyde plus électrodonneur comme le 2,4,6-triméthoxybenzaldéhyde combiné à l'utilisation des micro-ondes, nous croyons être en mesure de stabiliser l'état de transition instable, et ainsi, améliorer l'efficacité de la réaction.



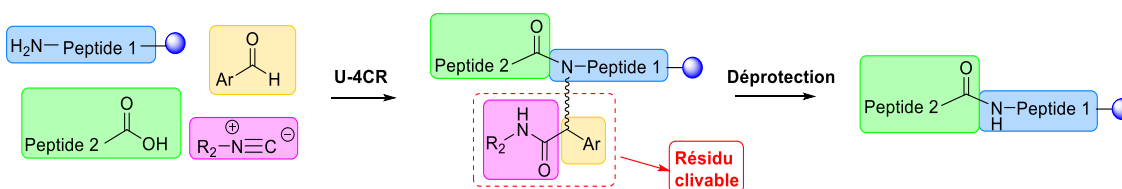
**Figure 1.** Hypothèse mécanistique de déprotection du squelette amide post-U-4CR.

## 2.2 Objectifs

À partir de l'hypothèse que l'acidolyse du résidu clivable peut être optimisée jusqu'à une déprotection quantitative de l'amide peptidique, l'objectif général de mon projet de recherche est d'appliquer cette stratégie de Ugi/déprotection pour générer des liens peptidiques et synthétiser des peptides complexes. Le reste du mémoire sera séparé en deux projets distincts, le tout ayant pour but de pouvoir ultimement synthétiser des peptides complexes jusqu'à présent inaccessibles avec les méthodes existantes.

Dans la première partie de mon projet, le chapitre 3, l'objectif est de développer et d'optimiser une méthode de liaison de fragments peptidiques par l'approche réaction de Ugi/déprotection (Figure 2). Pour atteindre cet objectif, je devrai atteindre certains objectifs plus spécifiques :

- 1) Synthétiser des peptides modèles;
- 2) Effectuer la réaction de Ugi avec les peptides modèles et différents aldéhydes pour évaluer l'impact des propriétés électrodonneurs sur l'acidolyse subséquente;
- 3) Optimiser la U-4CR en testant différents solvants pour trouver une alternative au méthanol et en évaluant d'autres conditions comme le temps de réaction, le type de chauffage et le type de support solide;
- 4) Vérifier le taux d'épimérisation lors de la liaison des fragments peptidiques. Un système comprenant une phénylalanine en C-terminal du fragment N-terminal déterminera s'il y a conservation ou perte de la stéréochimie lors de la liaison par U-4CR;
- 5) Finalement, une fois toutes les conditions analysées, la méthode sera appliquée pour synthétiser des peptides complexes.

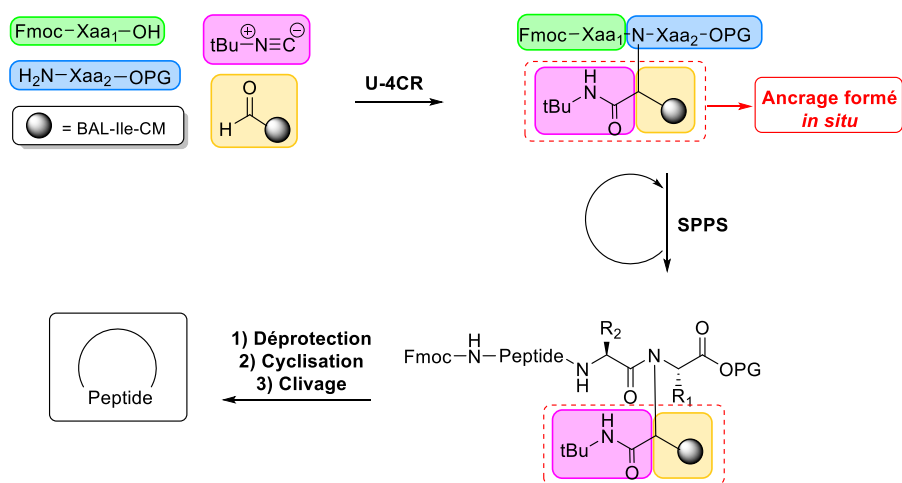


**Figure 2.** Approche proposée pour lier deux fragments peptidiques par U-4CR.



Par la suite, dans la deuxième partie de ce mémoire, le chapitre 4 a pour but de développer une méthode de synthèse de peptides cyclique par ancrage sur le squelette amide via U-4CR (Figure 3). Pour ce faire, les objectifs spécifiques sont :

- 1) Synthétiser un support solide fonctionnalisé avec un aldéhyde disponible à réagir;
- 2) Optimiser la réaction de Ugi sur ce support solide pour ancrer en une seule étape deux acides aminés le plus efficacement possible;
- 3) Confirmer la compatibilité de l'ancrage formé par U-4CR avec la synthèse peptidique traditionnelle et avec une approche par couplage de fragments;
- 4) Synthétiser des acides aminés possédant des groupements protecteurs orthogonaux sur l'acide carboxylique permettant la synthèse de peptides cycliques;
- 5) Appliquer la méthode à la synthèse de peptides linéaires, cycliques et bicycliques fonctionnalisés.



**Figure 3.** Approche proposée pour ancrer deux acides aminés sur un support solide par U-4CR.



## **Chapitre 3**

**Utilisation de la réaction de Ugi dans le  
design et le développement d'une nouvelle  
méthode de couplage de fragments  
peptidiques**

## Avant-propos

Ce 3<sup>e</sup> chapitre de mon mémoire est constitué d'un article scientifique qui a été soumis au journal *Organic and Biomolecular Chemistry* le 27 octobre 2016, accepté le 9 novembre 2016 et publié en ligne le 14 novembre 2016. Par la suite, il a été incorporé au volume 14 de 2016 aux pages 11230 à 11237. Le numéro d'identification du papier est 10.1039/C6OB02342H.

De nombreux auteurs ont contribué au projet. D'abord, Sindy-Marcela Galindo, Xinxia Liang et Simon Vézina-Dawod ont effectué les premiers tests démontrant que la méthode était prometteuse. Ces travaux très préliminaires ont été effectués avant que je travaille sur le projet, me pavant ainsi le chemin vers des découvertes plus importantes.

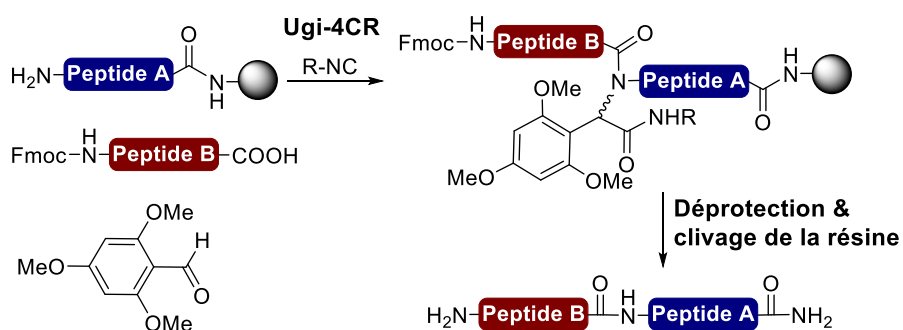
Ensuite, il y a Alexia Méjean qui a été stagiaire sous ma supervision lors de l'été 2016. Sa contribution au projet a été de tester les limites de la méthode et de tenter de comprendre divers phénomènes que l'on observait, mais dont l'explication logique nous échappait. Pour ce travail lors de ses 10 semaines de stage, elle méritait une place de choix dans la liste d'auteurs.

Mon directeur de recherche, Éric Biron, a supervisé et fait le design des travaux en donnant des idées novatrices à expérimenter en laboratoire. Il a également participé très activement à la rédaction du manuscrit.

Pour ma part, j'ai mené la grande majorité des expériences se trouvant dans ce papier, effectué la mise en forme des données expérimentale dans le document du matériel supplémentaire joignant cet article, en plus de rédiger le plan et le brouillon de l'article.

## Résumé

Une nouvelle méthodologie pour coupler des fragments peptidiques sur support solide en utilisant la réaction multicomposante de Ugi suivie d'une déprotection est décrite dans ce manuscrit. L'approche utilise les irradiations micro-ondes pour attacher à l'aide d'une réaction multicomposante de Ugi, un fragment peptidique dont l'extrémité C-terminale est libre à un fragment supporté qui porte l'amine libre afin de former un lien amide tertiaire. Par la suite, cette protection de lien amide peut être efficacement retiré par acidolyse avec de l'acide trifluoroacétique sous irradiations de micro-ondes afin de fournir le peptide lié totalement déprotégé. Cette approche rapide et efficace de Ugi/déprotection sur support a été appliquée pour condenser des fragments peptidiques de différentes longueurs et produire une variété de peptides.



**Toward solid-phase peptide fragment ligation by a traceless-Ugi  
multicomponent approach**

Steve Jobin, Alexia Méjean, Sindy-Marcela Galindo, Xinxia Liang, Simon Vézina-  
Dawod and Eric Biron\*

*Faculté de pharmacie, Université Laval, Québec (QC), G1V 0A6, Canada*

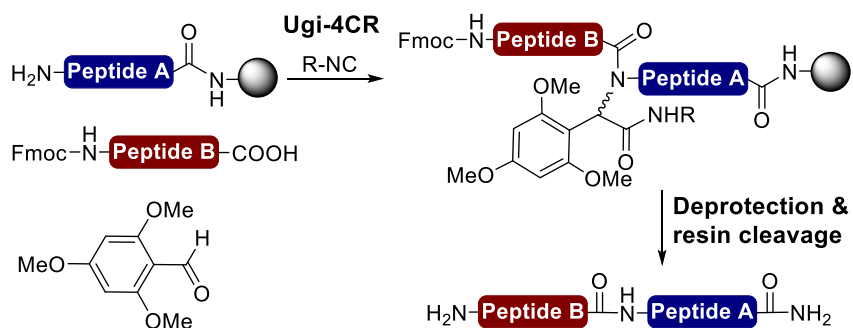
and

*Laboratoire de chimie médicinale, Centre de recherche du Centre Hospitalier Universitaire  
de Québec (CHUL Section), 2705 Boulevard Laurier, Québec, Québec. G1V 4G2, Canada*

\*Corresponding author: E-mail : [Eric.Biron@pha.ulaval.ca](mailto:Eric.Biron@pha.ulaval.ca)

## Abstract

A new methodology to couple peptide fragments on solid support using a traceless isocyanide-based multicomponent reaction is described. The approach uses a microwave-assisted on-resin Ugi four-component reaction to attach a carboxyl free peptide to a supported peptide bearing a free N-terminal amine *via* the formation of an *N*-protected amide bond at the ligation site. Afterward, the generated backbone amide protecting group can be efficiently removed by microwave-assisted acidolysis with trifluoroacetic acid to afford a fully deprotected peptide. This straightforward Ugi reaction/deprotection approach was applied to condense various fragment lengths and provided a variety of oligopeptides.



## Introduction

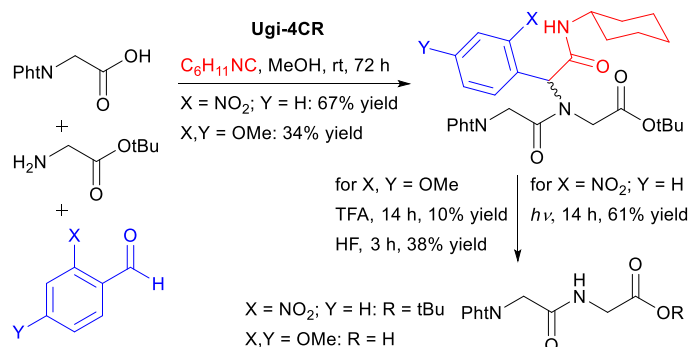
Peptides and small proteins are very useful tools in chemical biology and their attractive pharmacological profile has increased their use in drug development and the interest in peptide-based therapeutics.<sup>1,2</sup> The chemical synthesis of peptides has remarkably progressed since the first work of Bruce Merrifield on solid-phase peptide synthesis (SPPS) in 1963.<sup>3</sup> A great number of synthetic improvements including more efficient coupling reagents,<sup>4,5</sup> solid supports,<sup>6–9</sup> linkers,<sup>10,11</sup> and orthogonal protecting groups<sup>12</sup> have emerged to overcome difficulties associated with SPPS and access a wide variety of peptides.<sup>13–15</sup>

Currently, peptides prepared by stepwise amino acid additions *via* SPPS are generally limited to approximately 50 residues.<sup>15,16</sup> The convergent synthesis approach, involving the condensation of peptide fragments, has led to the development of several ligation methods that allowed the preparation of long peptide chains and small proteins.<sup>16–19</sup> Beside fragment condensation with standard coupling reagents, most of these methods such as the Native Chemical Ligation (NCL),<sup>20</sup>  $\alpha$ -ketoacid-hydroxylamine ligation (KAHA),<sup>21,22</sup> salicylaldehyde (SAL) ester-mediated ligation<sup>23</sup> and traceless-Staudinger ligation<sup>24,25</sup> are compatible with unprotected peptide fragments. But on the other hand, they generally require special C-terminal modifications (*e.g.* thioesterification for NCL and Staudinger ligation), thiol-modified amino acids or a specific N-terminal residue (*e.g.* Cys for NCL or Ser/Thr for SAL) at the ligation site. Based on these ligation strategies, we were looking for a straightforward approach that does not require C- or N-terminal modified fragments, has no or few residue restriction at the ligation site, and could be performed on solid support.

In this regard, the Ugi four-component reaction (Ugi-4CR) is very attractive as it offers a great input diversity to access complex molecules with high efficiency and atom economy.<sup>26–31</sup> The Ugi-4CR involves the reaction of isocyanide, carboxylic acid, amine and carbonyl compounds to afford an  $\alpha$ -acylamino amide.<sup>30,31</sup> As the generated tertiary amide bond is formed between the amine and the acid components, the Ugi-4CR has been successfully used in the preparation of linear and macrocyclic peptides.<sup>32–40</sup> While most reported methods yield an *N*-substituted peptide bond at the ligation site, utilize C-terminal convertible isocyanide, involve N-terminal isocyanide or afford mixture of diastereoisomers



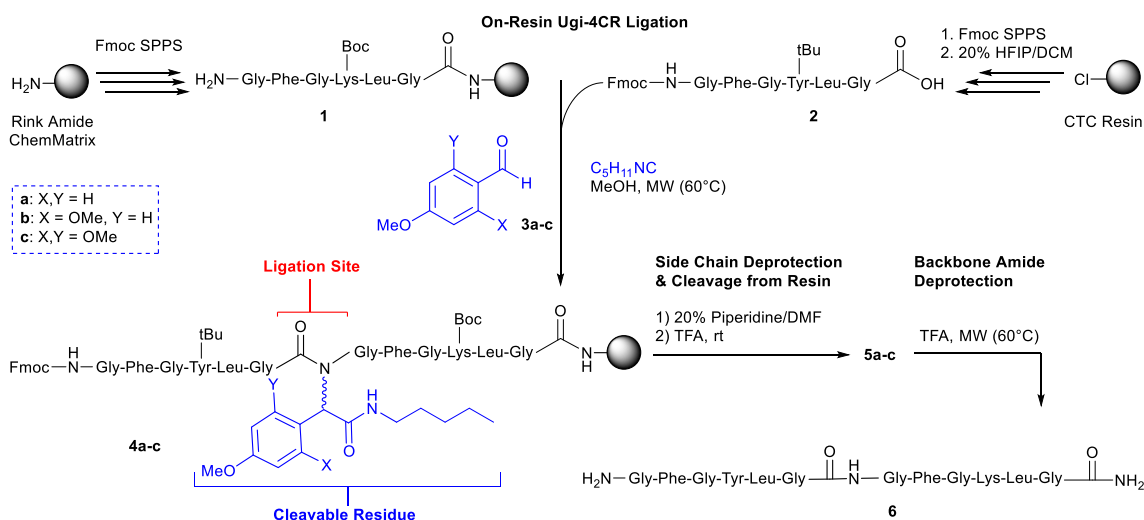
when carbonyl compounds other than formaldehyde are used, a study described by Waki and Meienhofer in 1977 has particularly drawn our attention.<sup>40</sup> In this pioneering work, different benzaldehyde derivatives were used in a Ugi-4CR with a glycine ester, phthalylglycine and cyclohexyl isocyanide to generate a peptide bond bearing an *N*-substituent that could be subsequently cleaved to afford a dipeptide (Scheme 1).



**Scheme 1.** Peptide bond formation by a sequential Ugi-4CR and *N*-substituent cleavage described by Waki and Meinhofer.<sup>40</sup>

Acting as a backbone amide protecting group, the *N*-substituent was successfully removed by different cleavage strategies such as photolysis and acidolysis. Another advantage to consider with this approach is that backbone protecting groups have been shown to decrease aggregation during synthesis and increase the solubility of the growing protected peptide on solid support.<sup>13,15</sup> This Ugi-4CR/deprotection approach was very promising to develop a solid-phase fragment coupling method but its application was limited by moderate yields and long reaction times for the Ugi-4CR and *N*-substituent cleavage (Scheme 1).<sup>40</sup>

In order to improve and accelerate the Ugi-4CR and backbone amide deprotection by acidolysis at the ligation site, our strategy was to use microwave (MW) irradiations in both steps (Scheme 2). Herein we report our results concerning the development of a solid-phase traceless-Ugi-4CR ligation approach to couple standard unmodified peptide fragments.



**Scheme 2.** Synthesis of model peptide fragments and solid-phase traceless Ugi-4CR ligation.

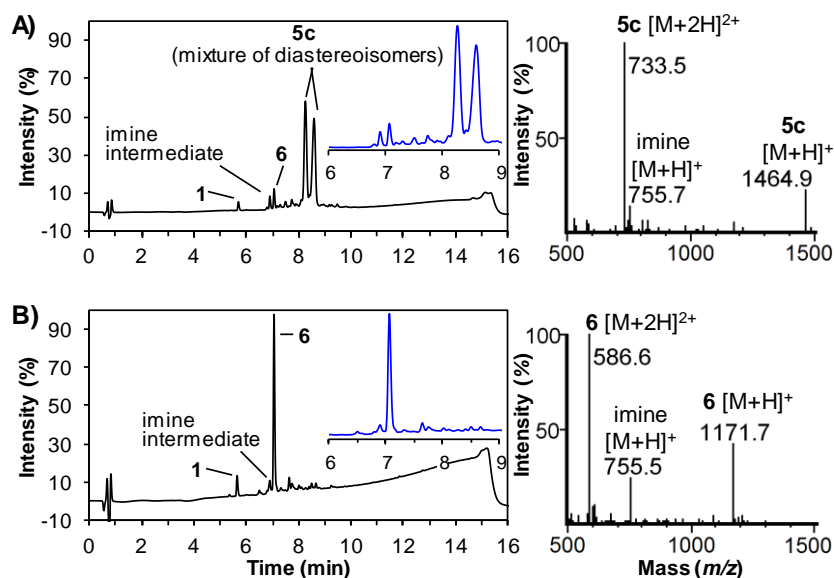
## Results and discussion

To evaluate the efficiency of the on-resin Ugi-4CR, a first series of N- and C-terminal fragments were synthesized by standard Fmoc/*t*Bu chemistry (Scheme 2). First, the anchored C-terminal model peptide **1** was prepared on Rink Amide ChemMatrix® (CM) and the Fmoc group removed to yield the free amine. CM resin was selected to perform the ligation because of its compatibility with polar solvents such as MeOH and other alcohols usually used in Ugi-4CR and its ability to form aggregation-disrupting interactions with growing peptides.<sup>7</sup> At the same time, the N-terminal peptide fragment **2** was assembled on 2-chlorotrityl chloride (CTC) resin and cleaved from the resin with a solution of hexafluoroisopropanol (HFIP). After solvent removal, the protected peptide acid fragment **2** was analyzed to ensure sufficient purity and used without further purification. For the benzaldehyde derivatives, the selection was based on their commercial availability, price and acid sensitivity of the benzyl counterpart as protecting group. As several acid labile backbone amide protectors are composed of methoxy-substituted benzyl structures,<sup>12</sup> methoxy-substituted benzaldehyde derivatives **3a-c** were selected to generate the cleavable *N*-substituent and allow acid sensitivity tuning for the identification of the optimal cleavage conditions (Scheme 2).

Initial Ugi-4CR ligations were performed with peptides **1** and **2** (1.2 equiv.) in presence of aldehyde **3a** (5 equiv.) and 1-pentyl isocyanide (5 equiv.) in MeOH under MW irradiations in a sealed vial at 60 °C for 1 h (Scheme 2). After Fmoc removal on supported peptide **4a** and cleavage from the resin with a trifluoroacetic acid (TFA) cocktail, the product **5a** was obtained in 72% yield and analyzed by HPLC-MS. As expected, a mixture of diastereomers was observed since a new racemic stereocenter is formed during the Ugi-4CR (Fig. S3 ESI†).<sup>26–31</sup> However, the impact of this generated chiral center on the final product is minimized by the fact that it will be removed during the backbone amide deprotection step (Scheme 2). Moreover, the presence of only two diastereomers confirmed that the peptide's stereochemistry is conserved. Afterward, removal of the *N*-substituent at the ligation site was performed by treatment of peptide **5a** with a TFA cocktail with MW heating at 60 °C for 1 h in a sealed vial as reported for various monoalkoxy backbone amide linker.<sup>41</sup> In this case, only partial deprotection of the backbone amide was observed and peptide **6** was obtained in 32% yield (Table S1 ESI†). Nevertheless, this result was very encouraging and represents a significant improvement compared to the 10% yield previously reported for the cleavage of a dimethoxybenzyl derivative with TFA for 14 h (Scheme 1).<sup>40</sup>

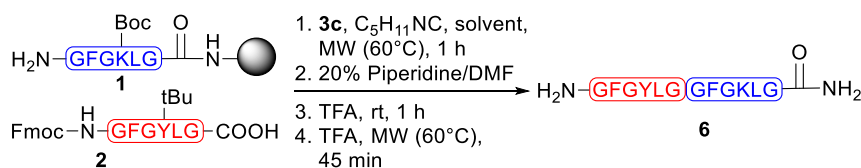
It is important to notice that compared to standard *N*-benzyl amide cleavage, an additional challenge is faced in this approach during ligation site deprotection due to the substitution of the benzylic position. In this case, the carbenium ion formed during acidolysis is not favorized because of the inductive effect of the carboxamide group (Scheme 2). As a result, the resonance stability provided by a monomethoxy substituted aromatic ring is insufficient to allow efficient cleavage. Therefore, benzaldehydes bearing two (**3b**) or three (**3c**) methoxy substituents were used to provide more resonance stabilization. After on-resin Ugi-4CR with **1**, **2** and **3b** or **c**, Fmoc removal on **4b** and **4c** and treatment with TFA at room temperature, peptides **5b** and **5c** were obtained as a mixture of diastereomers in HPLC analyses (Fig. 1A and S4 ESI†). Surprisingly, a small quantity of fully deprotected peptide **6** was observed in the case of the trimethoxybenzyl analog **4c** (Fig. 1A). In the presence of TFA with MW heating at 60 °C, compound **5b** was converted into peptide **6** in 69% yield after 1 h (Table S1 ESI†). On the other hand, the backbone amide deprotection of compound **5c** was completed after 45 min under the same conditions and peptide **6** was obtained in 77% crude purity (Fig. 1B). The two most important impurities observed in the

HPLC analyses were the precursor peptide **1** and the trimethoxybenzylimine intermediate. As expected, the trimethoxybenzyl derivative **5c** was the most labile and with complete cleavage in 45 min, these results showed that MW irradiations significantly accelerate and improve *N*-substituent acidolysis with TFA. Therefore, 2,4,6-trimethoxybenzaldehyde **5c** was selected to perform the next experiments.



**Figure 1.** HPLC and MS profiles of crude products after cleavage from resin and deprotection showing Ugi-4CR product **5c** and final peptide **6**. (A) After Fmoc removal on **4c** and treatment with TFA for 1 h. (B) After treatment of **5c** with TFA under MW heating at 60 °C for 45 min ( $\lambda = 220$  nm).

Since the solubility of the protected fragments in MeOH can be a limitation, different solvents were evaluated to perform the on-resin Ugi-4CR (Table 1). The Ugi reaction has been shown to work better in polar protic solvent but a wide variety of solvents have also been successfully used. Unfortunately, besides 2,2,2-trifluoroethanol (TFE) with 78% yield (entry 6), no Ugi products were obtained in solvents with strong dissolving power for poorly soluble protected peptides such as DMF, DMSO and HFIP (entries 3–5). However, solvent mixtures containing MeOH yielded the best results with 89–99% conversion rates and 64–88% crude purities of peptide **6** (Table 1, entries 7–11). The best result was obtained with MeCN/MeOH (1:1) (entry 11) and the next experiments were made with this mixture.

**Table 1.** Selection of optimal solvent for the on-resin Ugi-4CR

Entry	Solvent	Conversion (%) <sup>a</sup>	Crude purity (%) <sup>b</sup>
1	MeOH	90	77
2	DCM	59	49
3	DMF	0	0
4	DMSO	0	0
5	HFIP	0	0
6	TFE	78	53
7	DCM/MeOH (1:1)	98	73
8	THF/MeOH	89	64
9	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (1:1)	93	73
10	CHCl <sub>3</sub> /MeOH/TMOF (1:1:1)	94	79
11	MeCN/MeOH (1:1)	99	88

<sup>a</sup>Conversion rate of C-terminal fragment **1** into peptide **6** and <sup>b</sup>crude purities were determined by HPLC.

We next tested different reaction times for the on-resin Ugi-4CR step in the synthesis of peptide **6** at room temperature, under MW irradiations or reflux to identify the optimal reaction conditions (Table 2). For the MW conditions, the best result was obtained with heating for 1 h (entry 2) as lower conversion was observed with shorter reaction time (entry 1) and lower crude purities were obtained with longer irradiation time (entry 3). No improvement was observed with conventional heating as products with lower purities were obtained (entries 4 and 5). At room temperature, a reaction time of 72 h was necessary to obtain comparable results with a 97% conversion rate and 81% crude purity (entry 8). These results showed that MW irradiations significantly accelerate and improve the Ugi-4CR on solid support and that the reaction time strongly influences the purity of the final compound.

**Table 2.** Selection of the optimal reaction conditions for the on-resin Ugi-4CR in the synthesis of peptide **6**<sup>a</sup>

Entry	Temperature	Reaction time	Conversion (%) <sup>b</sup>	Crude purity (%) <sup>c</sup>
1	MW (60°C)	0.5 h	90	46
2		1 h	99	88
3		2 h	97	74
4	Reflux	1 h	89	56
5		4 h	91	60
6	rt	24 h	92	55
7		48 h	97	74
8		72 h	97	81

<sup>a</sup>Synthesis was performed as described in Table 1 using MeCN/MeOH 1:1 as solvent and various temperature and reaction time. <sup>b</sup>Conversion rate of C-terminal fragment **1** into peptide **6** and <sup>c</sup>crude purities were determined by HPLC.

The compatibility of other solid supports such as polystyrene and TentaGel resins with the solid-phase Ugi-4CR ligation was addressed using the optimized reaction conditions (Table **S2** ESI†). In this case, conversion rates around 90% were observed for both resins but the final peptide **6** was obtained in 75% and 68% crude purities for Rink Amide polystyrene and TentaGel resins, respectively. These results confirmed that CM resin is the most efficient to perform the Ugi-4CR on solid support under MW irradiations.

To evaluate the applicability of the Ugi-4CR ligation in the synthesis of more complex peptides, the method was applied to longer peptide fragments and repeated to perform multiple fragment condensations. As peptide fragments of 6 to 15 residues have been shown to be optimal in the convergent SPPS,<sup>42</sup> C- and N-terminal fragments of 6, 10 and 15 residues were prepared and used without purification in the ligation reaction. First, to compare the efficiency of our approach to standard fragment coupling reactions, protected peptides **1** and **2** were condensed with coupling reagents including HATU, PyAOP and *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC) (Table **3**). Surprisingly, compared to the Ugi-4CR ligation, lower crude purities and isolated yields were obtained with the coupling reagents. In this case, peptide **6** was isolated in 45, 33, and 35% yields after fragment coupling with HATU, PyAOP and DIC, respectively. These results showed that the described approach

can be very efficient to couple protected peptide fragments. Next, two on-resin Ugi-4CR were performed back to back with peptide **2** on supported fragment **1** by doing a ligation/deFmoc/ligation sequence. After cleavage from the resin and removal of side chain and backbone protecting groups, peptide **7** was obtained in 55% crude purity and isolated with a 24% yield after HPLC purification. Afterward, longer fragments were used in the Ugi-4CR to prepare 16-mers **8** and **9** (6 + 10), 20-mers **10** and **11** (10 + 10), 21-mer **12** (6 + 15), 25-mer **13** (10 + 15) and 30-mer **14** (15 + 15) peptides.

**Table 3.** Crude purities and isolated yields for peptides prepared by solid-phase traceless-Ugi-4CR

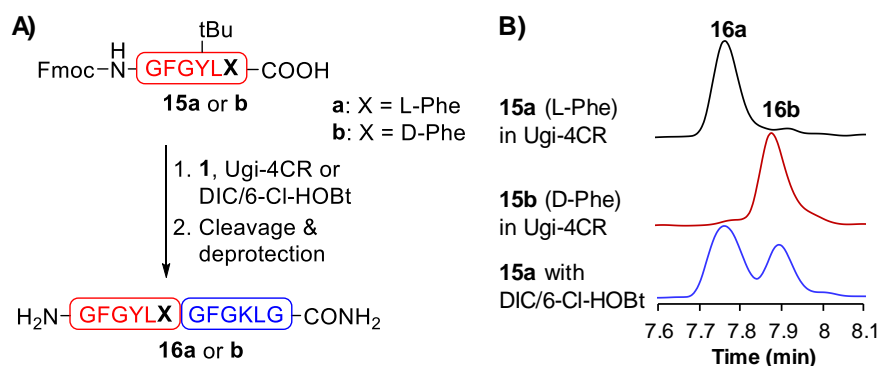
Oligomer	Sequence <sup>a</sup>	Purity <sup>b</sup> (%)	Yield <sup>c</sup> (%)
<b>6</b>	GFGYL <u>GG</u> FGKLG	88	57
<b>6<sup>d</sup></b>	GFGYL <u>GG</u> FGKLG	62	45
<b>6<sup>e</sup></b>	GFGYL <u>GG</u> FGKLG	50	33
<b>6<sup>f</sup></b>	GFGYL <u>GG</u> FGKLG	65	35
<b>7</b>	GFGYL <u>GG</u> FGYL <u>GG</u> FGKLG	55	24
<b>8</b>	GFGYL <u>GG</u> FGKISGLYG	81	45
<b>9</b>	GFGYL <u>GG</u> FGKLGIVG	83	46
<b>10</b>	GFGYLGKCF <u>GG</u> FGKISGLYG	89	26
<b>11</b>	GFGYLGKCF <u>GG</u> FGKLGIVG	85	54
<b>12</b>	GFGYL <u>GG</u> FGVAYKIGLFAPGA	75	69
<b>13</b>	GFGYLGKCF <u>GG</u> FGVAYKIGLFAPGA	43	20
<b>14</b>	GFGAKLYVGICGP <u>AGG</u> FGVAYKIGLFAPGA	33	6

<sup>a</sup>Ligation site is underlined. <sup>b</sup>Crude purities were determined by HPLC. <sup>c</sup>Isolated yield after purification by preparative HPLC. Based on the experimental loading of 0.31 mmol/g for Rink Amide CM. <sup>d-f</sup>Coupling performed with **2** (1.2 equiv) for 3 h using <sup>d</sup>HATU (1.2 equiv) and NMM (2.4 equiv) in DMF; <sup>e</sup>PyAOP (1.2 equiv) and DIPEA (2.4 equiv) in DMF or <sup>f</sup>DIC (1.2 equiv) and 6-Cl-HOBt (1.2 equiv) in NMP.<sup>134</sup>

Beside compound **14**, the peptides were obtained with moderate to good crude purities ranging from 43 to 89% and isolated in 20 to 69% overall yields. While the reaction was very efficient with every tested C-terminal fragments and N-terminal fragments of 6 and 10 residues, the worst result has been obtained with the 15-mer N-terminal fragment. In this case, the HPLC-MS analyses showed a 33% crude purity for peptide **14** with 30% of C-terminal fragment and imine intermediate as the most important impurities. This result

suggests that the solubility of the fully protected peptides in MeCN/MeOH decreases with length and considerably limit the on-resin Ugi-4CR efficiency. Solvent mixtures containing more hydrophobic solvents such as CHCl<sub>3</sub> or TFE to increase the solubility of longer fragments were also tested. Unfortunately, no improvements in crude purities and yields have been observed. Other solvents and strategies to improve the solubility of longer fragments are currently under investigation. Nevertheless, it is important to underline that unpurified fragments were used in this study and that fragment purification prior to Ugi-4CR ligation would certainly increase the purity and isolated yield of the final peptides.

Another drawback commonly observed in solid-phase fragment coupling is C-terminal epimerization at the ligation site.<sup>15,42,44</sup> This problem is mainly due to the *N*<sup>ε</sup>-substituent of the C-terminal residue. Compared to *N*<sup>ε</sup>-Fmoc/Boc protected amino acids where the carbamate group prevents the formation of stereochemically labile oxazolone intermediate during coupling, the *N*<sup>ε</sup>-amino group of the C-terminal residue in peptide fragments is substituted by an acyl group that promotes oxazolone formation.<sup>42,45,46</sup> To evaluate epimerization during the Ugi-4CR on solid support, N-terminal fragments containing a C-terminal L-Phe **15a** or D-Phe **15b** were prepared as described above (Scheme 2) and used in the on-resin ligation reaction with peptide **1** (Fig. 2A). A Phe residue was used in the study because it is particularly prone to C-terminal epimerization.<sup>47</sup> Compared to coupling with DIC/6-Cl-HOBt where a 37% epimerized product was obtained, very low



**Figure 2.** (A) Synthesis of peptide **16** by coupling N-terminal fragment **15a** or **b** to peptide **1** and cleavage from resin and deprotection. (B) Enlarged HPLC traces ( $\lambda = 220$  nm) from 7.6 to 8.1 min of products obtained after Ugi-4CR with **15a** (top); Ugi-4CR with **15b** (middle) and coupling of **15a** with DIC/6-Cl-HOBt (bottom).



epimerization (<4%) was observed for peptides **16a** and **16b** with the on-resin microwave-assisted Ugi-4CR (Fig. **2B**). These results suggest that the described approach limits racemization during fragment condensation and could be used with a wide variety of amino acids.

## Conclusion

In summary, we report the use of a traceless-Ugi-4CR to efficiently couple peptide fragments on solid support. The study showed that the use of MW irradiations significantly improved and accelerated both on-resin Ugi-4CR coupling and backbone amide deprotection steps. With the help of MW irradiations, the entire ligation, resin cleavage and protecting groups removal cycle could be performed in approximately 3 h. The described approach is straightforward, does not require C- or N-terminal modifications of the fragments prior to ligation, yields unsubstituted peptide bond at the ligation site and seems to avoid C-terminal epimerization. Parameters such as the impact of MW temperature on purity, yield and epimerization; the compatibility and efficiency of C- and N-terminal amino acid residues at the ligation site; and the effect of reagents equivalents are currently under investigation to expand the applicability of the approach. Simple and affordable, the described method is likely to become a useful complementary approach in polypeptide synthesis.

## Experimental

### Materials and equipment

All the chemical reagents and solvents from commercial sources were used without further purification. Coupling reagents and amino acid derivatives were purchased from Matrix Innovation Inc. (Québec, QC, Canada). Rink Amide ChemMatrix® resin (0.41 mmol g<sup>-1</sup>) was purchased from PCAS Biomatrix (St-Jean-sur-Richelieu, QC, Canada), Rink Amide AM polystyrene resin (0.56 mmol g<sup>-1</sup>) from ChemImpex (Wood Dale, IL, USA) and TentaGel S NH<sub>2</sub> (130 μm, 0.29 mmol g<sup>-1</sup>) from Rapp Polymere (Tübingen, Germany). All other reagents and solvents were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Reactions on solid support were performed in filter columns (2 and 10 mL) from Roland

Vetter Laborbedarf OHG (Ammerbuch, Germany). RP-HPLC analyses were achieved on a Shimadzu Prominence instrument (Columbian, MD, USA) using a Phenomenex Kinetex column (4.6 mm × 100 mm, 2.6 μm XB-C18, 100 Å, 1.5 mL min<sup>-1</sup>) with a 10.5 min gradient from water (0.1% TFA) and MeCN (0.1% TFA) (MeCN 10–100%) and detection at 220 nm and 254 nm. LC-MS analyses were performed on a Shimadzu Prominence LCMS-2020 equipped with an ESI and APCI ion source. Microwave experiments were conducted on a Biotage Initiator microwave instrument (Charlotte, NC, USA) with 0.2–0.5 and 0.5–2 mL microwave vials. Peptides were synthesized on a Prelude peptide synthesizer from Protein Technologies (Tucson, AZ, USA). High-resolution mass spectrometry was performed on a Waters Synapt G2-Si (Quadrupole/TOF) with a Waters UPLC binary pump and FTN injector. The mass spectrometer was operated in High resolution mode and calibration done with a sodium formate solution and lock-mass correction using a Leucine-enkephaline solution (Waters).

### **Peptide synthesis**

Peptides were synthesized by standard Fmoc solid-phase synthesis.<sup>48,49</sup> Briefly, amino acid couplings were performed with a solution of Fmoc-Xaa-OH (3 equiv.), HCTU (3 equiv.) and *N*-methylmorpholine (NMM) (6 equiv.) in DMF for 20 min. The coupling step was repeated once and the resin washed with DMF (5×). The Fmoc protecting group was removed by treating the resin twice with a solution of 20% piperidine in DMF (v/v) for 8 min followed by washing with DMF (5×).

### **Preparation of C-terminal peptide fragments.**

A Rink Amide resin was swelled in DMF and the first amino acid couple by standard Fmoc solid-phase synthesis. The loading capacity of the resin was determined by the Fmoc dosage assay described by Gude *et al.*<sup>50</sup> and estimated to 0.31 mmol g<sup>-1</sup> for Fmoc-Gly-Rink Amide ChemMatrix. After peptide synthesis, the N-terminal Fmoc protecting group was removed the resin washed with DMF (5×), DCM (5×), MeOH (5×) and dried *in vacuo*. To characterize the product on resin, a small amount of resin (~10 mg) was treated with a solution of TFA, water and triisopropylsilane (TIPS) (95:2.5:2.5) for 1 h followed by filtration and washing with DCM (2×). The filtrate was evaporated under reduced pressure and the resulting mixture precipitated with cold diethyl ether. The solid was washed twice with diethyl ether and dried under vacuum to be analyzed by HPLC and ESI-MS.

*H-Gly-Phe-Gly-Lys-Leu-Gly-NH<sub>2</sub>* (**1**): 95% crude purity; RP-HPLC  $t_R$  = 6.42 min; ESI-MS  $m/z$ : 577.40 [M + H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>27</sub>H<sub>45</sub>N<sub>8</sub>O<sub>6</sub>: 577.35.

*H-Gly-Phe-Gly-Lys-Ile-Ser-Gly-Leu-Tyr-Gly-NH<sub>2</sub>*: 98% crude purity; RP-HPLC  $t_R$  = 6.72 min; ESI-MS  $m/z$ : 997.60 [M + H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>47</sub>H<sub>73</sub>N<sub>12</sub>O<sub>12</sub>: 997.55.

*H-Gly-Phe-Gly-Lys-Leu-Gly-Tyr-Ile-Val-Gly-NH<sub>2</sub>*: 99% crude purity; RP-HPLC  $t_R$  = 6.94 min; ESI-MS  $m/z$ : 1009.65 [M + H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>49</sub>H<sub>77</sub>N<sub>12</sub>O<sub>11</sub>: 1009.58.

*H-Gly-Phe-Gly-Val-Ala-Tyr-Lys-Ile-Gly-Leu-Phe-Ala-Pro-Gly-Ala-NH<sub>2</sub>*: 98% crude purity; RP-HPLC  $t_R$  = 7.37 min; ESI-MS  $m/z$ : 1466.80 [M + H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>72</sub>H<sub>108</sub>N<sub>17</sub>O<sub>16</sub>: 1466.82.

### **Preparation of N-terminal peptide fragments.**

Synthesis of N-terminal peptide fragments bearing a free carboxylic acid was carried out on 2-chlorotrityl chloride (CTC) resin. The first amino acid (3 equiv.) was attached to the resin in presence of diisopropylethylamine (DIEA) (7 equiv.) in DCM (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) for 3 h. After filtration the remaining trityl chloride groups were capped by a solution of DCM, MeOH, DIEA (17:2:1; v:v:v) for 15 min. Then, the peptide was assembled by standard Fmoc solid-phase synthesis and the resin washed thoroughly with DMF (5x) and DCM (5x). The fully protected peptide was released from the resin with a solution of 20% HFIP in DCM (v/v) for 30 min. The resin was filtered and the solvent removed under reduced pressure and the resulting mixture precipitated with cold diethyl ether. The solid was washed twice with diethyl ether and dried under vacuum to be analyzed by HPLC and ESI-MS. The peptides were used without further purification in Ugi-4CR ligation.

*Fmoc-Gly-Phe-Gly-Tyr(tBu)-Leu-Gly-OH* (**2**): 99% purity; RP-HPLC  $t_R$  = 11.12 min; ESI-MS  $m/z$ : 889.55 [M - H]<sup>-</sup>; calcd for C<sub>49</sub>H<sub>57</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub>: 889.41.

*Fmoc-Gly-Phe-Gly-Tyr-Leu-Gly-Lys-Cys-Phe-Gly-OH*: 82% crude purity; RP-HPLC  $t_R$  = 9.09 min; ESI-MS  $m/z$ : 1270.55 [M + H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>65</sub>H<sub>80</sub>N<sub>11</sub>O<sub>14</sub>S: 1270.56.

*Fmoc-Gly-Phe-Gly-Ala-Lys-Leu-Tyr-Val-Gly-Ile-Cys-Gly-Pro-Ala-Gly-OH*: 72% crude purity; RP-HPLC  $t_R$  = 8.93 min; ESI-MS  $m/z$ : 1631.75 [M + H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>80</sub>H<sub>111</sub>N<sub>16</sub>O<sub>19</sub>S: 1631.78.

*Fmoc-Gly-Phe-Gly-Tyr(tBu)-Leu-Phe-OH (15a)*: 92% crude purity; RP-HPLC  $t_R$  = 11.65 min; ESI-MS  $m/z$ : 979.45  $[M - H]^-$ ; calcd for  $C_{56}H_{63}N_6O_{10}$ : 979.46.

*Fmoc-Gly-Phe-Gly-Tyr(tBu)-Leu-D-Phe-OH (15b)*: 76% crude purity; RP-HPLC  $t_R$  = 11.76 min; ESI-MS  $m/z$ : 979.45  $[M - H]^-$ ; calcd for  $C_{56}H_{63}N_6O_{10}$ : 979.46.

### Coupling of peptide fragments by Ugi-4CR

The supported C-terminal fragment bearing a free amino group was first swelled in a minimum of MeCN/MeOH (1:1) ( $15 \mu\text{L mg}^{-1}$  of resin) in a microwave vial followed by the addition of 2,4,6-trimethoxybenzaldehyde (5 equiv.). After stirring for 15 min, a solution of the N-terminal fragment bearing the free carboxylic acid (1.2 equiv.) in MeCN/MeOH (1:1) was added and the mixture stirred for 5 min. Finally, pentyl isocyanide (5 equiv.) was added, the microwave vial sealed and the reaction mixture heated for 1 h at 60 °C. The resin was filtered and washed with MeCN/MeOH (1:1) (3x), DMF (3x) and DCM (3x). Following removal of the Fmoc group, the ligated peptide was cleaved from the resin with a solution of TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS (95:2.5:2.5) for 1 h at room temperature. After filtration and washing with TFA, the filtrate was evaporated under reduced pressure and the resulting mixture precipitated with cold diethyl ether. The solid was washed twice with diethyl ether and dried under vacuum to be analyzed by HPLC and ESI-MS.

*H-Gly-Phe-Gly-Tyr-Leu-Gly-(N-(1-(4-methoxyphenyl)-2-oxo-2-(pentylamino)ethyl))Gly-Leu-Gly-Lys-Phe-Gly-NH<sub>2</sub> (5a)*: 58% crude purity; RP-HPLC  $t_R$  = 8.19 and 8.39 min; ESI-MS  $m/z$ : 1404.80  $[M + H]^+$ ; calcd for  $C_{71}H_{102}N_{15}O_{15}$ : 1404.77.

*H-Gly-Phe-Gly-Tyr-Leu-Gly-(N-(1-(2,4-dimethoxyphenyl)-2-oxo-2-(pentylamino)ethyl))Gly-Leu-Gly-Lys-Phe-Gly-NH<sub>2</sub> (5b)*: 63% crude purity; RP-HPLC  $t_R$  = 8.95 and 9.20 min; ESI-MS  $m/z$ : 1434.75  $[M + H]^+$ ; calcd for  $C_{72}H_{104}N_{15}O_{16}$ : 1434.78.

*H-Gly-Phe-Gly-Tyr-Leu-Gly-(N-(1-(2,4,6-trimethoxyphenyl)-2-oxo-2-(pentylamino)ethyl))Gly-Leu-Gly-Lys-Phe-Gly-NH<sub>2</sub> (5c)*: 62% crude purity; RP-HPLC  $t_R$  = 8.24 and 8.58 min; ESI-MS  $m/z$ : 1464.95  $[M + H]^+$ ; calcd for  $C_{73}H_{106}N_{15}O_{17}$ : 1464.79.

## Cleavage of the backbone amide protecting group

The backbone amide protected peptide obtained by Ugi-4CR was dissolved in a solution of TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS (95:2.5:2.5) and the mixture heated for 45 min at 60 °C in a sealed microwave vial. Afterward, the solvent was evaporated under reduced pressure and the resulting mixture precipitated with cold diethyl ether. The solid was washed twice with diethyl ether and dried under vacuum to be analyzed by HPLC-MS and HRMS. Compounds **6–14** were purified by RP-HPLC on a Phenomenex Kinetex® EVO C18 column (250 × 21.2 mm, 300 Å, 5 μm) using 0.1% TFA/H<sub>2</sub>O (A) and 0.1% TFA/MeCN (B), with a linear gradient of 10% to 100% (B) for 22 min at 14 ml min<sup>-1</sup> and UV detection at 220 nm and 254 nm. The collected fractions were freeze dried to afford the desired peptide as white powder. Isolated yields were calculated from 50 mg of resin with an experimental loading of 0.31 mmol g<sup>-1</sup>.

*H-Gly-Phe-Gly-Tyr-Leu-Gly-Gly-Leu-Gly-Lys-Phe-Gly-NH<sub>2</sub>* (**6**) (white powder, 9.3 mg, 57% isolated yield): 88% crude purity; RP-HPLC  $t_R$  = 7.05 min; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ : 1171.6355 [M + H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>57</sub>H<sub>83</sub>N<sub>14</sub>O<sub>13</sub> 1171.6259.

*H-Gly-Phe-Gly-Tyr-Leu-Gly-Gly-Phe-Gly-Tyr-Leu-Gly-Gly-Leu-Gly-Lys-Phe-Gly-NH<sub>2</sub>* (**7**) (white powder, 4.0 mg, 24% isolated yield): 55% crude purity; RP-HPLC  $t_R$  = 8.50 min; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ : 1765.9084 [M + H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>87</sub>H<sub>121</sub>N<sub>20</sub>O<sub>20</sub> 1765.9061.

*H-Gly-Phe-Gly-Tyr-Leu-Gly-Gly-Phe-Gly-Lys-Ile-Ser-Gly-Leu-Tyr-Gly-NH<sub>2</sub>* (**8**) (white powder, 4.9 mg, 45% isolated yield): 81% crude purity; RP-HPLC  $t_R$  = 7.50 min; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ : 1591.8297 [M + H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>77</sub>H<sub>111</sub>N<sub>18</sub>O<sub>19</sub> 1591.8267.

*H-Gly-Phe-Gly-Tyr-Leu-Gly-Gly-Phe-Gly-Lys-Leu-Gly-Tyr-Ile-Val-Gly-NH<sub>2</sub>* (**9**) (white powder, 6.6 mg, 46% isolated yield): 83% crude purity; RP-HPLC  $t_R$  = 7.65 min; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ : 1603.8645 [M + H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>79</sub>H<sub>115</sub>N<sub>18</sub>O<sub>18</sub> 1603.8631.

*H-Gly-Phe-Gly-Tyr-Leu-Gly-Lys-Cys-Phe-Gly-Gly-Phe-Gly-Lys-Ile-Ser-Gly-Leu-Tyr-Gly-NH<sub>2</sub>* (**10**) (white powder, 4.3 mg, 26% isolated yield): 89% crude purity; RP-HPLC  $t_R$  = 11.83 min; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ : 1014.0192 [M + 2H]<sup>2+</sup>; calcd for C<sub>97</sub>H<sub>141</sub>N<sub>23</sub>O<sub>23</sub>S 1014.0140.

*H-Gly-Phe-Gly-Tyr-Leu-Gly-Lys-Cys-Phe-Gly-Gly-Phe-Gly-Lys-Leu-Gly-Tyr-Ile-Val-Gly-NH<sub>2</sub>* (**11**) (white powder, 4.5 mg, 54% isolated yield): 85% crude purity; RP-HPLC  $t_R$  = 7.77 min; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ : 1020.0392 [M + 2H]<sup>2+</sup>; calcd for C<sub>99</sub>H<sub>145</sub>N<sub>23</sub>O<sub>22</sub>S 1020.0322.

*H-Gly-Phe-Gly-Tyr-Leu-Gly-Gly-Phe-Gly-Val-Ala-Tyr-Lys-Ile-Gly-Leu-Phe-Ala-Pro-Gly-Ala-NH<sub>2</sub>* (**12**) (white powder, 7.9 mg, 69% isolated yield): 75% crude purity; RP-HPLC  $t_R$  = 7.92 min; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ : 1031.0591 [M + 2H]<sup>2+</sup>; calcd for C<sub>102</sub>H<sub>147</sub>N<sub>23</sub>O<sub>23</sub> 1031.0515.

*H-Gly-Phe-Gly-Tyr-Leu-Gly-Lys-Cys-Phe-Gly-Gly-Phe-Gly-Val-Ala-Tyr-Lys-Ile-Gly-Leu-Phe-Ala-Pro-Gly-Ala-NH<sub>2</sub>* (**13**) (white powder, 3.3 mg, 20% isolated yield): 43% crude purity; RP-HPLC  $t_R$  = 7.93 min; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ : 1248.6575 [M + 2H]<sup>2+</sup>; calcd for C<sub>122</sub>H<sub>176</sub>N<sub>28</sub>O<sub>27</sub>S 1248.6485.

*H-Gly-Phe-Gly-Ala-Lys-Leu-Tyr-Val-Gly-Ile-Cys-Gly-Pro-Ala-Gly-Gly-Phe-Gly-Val-Ala-Tyr-Lys-Ile-Gly-Leu-Phe-Ala-Pro-Gly-Ala-NH<sub>2</sub>* (**14**) (white powder, 1.2 mg, 6% isolated yield): 24% crude purity; RP-HPLC  $t_R$  = 8.91 min; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ : 1429.2590 [M + 2H]<sup>2+</sup>; calcd for C<sub>137</sub>H<sub>207</sub>N<sub>33</sub>O<sub>32</sub>S 1429.2648.

*H-Gly-Phe-Gly-Tyr-Leu-Phe-Gly-Leu-Gly-Lys-Phe-Gly-NH<sub>2</sub>* (**16a**): 82% crude purity; RP-HPLC  $t_R$  = 7.75 min; ESI-MS  $m/z$ : 1261.70 [M + H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>64</sub>H<sub>89</sub>N<sub>14</sub>O<sub>13</sub> 1261.65.

*H-Gly-Phe-Gly-Tyr-Leu-D-Phe-Gly-Leu-Gly-Lys-Phe-Gly-NH<sub>2</sub>* (**16b**): 54% crude purity; RP-HPLC  $t_R$  = 7.86 min; ESI-MS  $m/z$ : 1261.70 [M + H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>64</sub>H<sub>89</sub>N<sub>14</sub>O<sub>13</sub> 1261.65.

## Acknowledgement

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). The China Scholarship Council (X. L.), the Fond d'enseignement et de recherche de la Faculté de pharmacie de l'Université Laval (S. J., S. V.-D.) and the Fonds de recherche du Québec – Nature et Technologies (S. V.-D.) are acknowledged for scholarships. The authors are grateful to Nancy Boucher and Pierre-Luc Plante of CHU de Québec Research Centre for HRMS analyses.

## Notes and references

1. K. Fosgerau and T. Hoffmann, *Drug Discov. Today*, **2015**, 20, 122-128.
2. A. A. Kaspar and J. M. Reichert, *Drug Discov. Today*, **2013**, 18, 807-817.
3. R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 2149-2154.
4. A. El-Faham and F. Albericio, *Chem. Rev.*, **2011**, 111, 6557-6602.
5. E. Valeur and M. Bradley, *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, 38, 606-631.
6. W. Rapp, in *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries*, ed. G. Jung, Wiley-VCH, Weinheim, **2007**, pp. 425-464.
7. F. García-Martín, *et al.*, *J. Comb. Chem.*, **2006**, 8, 213-220.
8. J. Rademann, M. Grøtli, M. Meldal and K. Bock, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 5459-5466.
9. S. A. Kates, B. F. McGuinness, C. Blackburn, G. W. Griffin, N. A. Solé, G. Barany and F. Albericio, *Peptide Science*, **1998**, 47, 365-380.
10. M. Góngora-Benítez, J. Tulla-Puche and F. Albericio, *ACS Comb. Sci.*, **2013**, 15, 217-228.
11. U. Boas, J. Brask and K. J. Jensen, *Chem. Rev.*, **2009**, 109, 2092-2118.
12. A. Isidro-Llobet, M. Álvarez and F. Albericio, *Chem. Rev.*, **2009**, 109, 2455-2504.
13. M. Paradis-Bas, J. Tulla-Puche and F. Albericio, *Chem. Soc. Rev.*, **2016**, 45, 631-654.
14. R. Behrendt, P. White and J. Offer, *J. Pept. Sci.*, **2016**, 22, 4-27.
15. X. Guan, P. K. Chaffey, C. Zeng and Z. Tan, in *Protein Ligation and Total Synthesis II*, ed. L. Liu, Springer International Publishing, Cham, **2015**, pp. 155-192.
16. M. Chen, P. Heimer and D. Imhof, *Amino Acids*, **2015**, 47, 1283-1299.
17. S. Bondalapati, M. Jbara and A. Brik, *Nat. Chem.*, **2016**, 8, 407-418.
18. T. J. R. Harmand, C. E. Murar and J. W. Bode, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2014**, 22, 115-121.
19. P. Thapa, R.-Y. Zhang, V. Menon and J.-P. Bingham, *Molecules*, **2014**, 19, 14461-14483.
20. P. Dawson, T. Muir, I. Clark-Lewis and S. Kent, *Science*, **1994**, 266, 776-779.
21. I. Pusterla and J. W. Bode, *Nat. Chem.*, **2015**, 7, 668-672.
22. J. W. Bode, R. M. Fox and K. D. Baucom, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 1248-1252.
23. Y. Zhang, C. Xu, H. Y. Lam, C. L. Lee and X. Li, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2013**, 110, 6657-6662.
24. E. Saxon, J. I. Armstrong and C. R. Bertozzi, *Org. Lett.*, **2000**, 2, 2141-2143.
25. B. L. Nilsson, L. L. Kiessling and R. T. Raines, *Org. Lett.*, **2000**, 2, 1939-1941.
26. A. Váradi, T. Palmer, R. Notis Dardashti and S. Majumdar, *Molecules*, **2016**, 21, 19-.
27. G. Koopmanschap, E. Ruijter and R. V. A. Orru, *Beilstein J. Org. Chem.*, **2014**, 10, 544-598.

28. B. H. Rotstein, S. Zaretsky, V. Rai and A. K. Yudin, *Chem. Rev.*, **2014**, 114, 8323-8359.
29. A. Dömling, W. Wang and K. Wang, *Chem. Rev.*, **2012**, 112, 3083-3135.
30. A. Dömling, *Chem. Rev.*, **2006**, 106, 17-89.
31. A. Dömling and I. Ugi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, 39, 3168-3210.
32. L. A. Wessjohann, M. C. Morejon, G. M. Ojeda, C. R. Rhoden and D. G. Rivera, *J. Org. Chem.*, **2016**, 81, 6535-6545.
33. A. V. Vasco, C. S. Pérez, F. E. Morales, H. E. Garay, D. Vasilev, J. A. Gavín, L. A. Wessjohann and D. G. Rivera, *J. Org. Chem.*, **2015**, 80, 6697-6707.
34. A. P. Treder, J. L. Hickey, M.-C. J. Tremblay, S. Zaretsky, C. C. G. Scully, J. Mancuso, A. Doucet, A. K. Yudin and E. Marsault, *Chem. Eur. J.*, **2015**, 21, 9249-9255.
35. M. G. Ricardo, F. E. Morales, H. Garay, O. Reyes, D. Vasilev, L. A. Wessjohann and D. G. Rivera, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, 13, 438-446.
36. F. E. Morales, H. E. Garay, D. F. Muñoz, Y. E. Augusto, A. J. Otero-González, O. Reyes Acosta and D. G. Rivera, *Org. Lett.*, **2015**, 17, 2728-2731.
37. G. P. Liao, E. M. M. Abdelraheem, C. G. Neochoritis, K. Kurpiewska, J. Kalinowska-Tłuścik, D. C. McGowan and A. Dömling, *Org. Lett.*, **2015**, 17, 4980-4983.
38. R. Hili, V. Rai and A. K. Yudin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 2889-2891.
39. O. E. Vercillo, C. K. Z. Andrade and L. A. Wessjohann, *Org. Lett.*, **2008**, 10, 205-208.
40. M. Waki and J. Meienhofer, *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, 99, 6075-6082.
41. S. Claerhout, T. Duchene, D. Tourwe and E. V. Van der Eycken, *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, 8, 60-65.
42. F. Albericio, P. Lloyd-Williams and E. Giralt, in *Methods Enzymol.*, ed. G. B. Fields, Academic Press, New York, **1997**, vol. 289, pp. 313-336.
43. B. Bacsá, K. Horváti, S. Bősze, F. Andrae and C. O. Kappe, *J. Org. Chem.*, **2008**, 73, 7532-7542.
44. T. Wang and S. J. Danishefsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2013**, 110, 11708-11713.
45. N. L. Benoiton, *Biopolymers*, **1996**, 40, 245-254.
46. N. Sewald and H.-D. Jakubke, in *Peptides: Chemistry and Biology*, Wiley-VCH, Weinheim, **2009**, pp. 175-315.
47. J. Kovacs, in *The Peptides*, eds. E. Gross and J. Meienhofer, Academic Press, New York, **1980**, vol. 2, pp. 485-539.
48. D. A. Wellings and E. Atherton, in *Methods Enzymol.*, ed. G. B. Fields, Academic Press, New York, **1997**, vol. 289, pp. 44-67.
49. G. B. Fields and R. L. Noble, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1990**, 35, 161-214.
50. M. Gude, J. Ryf and P. D. White, *Lett. Pept. Sci.*, **2002**, 9, 203-206.



## Supporting information

# Toward Solid Phase Peptide Fragments Ligation by a Traceless-Ugi Multicomponent Reaction Approach

Steve Jobin, Alexia Méjean, Sindy-Marcela Galindo, Xinxia Liang, Simon Vézina-Dawod and Eric Biron\*

*Faculté de pharmacie, Université Laval, Québec (QC), G1V 0A6, Canada*

and

*Laboratoire de chimie médicinale, Centre de recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Québec (CHUL Section), 2705 Boulevard Laurier, Québec, Québec. G1V 4G2, Canada*

\*Corresponding author: E-mail : [Eric.Biron@pha.ulaval.ca](mailto:Eric.Biron@pha.ulaval.ca)

## Table of contents

<b>Materials and equipment</b>	S61
<b>Peptide synthesis</b>	S61
<b>Solid-phase fragment coupling with standard coupling reagents</b>	S62
<b>Tables</b>	S64
<b>Table S1.</b> Selection of the optimal aldehyde and deprotection conditions for the synthesis of peptide <b>6</b>	S64
<b>Table S2.</b> Evaluation of different Rink Amide resins for the synthesis of peptide <b>6</b>	S65
<b>Table S3.</b> Calculated and observed mass for peptides <b>6-14</b>	S65
<b>Table S4.</b> Crude purity and isolated yield for peptides <b>6-14</b>	S66
<b>Figures</b>	S67
<b>Figure S1.</b> HPLC profiles ( $\lambda = 220$ nm) and ESI-MS spectra of C-terminal fragments	S67
<b>Figure S2.</b> HPLC profiles ( $\lambda = 220$ nm) and ESI-MS spectra of N-terminal fragments	S68
<b>Figure S3.</b> HPLC profile ( $\lambda=220$ nm) and ESI-MS spectra of backbone amide protected peptide <b>5a</b>	S69
<b>Figure S4.</b> HPLC profile ( $\lambda = 220$ nm) and ESI-MS spectra of backbone amide protected peptide <b>5b</b>	S71
<b>Figure S5.</b> HPLC profile ( $\lambda = 220$ nm) and ESI-MS spectra of backbone amide protected peptide <b>5c</b>	S72
<b>Figure S6.</b> HPLC-MS profiles ( $\lambda = 220$ nm) and HRMS spectra for peptides <b>6-14</b>	S74
<b>Figure S7.</b> HPLC profiles ( $\lambda = 220$ nm) and ESI-MS spectra of peptides <b>16a</b> and <b>16b</b>	S85

## Materials and equipment

All the chemical reagents and solvents from commercial sources were used without further purification. Coupling reagents and amino acid derivatives were purchased from Matrix Innovation Inc. (Quebec, QC, Canada). Rink Amide ChemMatrix® resin (0.41 mmol/g) was purchased from PCAS Biomatrix, Rink Amide AM polystyrene resin (0.56 mmol/g) from ChemImpex (Wood Dale, IL, USA) and TentaGel S NH<sub>2</sub> (130 µm, 0.29 mmol/g) from Rapp Polymere (Tübingen, Germany). All other reagents and solvents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Reactions on solid support were performed in filter columns (2 and 10 mL) from Roland Vetter Laborbedarf OHG (Ammerbuch, Germany). RP-HPLC analyses were achieved on a Shimadzu Prominence instrument (Columbian, MD, USA) using a Phenomenex Kinetex column (4.6 mm x 100 mm, 2.6 µm XB-C18, 100 Å, 1.5 mL/min) with a 10.5 min gradient from water (0.1% TFA) and CH<sub>3</sub>CN (0.1% TFA) (CH<sub>3</sub>CN 10-100%) and detection at 220 nm and 254 nm. LC/MS analyses were performed on a Shimadzu Prominence LCMS-2020 equipped with an ESI and APCI ion source. Microwave experiments were conducted on a Biotage Initiator microwave instrument (Charlotte, NC, USA) with 0.2-0.5 and 0.5-2 mL microwave vials. Peptides were synthesized on a Prelude peptide synthesizer from Protein Technologies (Tucson, AZ, USA). High-resolution mass spectrometry was performed on a Waters Synapt G2-Si (Quadrupole/TOF) with a Waters UPLC binary pump and FTN injector. The mass spectrometer was operated in High resolution mode and calibration done with a sodium formate (Sigma) solution and lock-mass correction using a Leucine-enkephaline solution (Waters).

## Peptide synthesis

Peptides were synthesized by standard Fmoc solid-phase synthesis. Briefly, amino acid couplings were performed with a solution of Fmoc-Xaa-OH (3 equiv.), HCTU (3 equiv.) and NMM (6 equiv.) in DMF for 20 min. The coupling step was repeated once and the resin washed with DMF (5×). The Fmoc protecting group was removed by treating the resin twice with a solution of 20% piperidine in DMF (v/v) for 8 min followed by washing with DMF (5×).

## Solid-phase fragment coupling with standard coupling reagents

**Coupling with HATU.** The resin bearing the C-terminal fragment **1** was swelled in DMF for 10 minutes. The N-terminal fragment (1.2 equiv.), HATU (1.2 equiv.) and NMM (2.4 equiv.) were dissolved in DMF and added to the resin. After stirring the mixture for 3 h, the resin was filtered and washed with DMF (5×). The Fmoc group was removed with a solution of 20% piperidine in DMF (v/v) and the peptide was simultaneously deprotected and cleaved from the resin with a solution of TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS (95:2.5:2.5) for 1 h at room temperature. After filtration and washing with TFA, the filtrate was evaporated under reduced pressure and the resulting mixture analyzed and purified by RP-HPLC and characterized by ESI-MS.

H-Gly-Phe-Gly-Tyr-Leu-Gly-Gly-Leu-Gly-Lys-Phe-Gly-NH<sub>2</sub> (**6**) (White powder, 4.7 mg, 45% isolated yield): RP-HPLC  $t_{R}= 7.05$  min; ESI-MS  $m/z$ : 1171.65 [M+H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>57</sub>H<sub>83</sub>N<sub>14</sub>O<sub>13</sub> 1171.63.

**Coupling with PyAOP.** The resin bearing the C-terminal fragment **1** was swelled in DMF for 10 minutes. The N-terminal fragment **2** (1.2 equiv.), PyAOP (1.2 equiv.) and DIPEA (2.4 equiv.) were dissolved in DMF and added to the resin. After stirring the mixture for 3 h, the resin was filtered and washed with DMF (5×). The Fmoc group was removed with a solution of 20% piperidine in DMF (v/v) and the peptide was simultaneously deprotected and cleaved from the resin with a solution of TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS (95:2.5:2.5) for 1 h at room temperature. After filtration and washing with TFA, the filtrate was evaporated under reduced pressure and the resulting mixture analyzed and purified by RP-HPLC and characterized by ESI-MS.

H-Gly-Phe-Gly-Tyr-Leu-Gly-Gly-Leu-Gly-Lys-Phe-Gly-NH<sub>2</sub> (**6**) (White powder, 4.6 mg, 33% isolated yield): RP-HPLC  $t_{R}= 7.05$  min; ESI-MS  $m/z$ : 1171.65 [M+H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>57</sub>H<sub>83</sub>N<sub>14</sub>O<sub>13</sub> 1171.63.

**Coupling with DIC/6-Cl-HOBt.** The resin bearing the C-terminal fragment **1** was swelled in NMP for 10 minutes.<sup>1</sup> The N-terminal fragment **2** (1.2 equiv.), DIC (1.2 equiv.) and 6-Cl-HOBt (1.2 equiv.) were dissolved in NMP and added to the resin. After stirring the mixture for 3 h, the resin was filtered and washed with NMP (5×) and DMF (5×). The Fmoc group was removed with a solution of 20% piperidine in DMF (v/v) and the peptide was

simultaneously deprotected and cleaved from the resin with a solution of TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS (95:2.5:2.5) for 1 h at room temperature. After filtration and washing with TFA, the filtrate was evaporated under reduced pressure and the resulting mixture analyzed and purified by RP-HPLC and characterized by ESI-MS.

H-Gly-Phe-Gly-Tyr-Leu-Gly-Gly-Leu-Gly-Lys-Phe-Gly-NH<sub>2</sub> (**6**) (White powder, 4.5 mg, 35% isolated yield): RP-HPLC  $t_R$  = 7.05 min; ESI-MS  $m/z$ : 1171.65 [M+H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>57</sub>H<sub>83</sub>N<sub>14</sub>O<sub>13</sub> 1171.63.

H-Gly-Phe-Gly-Tyr-Leu-Phe-Gly-Leu-Gly-Lys-Phe-Gly-NH<sub>2</sub> (**16a**): 54% crude purity; RP-HPLC  $t_R$  = 7.75 min; MS (ESI)  $m/z$ : 1261.70 [M+H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>64</sub>H<sub>89</sub>N<sub>14</sub>O<sub>13</sub> 1261.65.

## Références

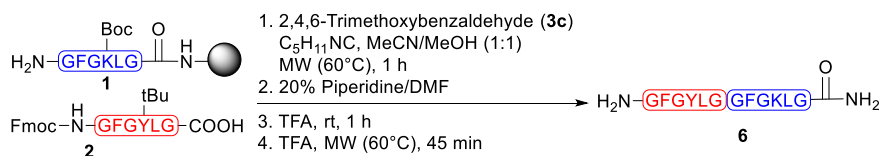
1. Bacsa, B.; Horvati, K.; Bosze, S.; Andreae, F.; Kappe, C. O. Solid-phase synthesis of difficult peptide sequences at elevated temperatures: A critical comparison of microwave and conventional heating technologies. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, (19), 7532-7542.

## Tables

**Table S1.** Selection of the optimal aldehyde and deprotection conditions for the synthesis of peptide **6**

Aldehyde	Treatment with TFA		Unprotected : Protected Ratio (%) <sup>a</sup>	Crude purity (%) <sup>a</sup>
	rt (min)	MW (60°C) (min)		
<i>p</i> -methoxybenzaldehyde ( <b>3a</b> )	60	0	0	---
	60	60	32	21
2,4-dimethoxybenzaldehyde ( <b>3b</b> )	60	0	0	---
	60	60	69	57
2,4,6-trimethoxybenzaldehyde ( <b>3c</b> )	60	0	9	4
	60	15	84	64
	60	30	93	72
	60	45	>99	77

<sup>a</sup>Crude purities and conversion ratios from peptide **5a-c** to peptide **6** were determined by % area of UV signal at 220 nm in HPLC analysis of crude product.

**Table S2.** Evaluation of different Rink Amide resins for the synthesis of peptide **6**<sup>a</sup>

Resin	Conversion rate (%) <sup>a</sup>	Crude purity (%) <sup>b</sup>
ChemMatrix®	99	88
Polystyrene	94	75
TentaGel™	91	68

<sup>a</sup>Conversion rate of C-terminal fragment **1** into peptide **6**. <sup>b</sup>Crude purities were determined by % area of UV signal at 220 nm in HPLC analysis of crude product.

**Table S3.** Calculated and observed mass for peptides **6-14**

Peptide	Formula	[M+H] <sup>+</sup>		[M+Na] <sup>+</sup>		[M+2H] <sup>2+</sup>		[M+H+Na] <sup>2+</sup>	
		Calculated	Observed	Calculated	Observed	Calculated	Observed	Calculated	Observed
<b>6</b>	C <sub>57</sub> H <sub>83</sub> N <sub>14</sub> O <sub>13</sub>	1171.6259	1171.6355	1193.6083	1193.6168	586.3166	586.3215	597.3078	597.3235
<b>7</b>	C <sub>87</sub> H <sub>121</sub> N <sub>20</sub> O <sub>20</sub>	1765.9061	1765.9084	1787.8885	1787.8922	883.4567	883.4606	894.4479	894.4610
<b>8</b>	C <sub>77</sub> H <sub>111</sub> N <sub>18</sub> O <sub>19</sub>	1591.8267	1591.8297	1613.8092	1613.8109	796.4170	796.4182	807.4083	807.4063
<b>9</b>	C <sub>79</sub> H <sub>115</sub> N <sub>18</sub> O <sub>18</sub>	1603.8631	1603.8645	1625.8456	1625.8402	802.4352	802.4349	813.4265	813.4269
<b>10</b>	C <sub>97</sub> H <sub>140</sub> N <sub>23</sub> O <sub>23</sub> S	2027.0208	----	2049.0033	----	1014.0140	1014.0192	1025.0053	1025.0135
<b>11</b>	C <sub>99</sub> H <sub>144</sub> N <sub>23</sub> O <sub>22</sub> S	2039.0572	----	2061.0396	----	1020.0322	1020.0392	1031.0235	1031.0310
<b>12</b>	C <sub>102</sub> H <sub>146</sub> N <sub>23</sub> O <sub>23</sub>	2061.0956	----	2083.0781	----	1031.0515	1031.0591	1042.0427	1042.0536
<b>13</b>	C <sub>122</sub> H <sub>175</sub> N <sub>28</sub> O <sub>27</sub> S	2496.2897	----	2518.2722	----	1248.6485	1248.6575	1259.6397	1259.6523
<b>14</b>	C <sub>137</sub> H <sub>206</sub> N <sub>33</sub> O <sub>32</sub> S	2857.5222	----	2879.5047	----	1429.2648	1429.2590	1439.7524	----

**Table S4.** Crude purity and isolated yield for peptides **6-14**

<b>Peptide</b>	<b>Crude purity (%)</b>	<b>Starting resin (mg)</b>	<b>Purified mass (mg)</b>	<b>Isolated yield (%)<sup>a</sup></b>
<b>6</b>	88	57.0	9.3	57
<b>7</b>	55	54.0	4.0	24
<b>8</b>	81	35.5	4.9	45
<b>9</b>	83	45.0	6.6	46
<b>10</b>	89	42.9	4.3	26
<b>11</b>	85	20.8	4.5	54
<b>12</b>	75	36.0	7.9	69
<b>13</b>	43	43.8	3.3	20
<b>14</b>	33	44.1	1.2	6

<sup>a</sup>Yields are calculated with the experimental loading of 0.31 mmol/g for Rink Amide CM.



## Figures

Figure S1. HPLC profiles ( $\lambda = 220$  nm) and ESI-MS spectra of C-terminal fragments.

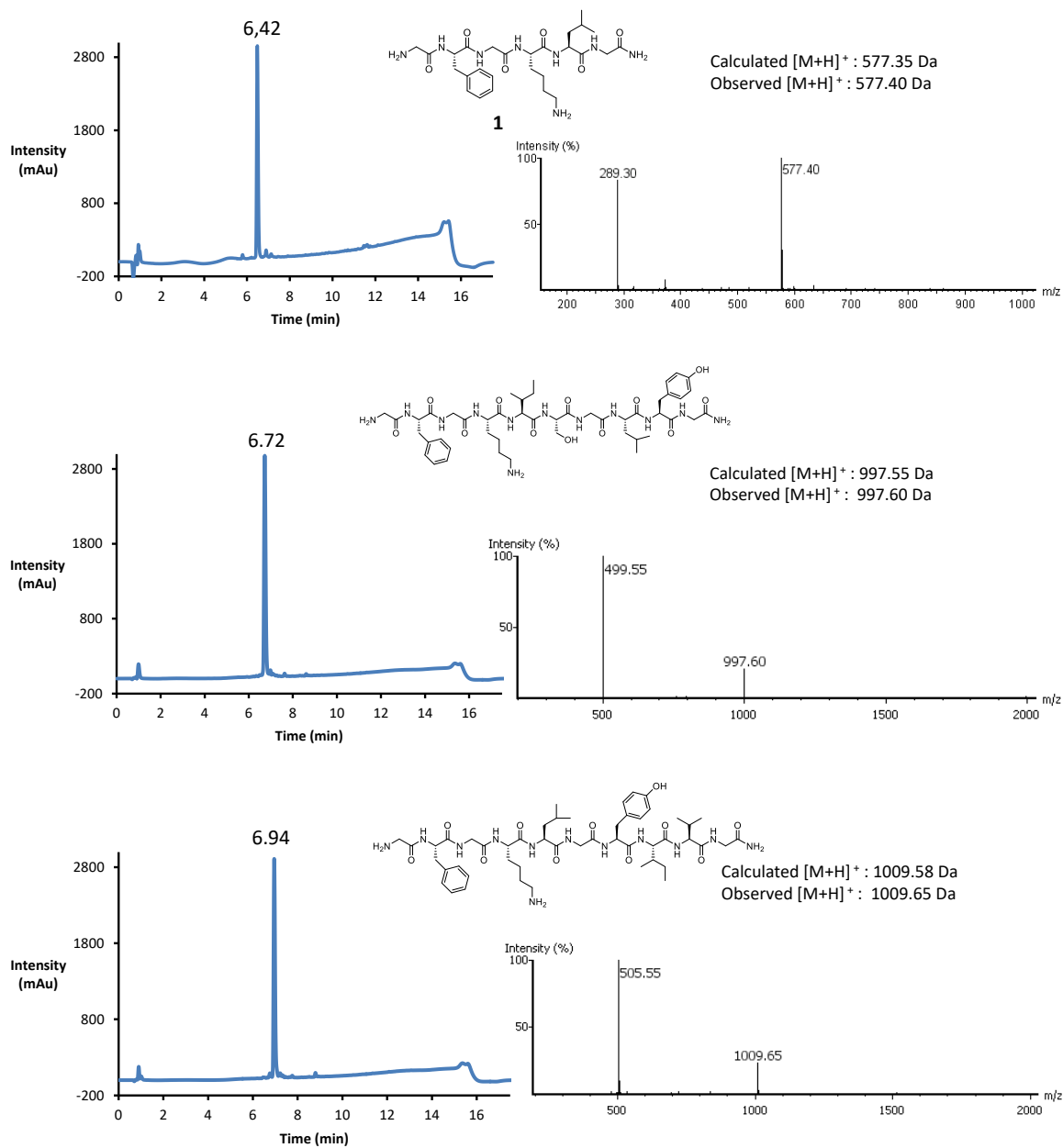


Figure S1. (Continued)

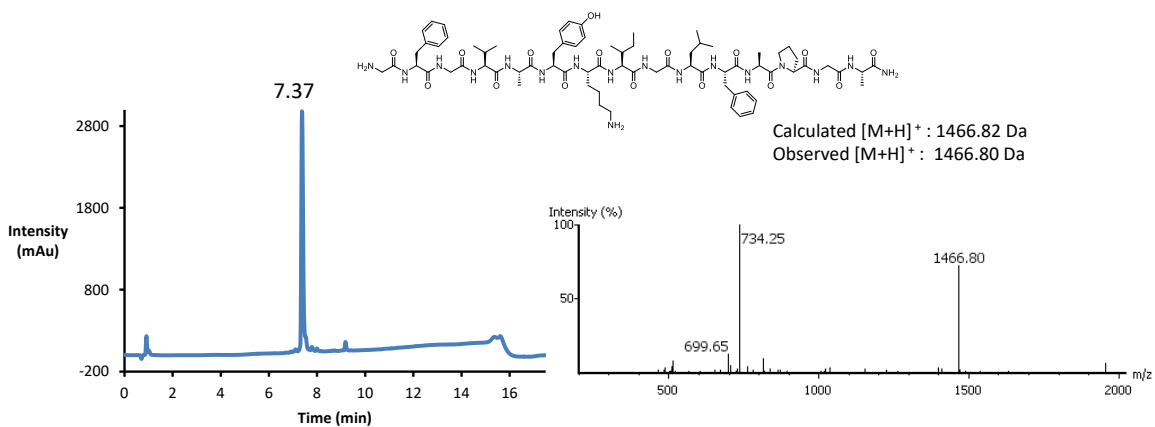


Figure S2. HPLC profiles ( $\lambda = 220$  nm) and ESI-MS spectra of N-terminal fragments.

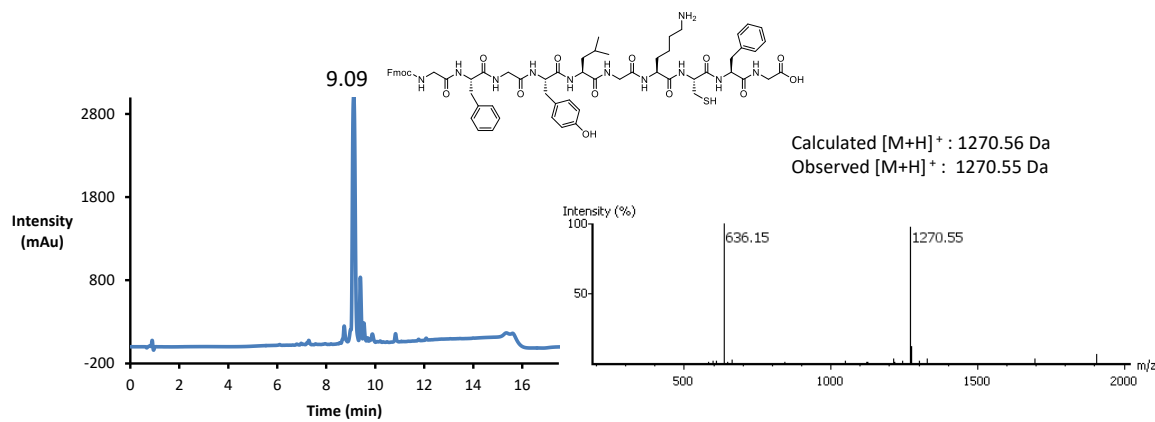
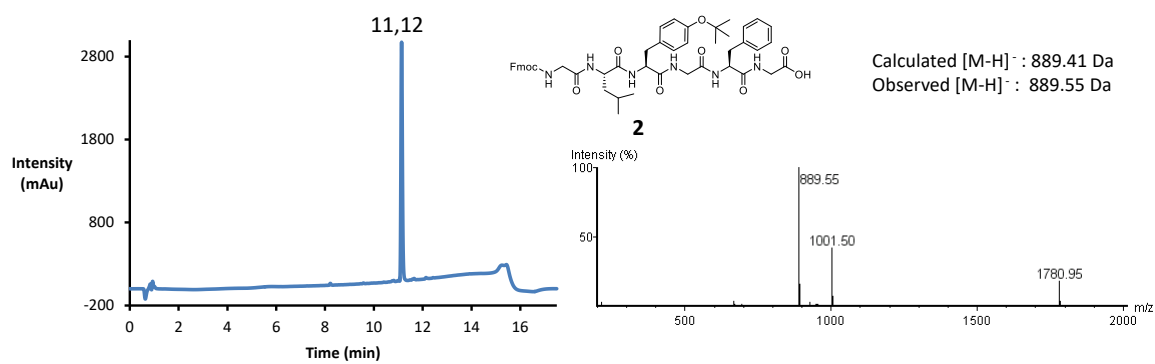
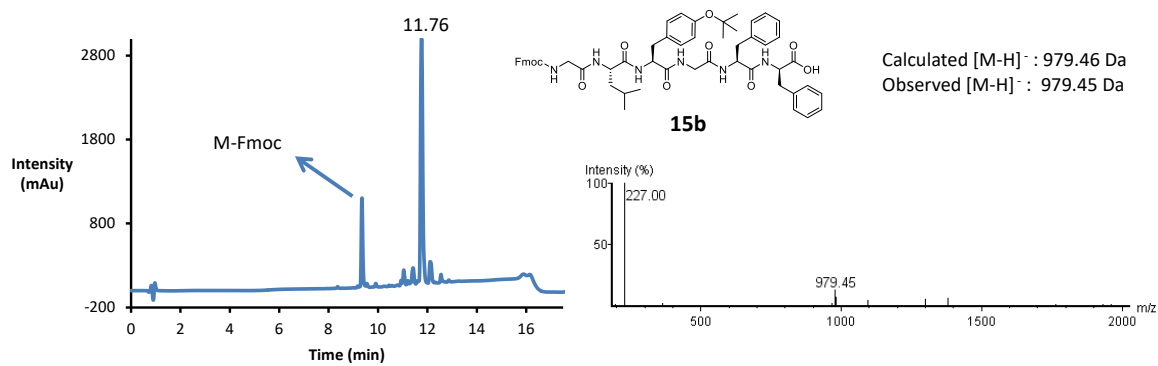
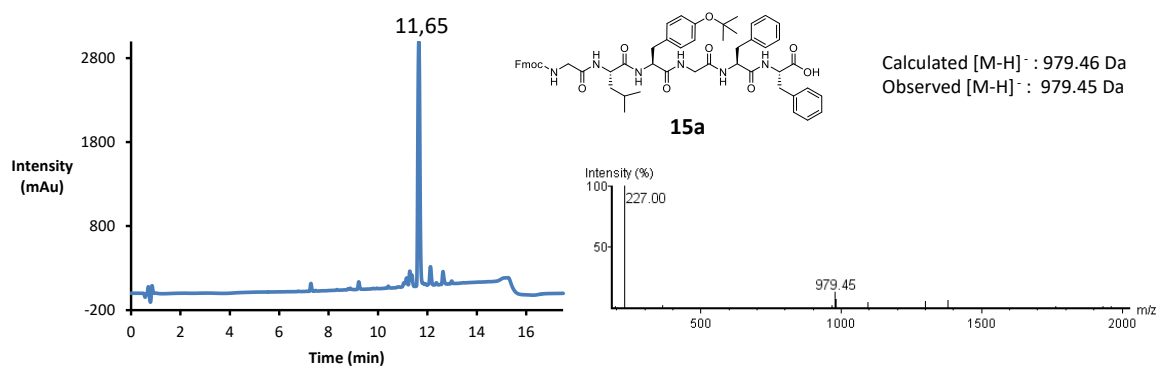
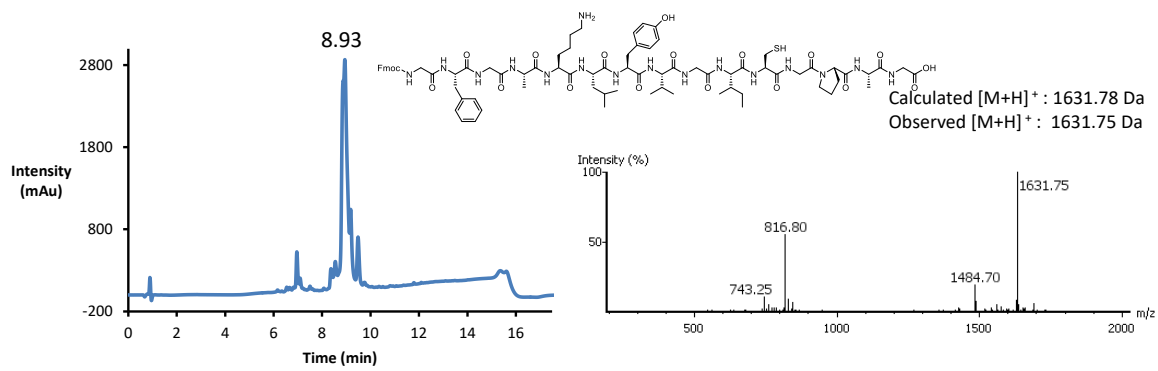
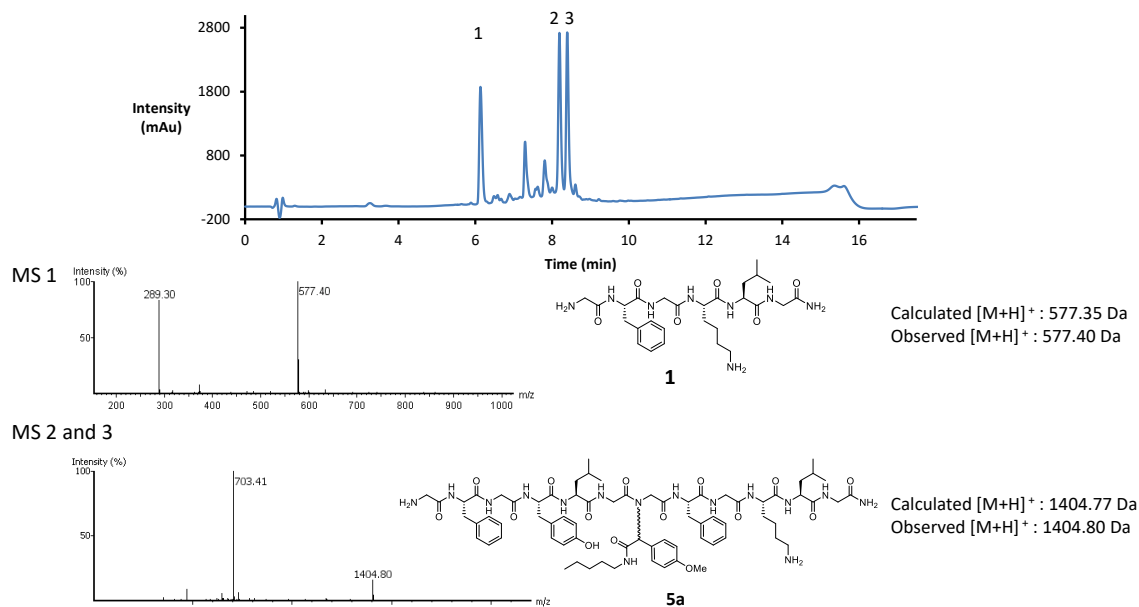


Figure S2. (Continued)

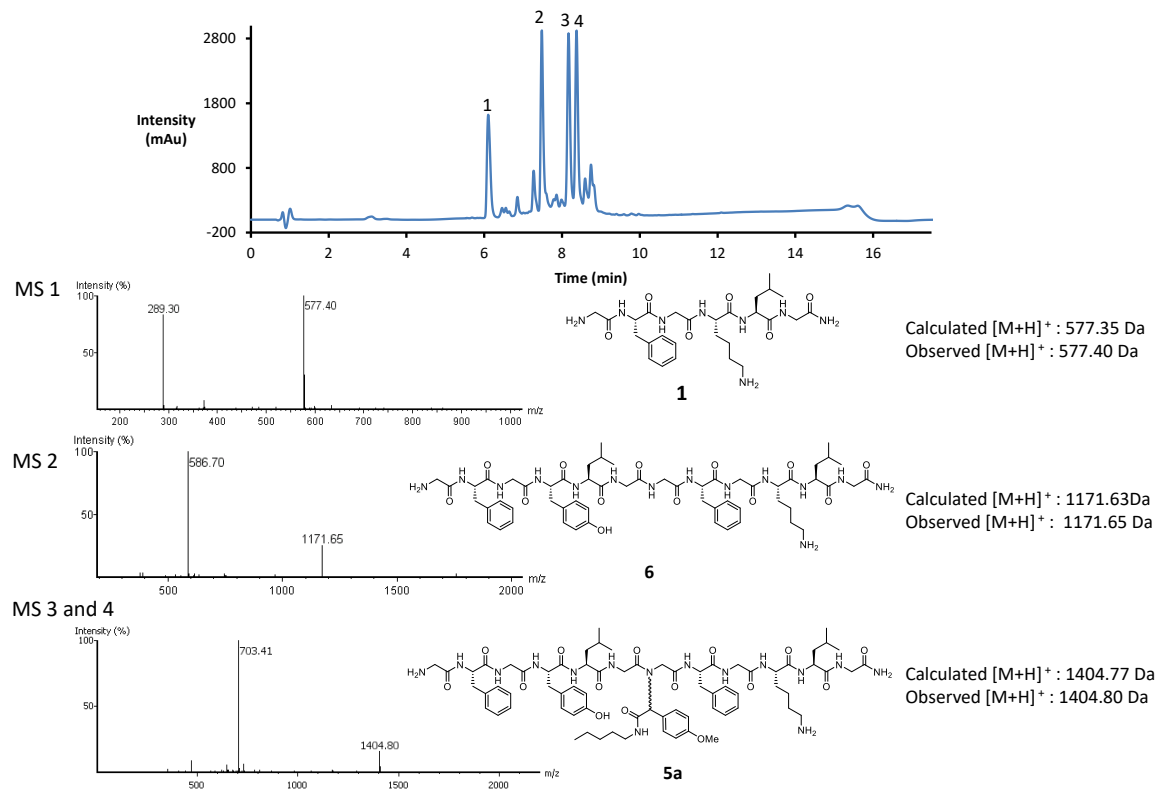


**Figure S3.** HPLC profile ( $\lambda=220$  nm) and ESI-MS spectra of backbone amide protected peptide **5a**.

After treatment with TFA for 1 h at rt

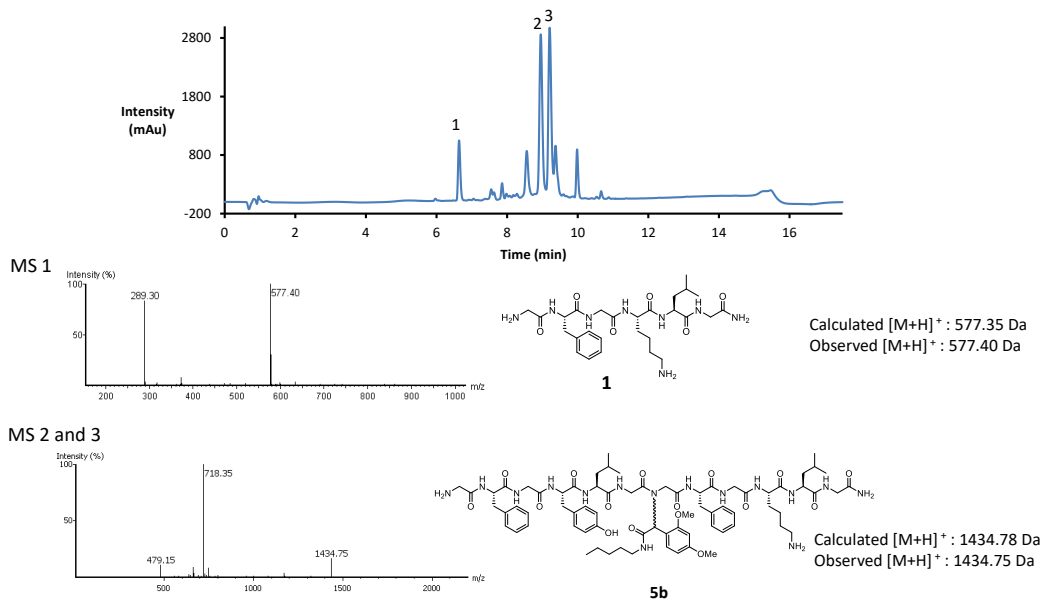


After treatment with TFA for 1 h at rt and 1 h under MW at 60°C

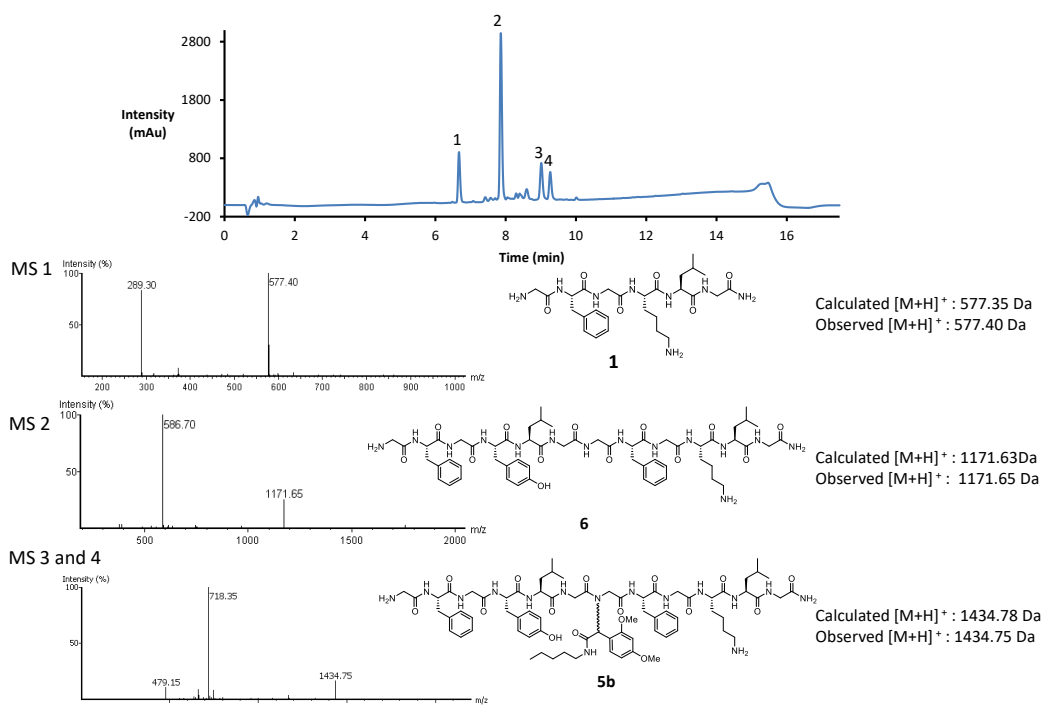


**Figure S4.** HPLC profile ( $\lambda = 220$  nm) and ESI-MS spectra of backbone amide protected peptide **5b**.

After treatment with TFA for 1 h at rt

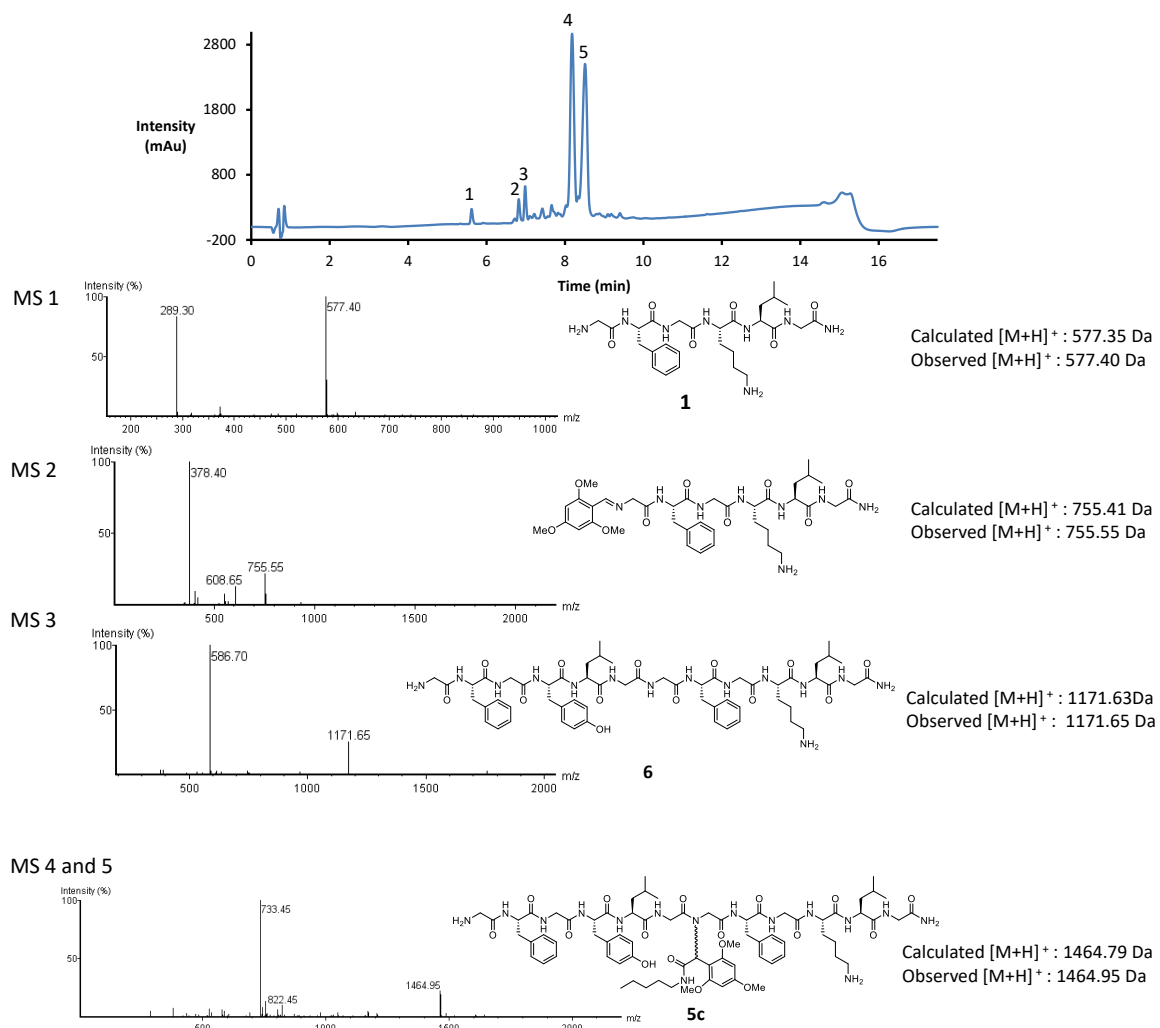


After treatment with TFA for 1 h at rt and 1 h under MW at 60°C



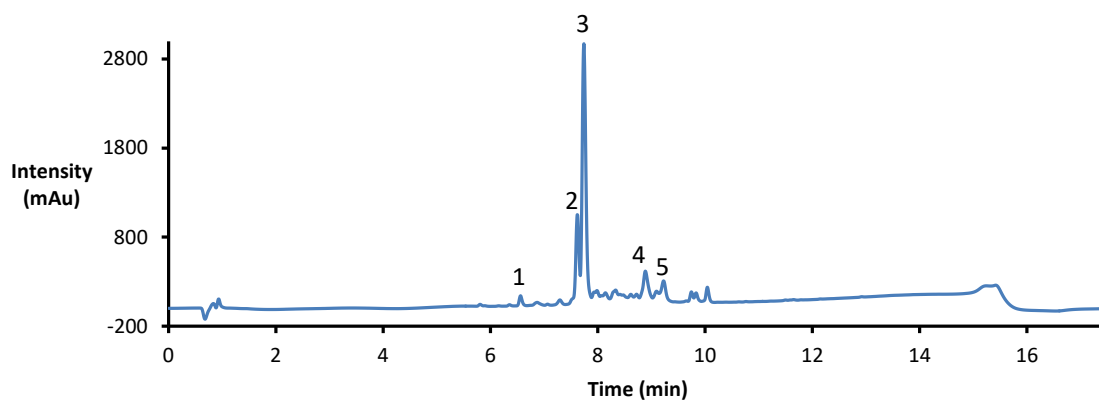
**Figure S5.** HPLC profile ( $\lambda = 220$  nm) and ESI-MS spectra of backbone amide protected peptide **5c**.

After treatment with TFA for 1 h at rt

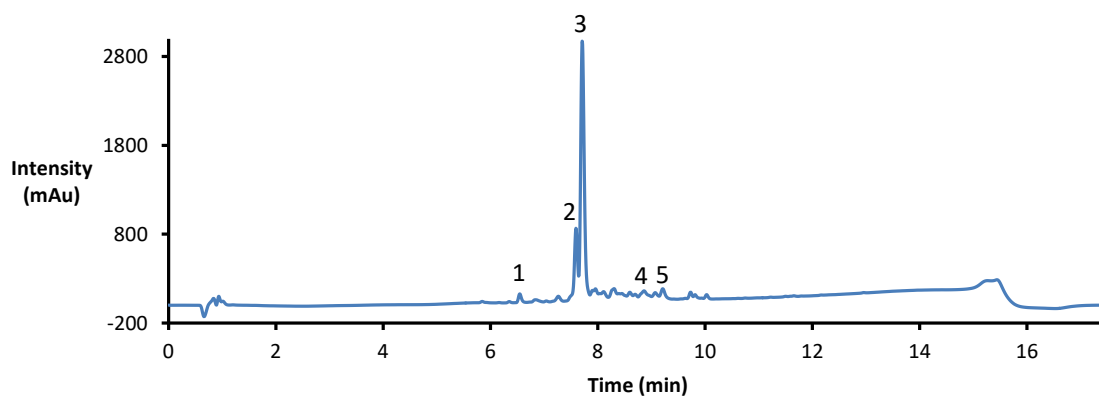


**Figure S5.** (Continued)

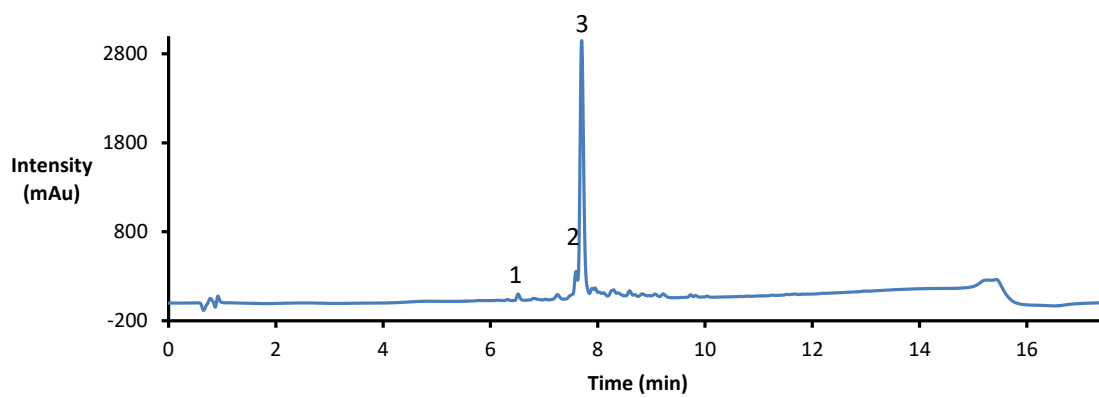
After treatment with TFA for 1 h at rt and 15 min under MW at 60°C



After treatment with TFA for 1 h at rt and 30 min under MW at 60°C



After treatment with TFA for 1 h at rt and 45 min under MW at 60°C



**Figure S6.** HPLC-MS profiles ( $\lambda = 220 \text{ nm}$ ) and HRMS spectra for peptides **6-14**

H-Gly-Phe-Gly-Tyr-Leu-Gly-Gly-Leu-Gly-Lys-Phe-Gly-NH<sub>2</sub> (**6**)

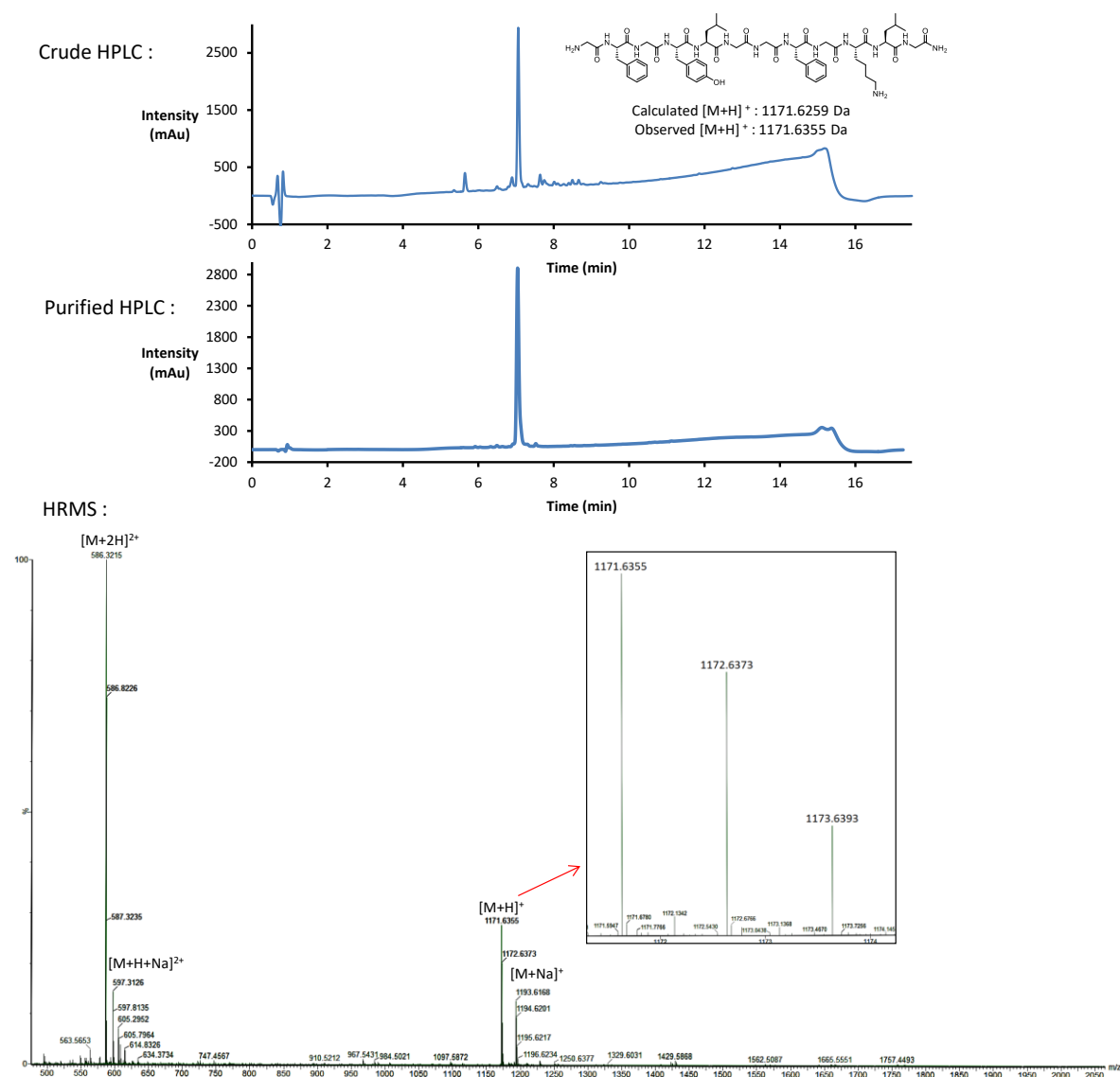




Figure S6. (Continued)

H-Gly-Phe-Gly-Tyr-Leu-Gly-Gly-Phe-Gly-Tyr-Leu-Gly-Gly-Leu-Gly-Lys-Phe-Gly-NH<sub>2</sub> (7)

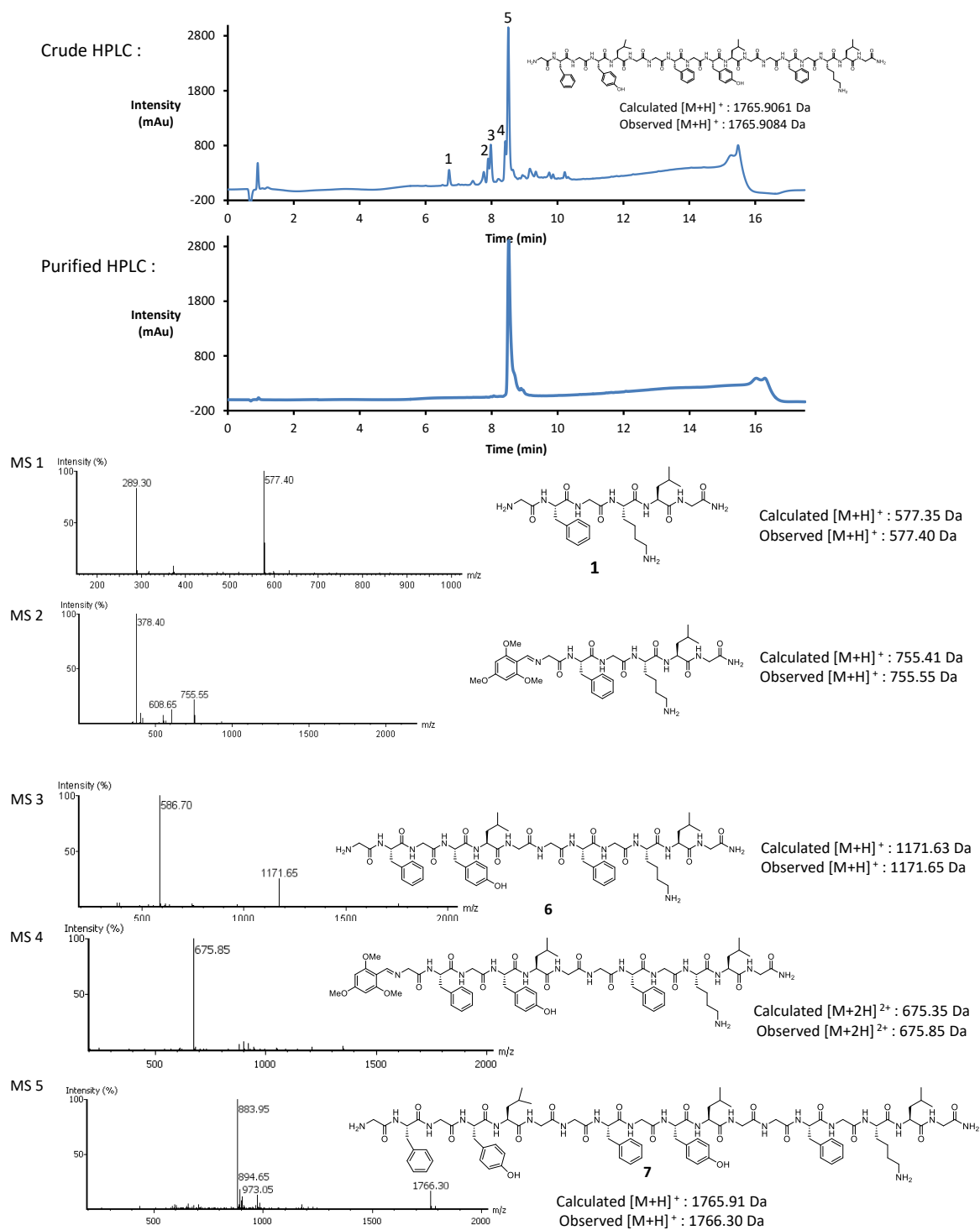


Figure S6. (Continued)

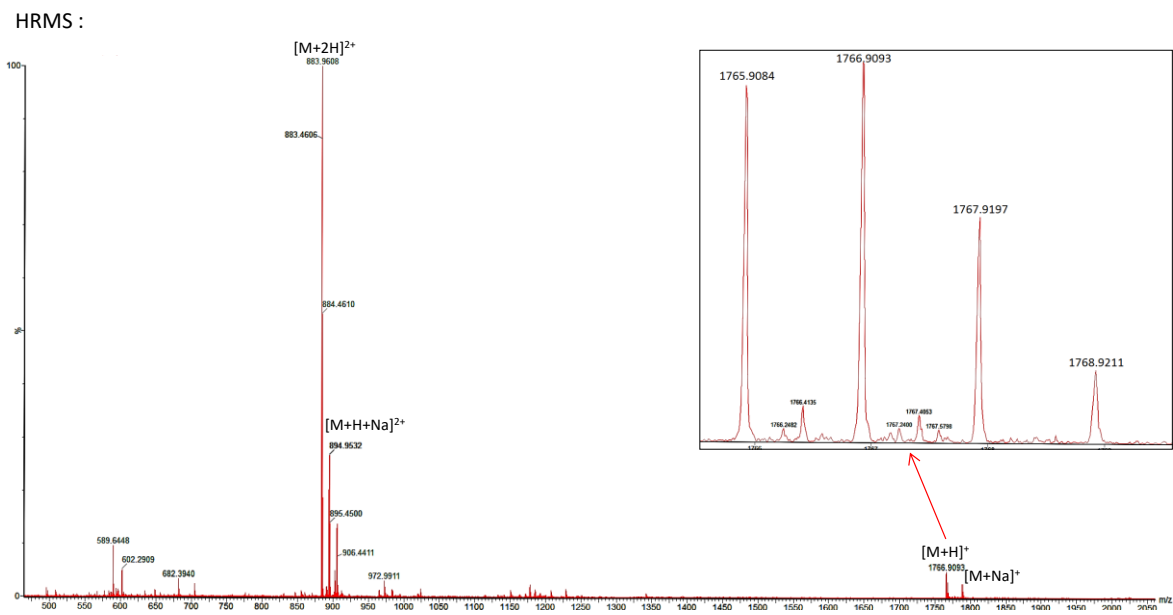


Figure S6. (Continued)

H-Gly-Phe-Gly-Tyr-Leu-Gly-Gly-Phe-Gly-Lys-Ile-Ser-Gly-Leu-Tyr-Gly-NH<sub>2</sub> (**8**)

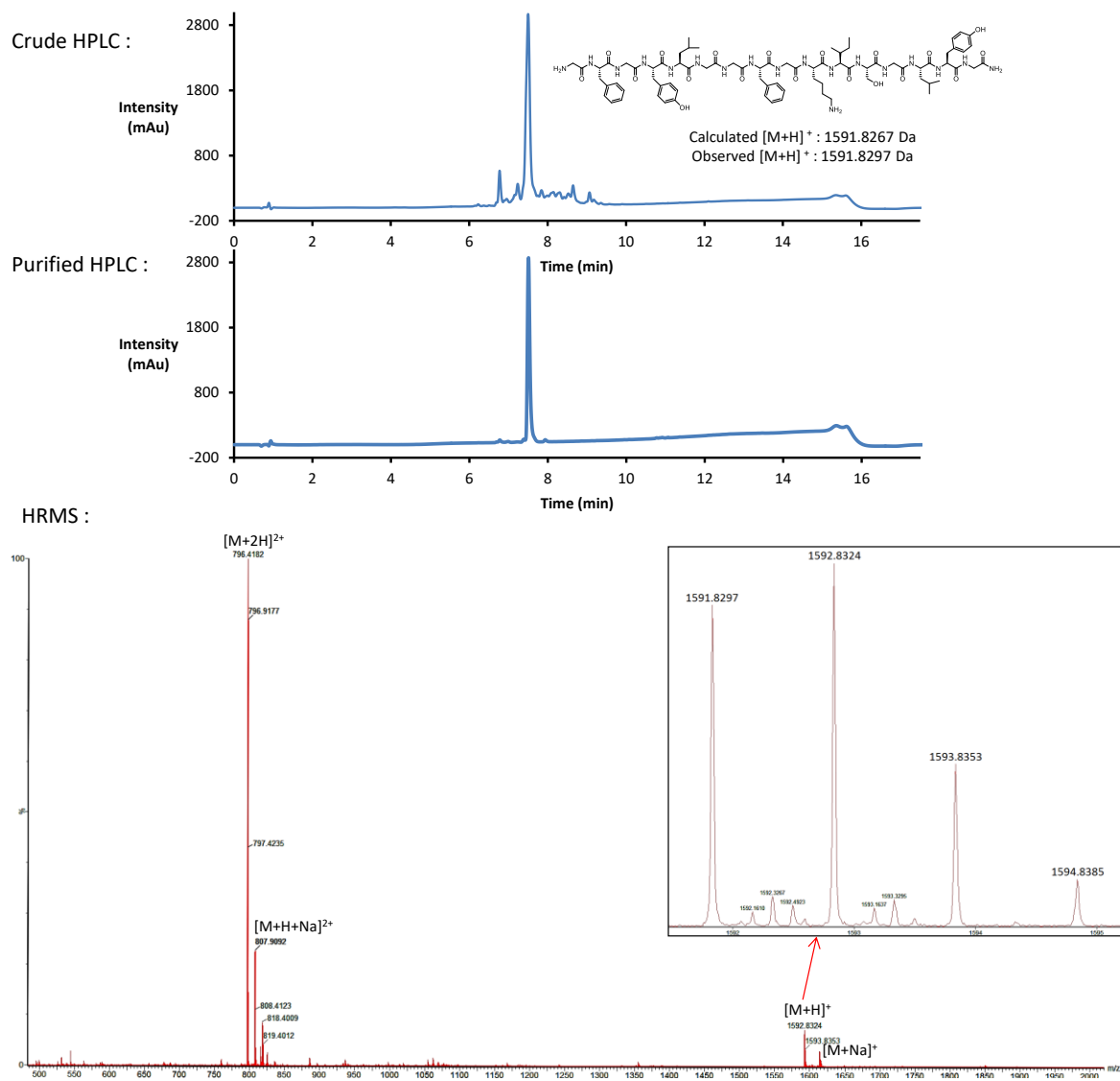


Figure S6. (Continued)

H-Gly-Phe-Gly-Tyr-Leu-Gly-Gly-Phe-Gly-Lys-Leu-Gly-Tyr-Ile-Val-Gly-NH<sub>2</sub> (9)

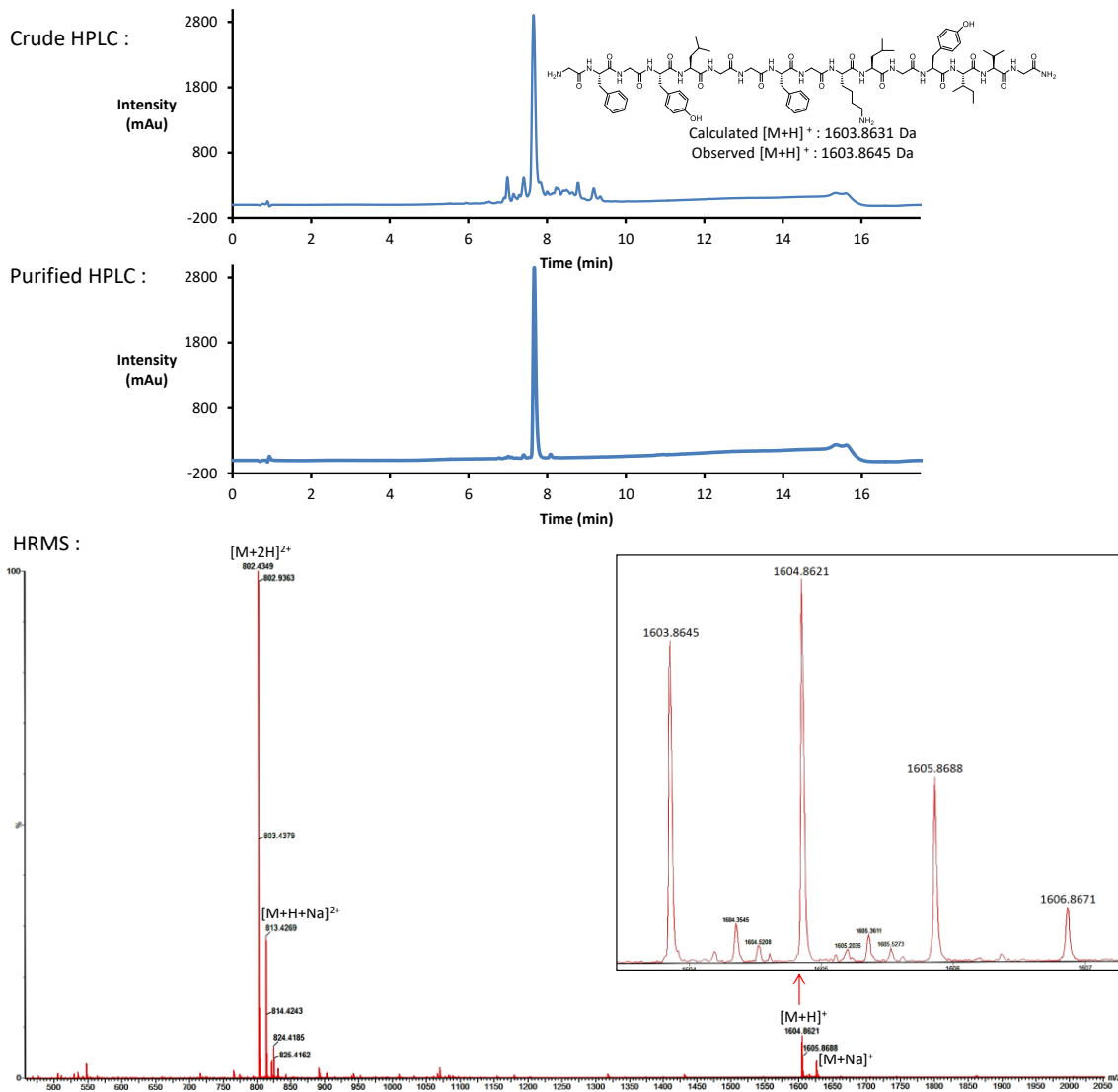


Figure S6. (Continued)

H-Gly-Phe-Gly-Tyr-Leu-Gly-Lys-Cys-Phe-Gly-Gly-Phe-Gly-Lys-Ile-Ser-Gly-Leu-Tyr-Gly-NH<sub>2</sub> (10)

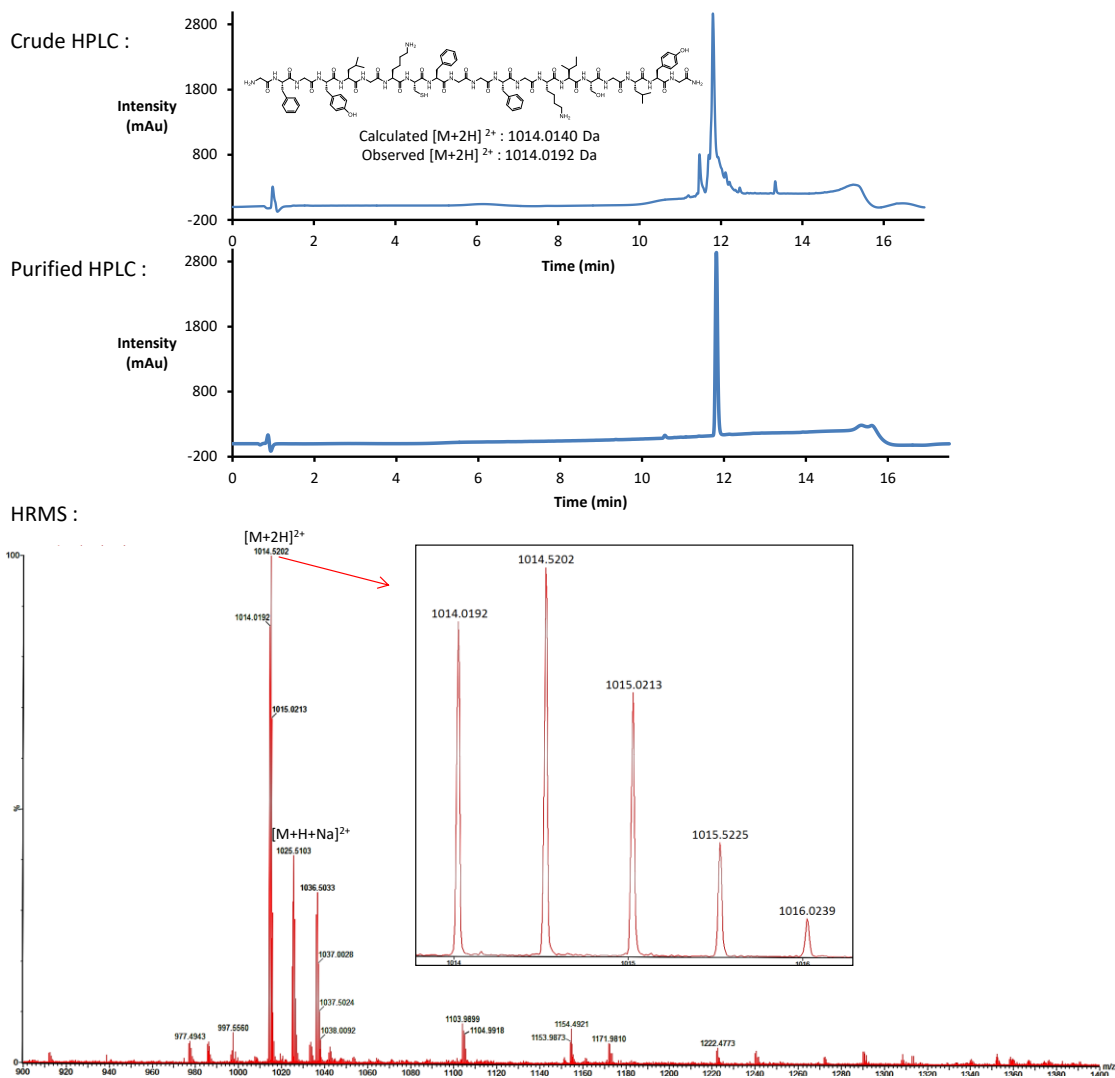


Figure S6. (Continued)

H-Gly-Phe-Gly-Tyr-Leu-Gly-Lys-Cys-Phe-Gly-Gly-Phe-Gly-Lys-Leu-Gly-Tyr-Ile-Val-Gly-NH<sub>2</sub> (**11**)

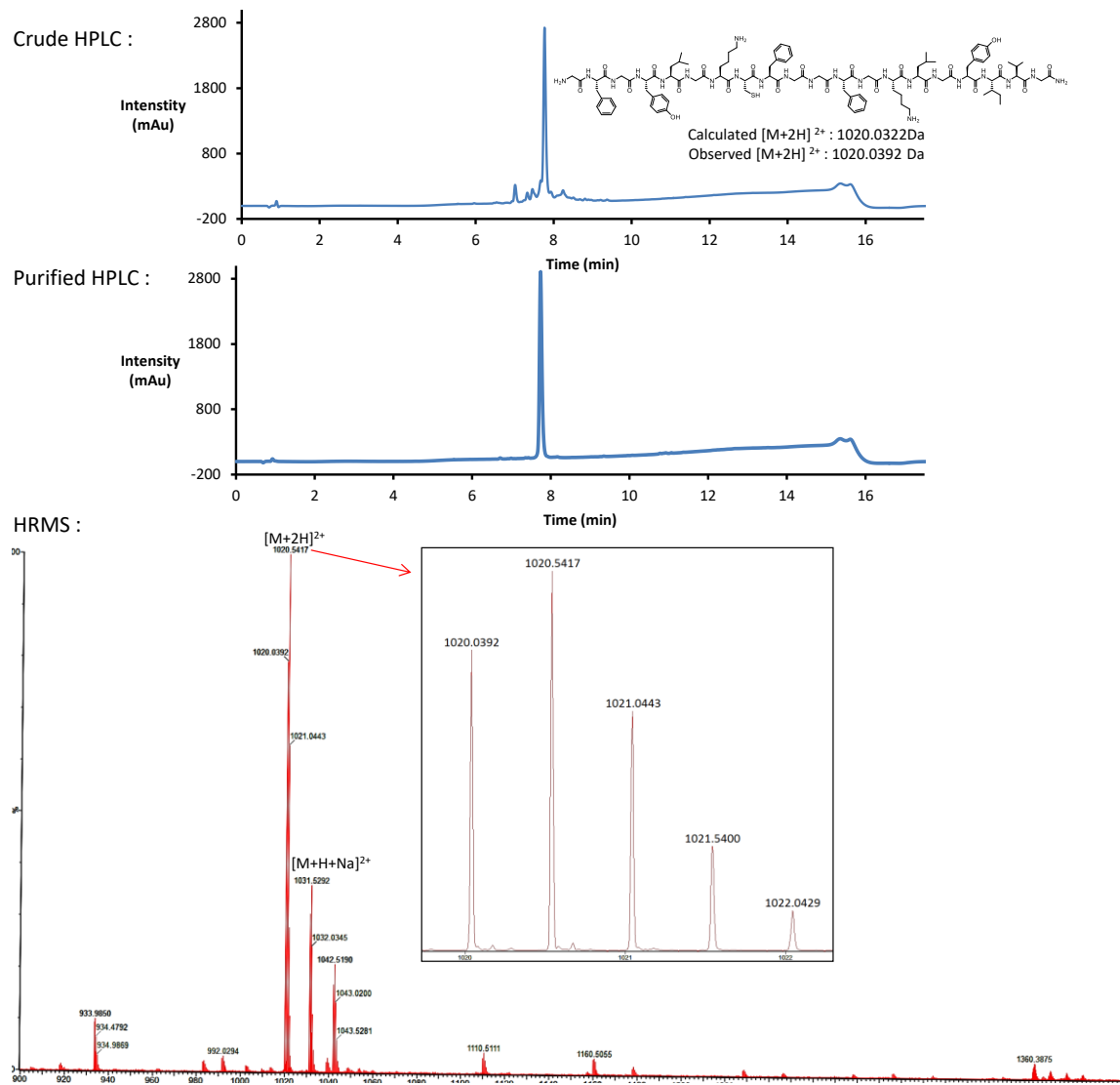


Figure S6. (Continued)

H-Gly-Phe-Gly-Tyr-Leu-Gly-Gly-Phe-Gly-Val-Ala-Tyr-Lys-Ile-Gly-Leu-Phe-Ala-Pro-Gly-Ala-NH<sub>2</sub> (12)

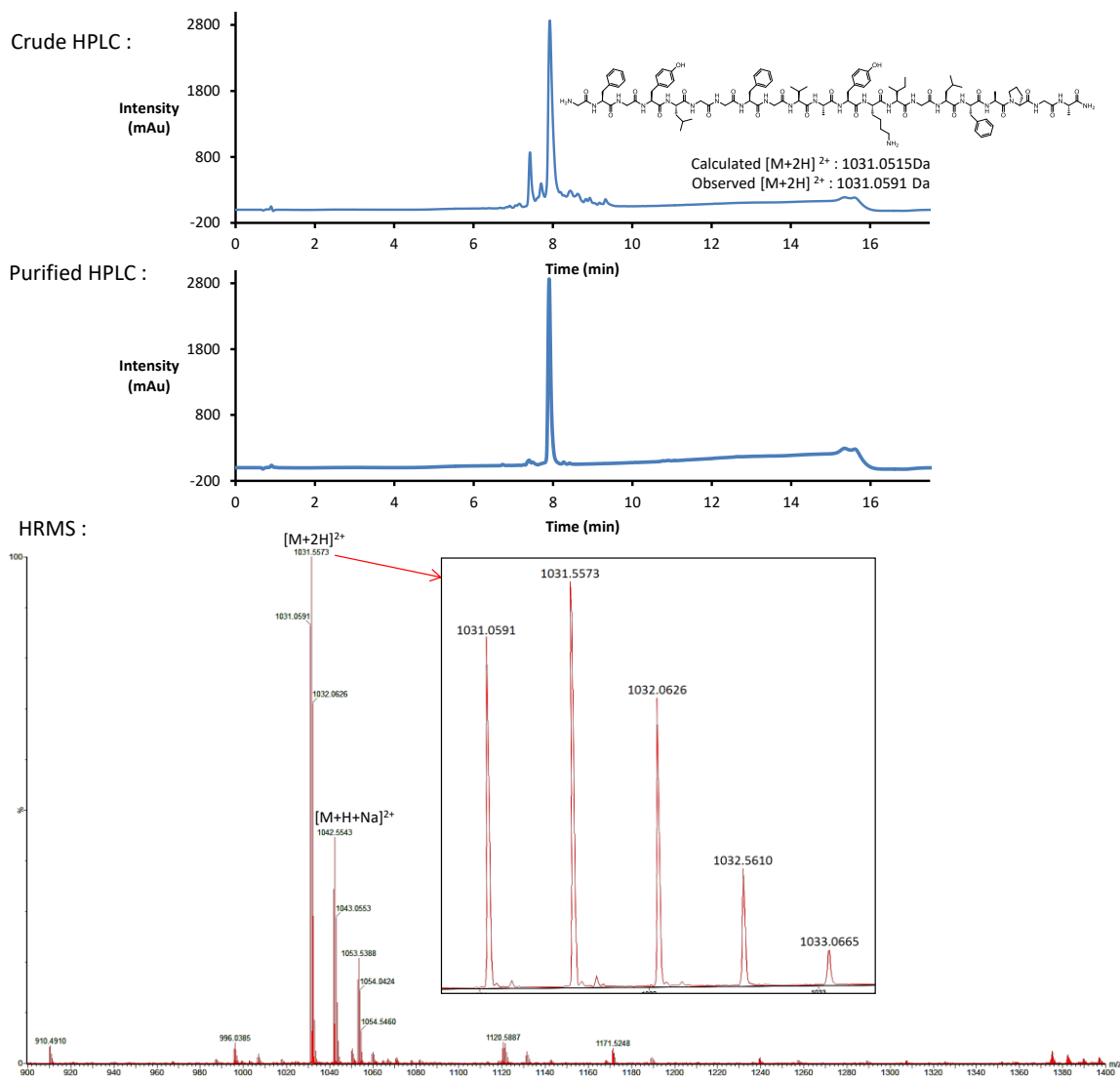


Figure S6. (Continued)

H-Gly-Phe-Gly-Tyr-Leu-Gly-Lys-Cys-Phe-Gly-Gly-Phe-Gly-Val-Ala-Tyr-Lys-Ile-Gly-Leu-Phe-Ala-Pro-Gly-Ala-NH<sub>2</sub> (**13**)

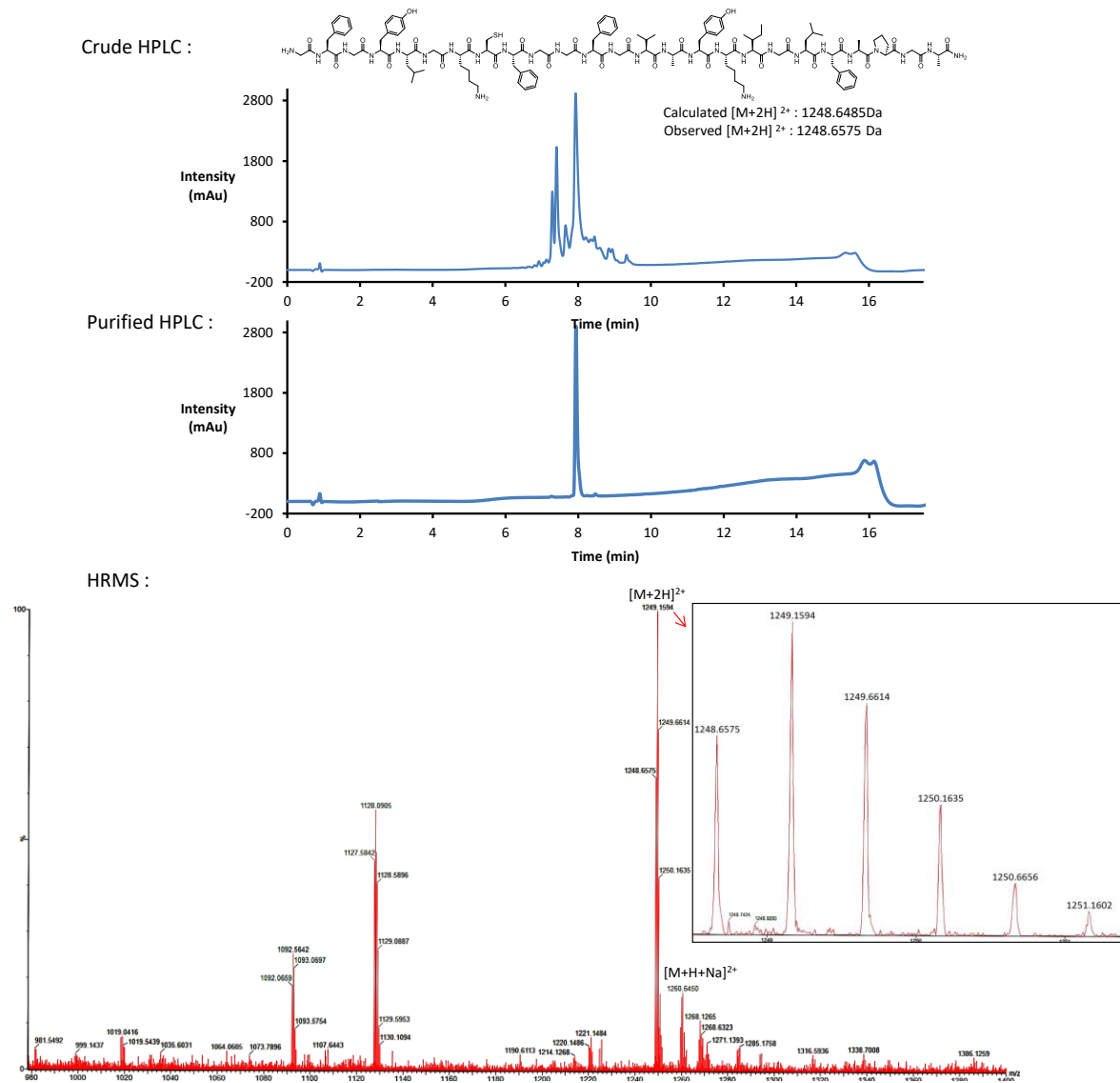




Figure S6. (Continued)

H-Gly-Phe-Gly-Ala-Lys-Leu-Tyr-Val-Gly-Ile-Cys-Gly-Pro-Ala-Gly-Gly-Phe-Gly-Val-Ala-Tyr-Lys-Ile-Gly-Leu-Phe-Ala-Pro-Gly-Ala-NH<sub>2</sub> (**14**)

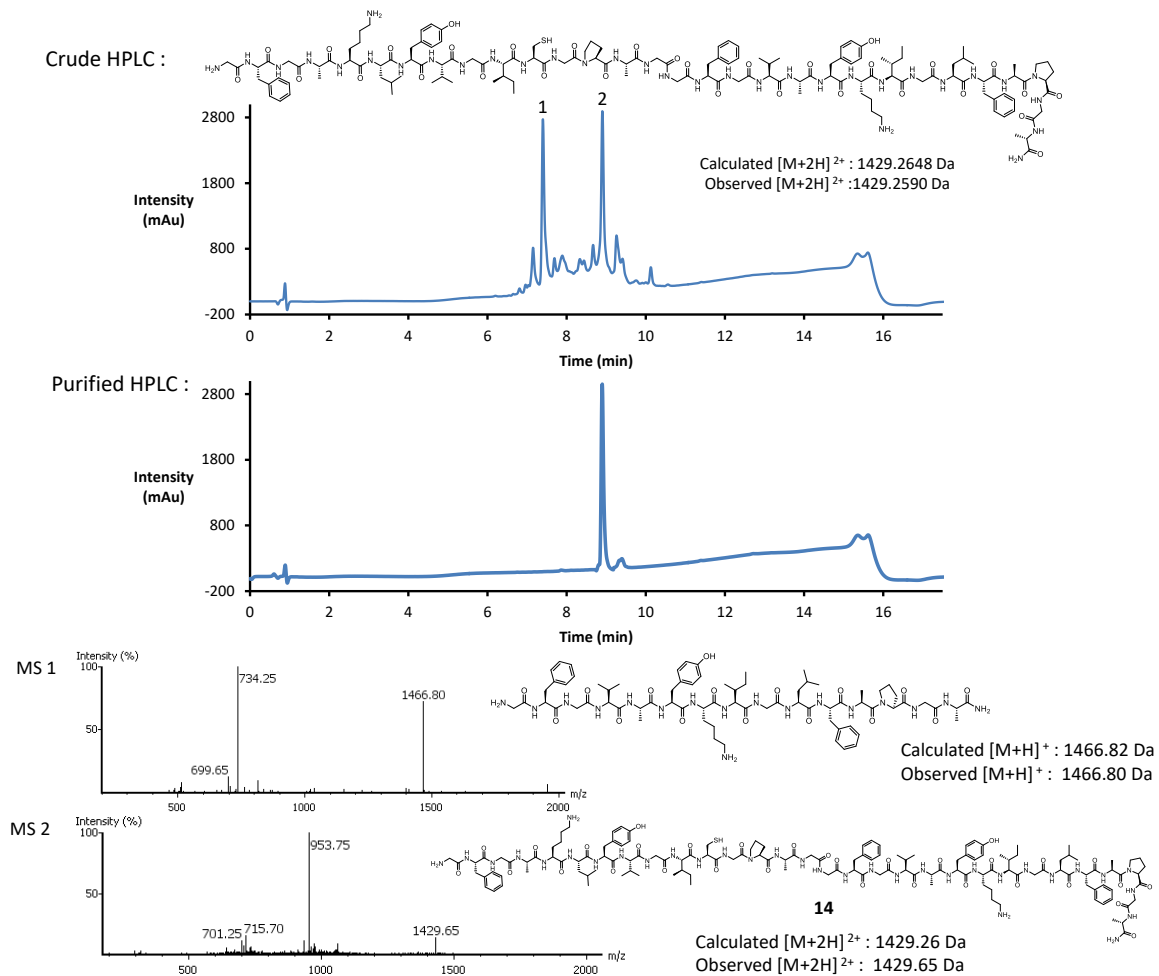
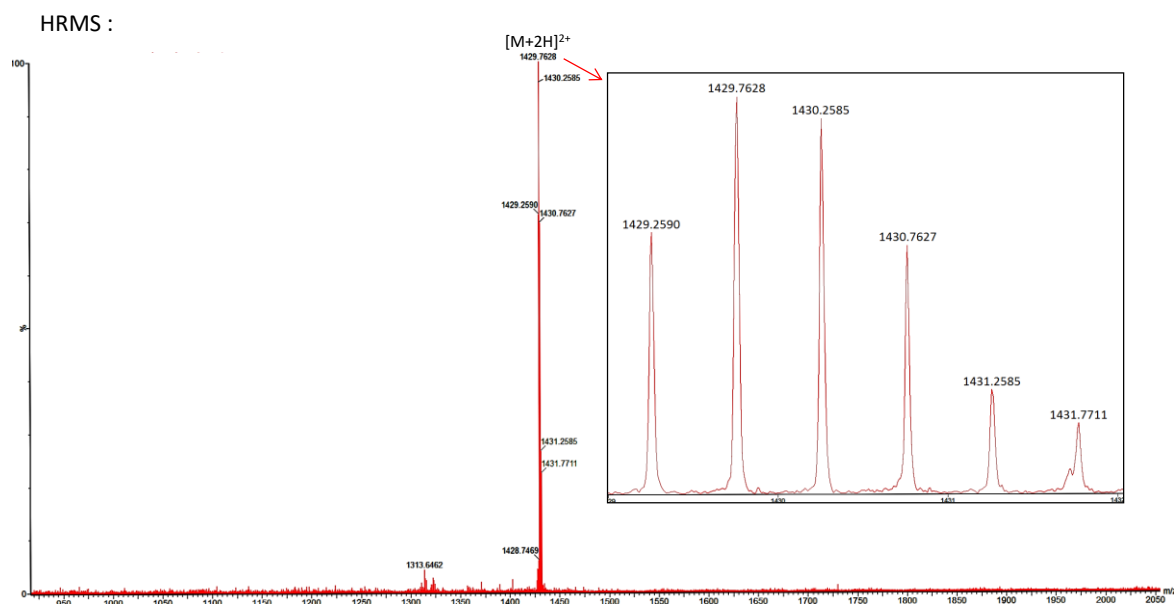
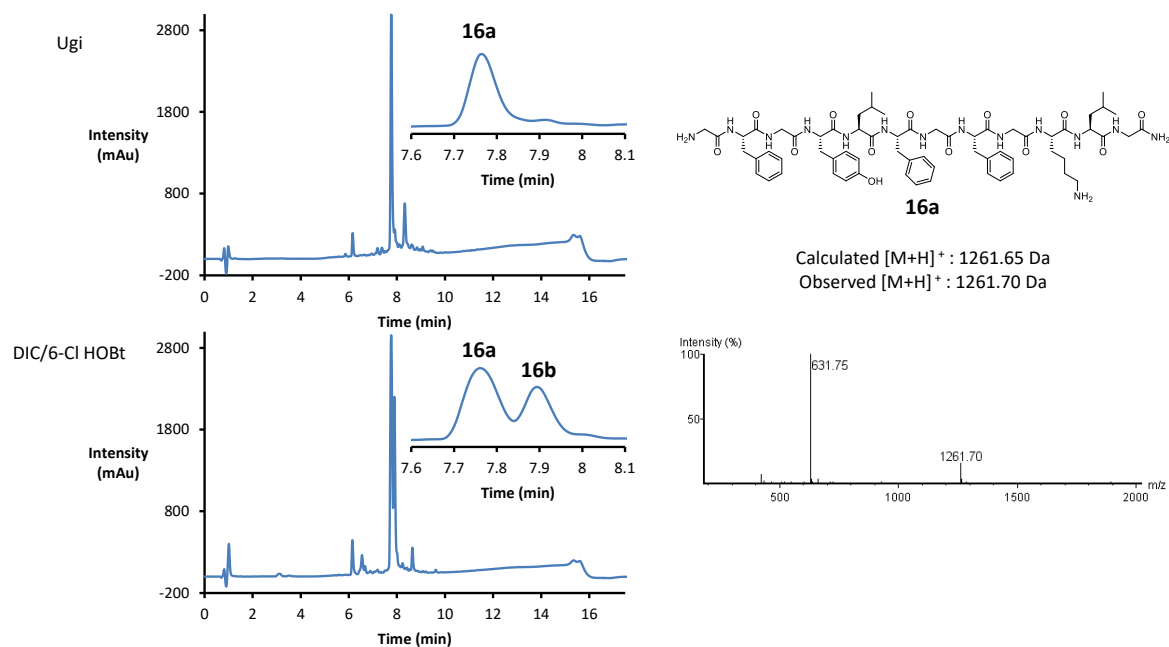


Figure S6. (Continued)

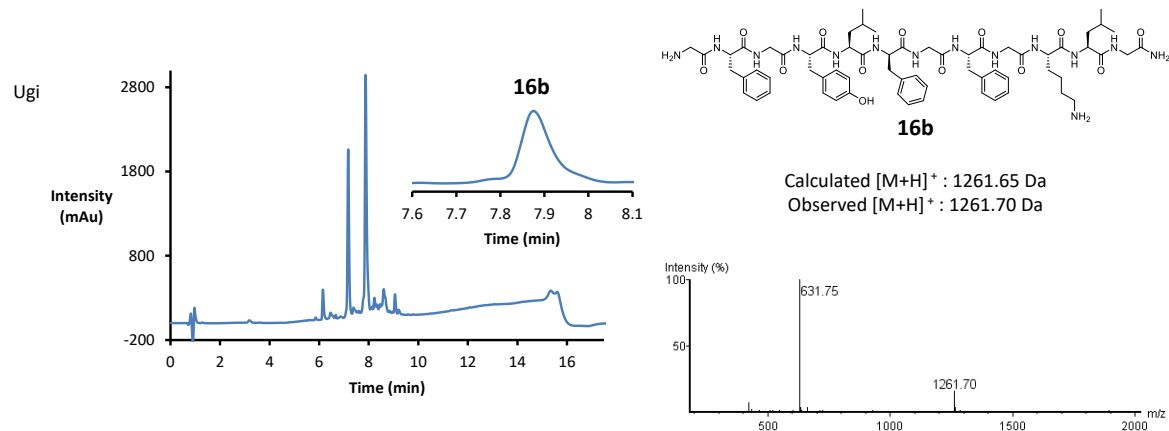


**Figure S7.** HPLC profiles ( $\lambda = 220$  nm) and ESI-MS spectra of peptides **16a** and **16b**.

Coupling of Fmoc-GFGYLF-OH **15a** to C-terminal fragment **1**



Coupling of Fmoc-GFGYLF-OH **15b** to C-terminal fragment **1**





## **Chapitre 4**

### **Synthèse de macrocycles peptidiques sur support solide par ancrage du squelette peptidique par réaction de Ugi**



## **Avant-propos**

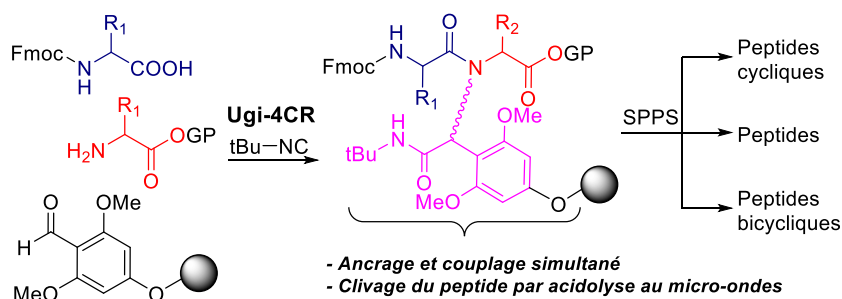
Le chapitre 4 inclut un manuscrit qui sera soumis sous forme de communication au journal *Tetrahedron Letters*.

Mon directeur de recherche, Éric Biron, a supervisé et fait le design des travaux en donnant des idées novatrices à expérimenter en laboratoire. Il a également participé très activement à la rédaction du manuscrit.

Pour ma part, j'ai effectué toutes les manipulations que l'on retrouve dans cet article, en plus d'avoir rassemblé les résultats dans la partie expérimentale et de rédiger le plan et le brouillon de l'article.

## Résumé

La synthèse de macrocycles peptidiques sur support solide par cyclisation tête-à-queue via la formation d'un lien amide entre le N- et le C-terminal nécessite habituellement l'utilisation d'ancrages par une chaîne latérale ou le squelette peptidique. Dans cet article, nous décrivons l'utilisation de la réaction multicomposante de Ugi pour lier deux acides aminés sur un support solide par ce même squelette en une seule étape simple et rapide. En effectuant la réaction, la formation d'un ancrage clivable par acidolyse s'effectue simultanément. En plus de se faire plus rapidement et efficacement, tout en utilisant moins d'excès de réactifs que l'amination réductive, cette nouvelle méthode d'ancrage de peptides par leur lien amide ajoute également un degré d'orthogonalité à la synthèse, puisque l'utilisation de micro-ondes est nécessaire au clivage du support solide. Cette approche simple et efficace a été optimisée et appliquée à la synthèse de peptides linéaires, cycliques et bicycliques, donnant généralement les produits en rendements modérés et avec de bonnes puretés, ce qui est bien compte tenu de la complexité des produits formés.





*Tetrahedron Letters*, 2017 (To be submitted)

**Solid-phase synthesis of macrocyclic peptides by backbone anchoring using a traceless Ugi multicomponent approach**

Steve Jobin and Eric Biron\*

*Faculté de pharmacie, Université Laval, Québec (QC), G1V 0A6, Canada*

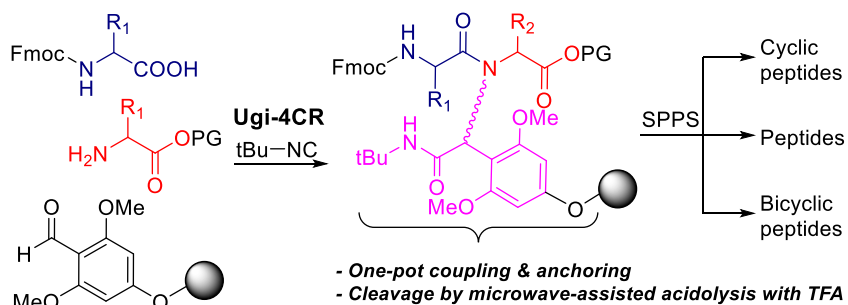
and

*Laboratoire de chimie médicinale, Centre de recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Québec, 2705 Boulevard Laurier, Québec (QC), G1V 4G2, Canada*

\*Corresponding author: E-mail : [Eric.Biron@pha.ulaval.ca](mailto:Eric.Biron@pha.ulaval.ca)

## Abstract

A new methodology to anchor peptides by their backbone to a solid support in a single step using an isocyanide-based multicomponent reaction is described. The approach uses a microwave-assisted Ugi four-component reaction to simultaneously condense and bind an *N*-protected amino acid and an amino ester to a supported aldehyde. Afterward, the generated backbone anchored dipeptide can be used in solid-phase peptide synthesis to prepare head-to-tail cyclic peptides. We also show that the backbone anchored peptide can be efficiently released from the resin by microwave-assisted acidolysis with trifluoroacetic acid. This straightforward one-pot Ugi reaction anchoring approach was also applied to condense fragments and prepare a variety of linear and macrocyclic peptides.



## Article

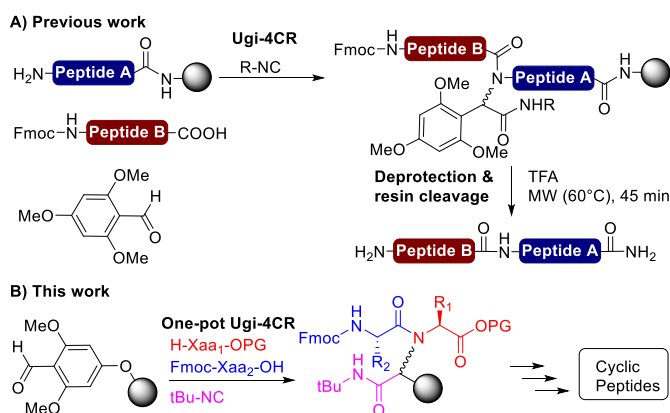
Peptide macrocycles are a very attractive class of bioactive compounds that have gained significant interest in drug discovery.<sup>1-4</sup> Compared to their linear counterparts, cyclic peptides are more resistant to proteases.<sup>5, 6</sup> Moreover, their conformational rigidity makes them tighter-binding to a given macromolecule and allow functional and conformational fine-tuning.<sup>2,7-9</sup> Therefore, peptide macrocycles are very useful scaffolds in structure-activity relationship studies and valuable lead compounds in drug development.<sup>1,4,10-12</sup> For these reasons, a wide variety of synthetic methodologies have been developed over the years to perform peptide macrocyclization.<sup>2,12-17</sup>

Compared to normal peptide bond formation, ring-closing reactions usually proceed much more slowly and side reactions, such as oligomerization and cyclodimerization of linear peptide precursors, may be observed and even predominate.<sup>18-20</sup> To minimize these intermolecular processes, the cyclization reaction must be performed under high dilution conditions ( $10^{-4}$  to  $10^{-3}$  M) or using “pseudo-high” dilution methods with syringe pumps.<sup>21</sup> Another strategy is to perform the cyclization step while the peptide is still bound to the solid support. With limited mobility, resin-bound peptides are less prone to encounter one another creating a pseudo-dilution phenomenon that favours intramolecular cyclization over undesired intermolecular side reactions.<sup>22-24</sup>

On-resin macrocyclization generally requires at least three dimensions of orthogonal protecting groups to allow selective deprotection of the reactive ends (N- or C-terminus or side chain) and ring-closing on solid support.<sup>25-30</sup> While side chain-to-tail, head-to-side chain and side chain-to-side chain cyclization can be performed with an anchored C-terminal and commonly used linkers, head-to-tail cyclization implies the anchoring of the linear peptide precursor via: (i) a side chain functional group, (ii) a backbone amide or (iii) C-terminal bonding on latent inducible linkers (safety-catch) for cyclative cleavage. Unlike side chain anchoring which requires the presence of a trifunctional amino acid such as Asp, Glu, Lys, Ser or Tyr in the sequence, backbone anchoring can be performed with any amino acid.<sup>31-33</sup> This approach known as the backbone amide linker strategy (BAL) involves the coupling of an  $\alpha$ -amino ester (H-Xaa-OPG) to an aromatic aldehyde linker by reductive amination followed by acylation of the generated benzylic amine with the next amino acid under standard coupling conditions.<sup>32,33</sup> Backbone anchoring by reductive amination usually involves large excess of reagents, long reaction time and difficult

acylation on a bulky secondary amine. In an effort to reduce reagents equivalents, reaction time and the number of steps, we decided to use a multicomponent reaction to simultaneously link the C-protected amino acid, N-protected amino acid and aldehyde linker. Herein we report a simple and affordable one-pot approach for the backbone anchoring of protected peptides and solid-phase synthesis of cyclic and bicyclic peptides.

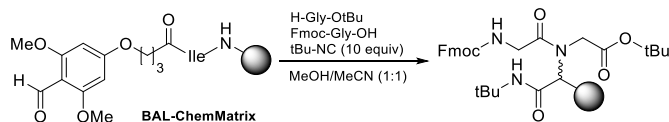
Our strategy was based on a traceless-Ugi multicomponent reaction we have recently described to efficiently couple peptide fragments on solid support (Scheme 1a).<sup>34</sup> In this previous study, an on-resin Ugi four-component reaction (Ugi-4CR) was used to attach a carboxyl free peptide to a supported peptide bearing a free N-terminal amine via the formation of an *N*-protected amide bond at the ligation site. Afterward, the generated backbone amide protecting group was efficiently removed by microwave-assisted acidolysis with trifluoroacetic acid (TFA) to afford a fully deprotected peptide. Among tested aldehyde derivatives, the 2,4,6-trimethoxybenzaldehyde gave the best Ugi-4CR and deprotection yields. This high degree of similarity with the tris(alkoxy)benzaldehyde BAL linker led us to design the present study where the aldehyde component is supported and used to anchor a peptide by its backbone with a Ugi-4CR and allow the release of the final compound by acidolysis.



**Scheme 1.** Solid-phase traceless-Ugi-4CR ligation and backbone anchoring.

To evaluate the on-resin Ugi-4CR with a supported aldehyde, the BAL linker 4-(4-formyl-3,5-dimethoxyphenoxy)butanoic acid was coupled to H-Ile-ChemMatrix® (CM) resin.<sup>33</sup> CM resin was selected to perform the anchoring reaction because of its compatibility with polar solvents such as MeOH usually used in Ugi-4CR.<sup>35</sup> The efficiency of the reaction was

determined by comparing the post-Ugi and initial (Fmoc-Ile-CM) loadings obtained by dosage of the Fmoc-group using the method reported by Gude *et al.* (Table 1).<sup>36</sup> Initial Ugi-4CR anchoring were performed on BAL-CM resin with *tert*-butyl isocyanide (10 equiv), Fmoc-Gly-OH (5 equiv) and H-Gly-OtBu hydrochloride salt (2.5 equiv) in MeOH/CH<sub>3</sub>CN (1:1) with microwave (MW) heating at 60°C in a sealed vial for 60 min. Unfortunately, no resin-bound product was observed and the hydrochloride salt was suspected to prevent imine formation during the Ugi-4CR. The addition of DIEA to the mixture did not allow the formation of dipeptide on the resin. However, the use of the free amine H-Gly-OtBu in the Ugi-4CR anchoring yielded a very good loading (Table 1, entry 1). The results showed that the reaction is nearly completed in 30 min with MW heating at 60°C (entry 2) and that the use of more H-Gly-OtBu did not increase the yield (entry 3). On the other hand, fewer equivalents of Fmoc-Gly-OH or both amine and acid components yielded significantly lower loadings (entries 4 and 5). The use of MW heating at 100°C did not increase the loading (entry 6), which might be caused by degradation of the desired product. The Ugi-4CR anchoring was also evaluated at room temperature (entries 7-9) and the results showed that the reaction was nearly completed after 48 h with 97% yield while completion was observed after 72 h. This first evaluation clearly showed the efficiency of MW irradiation to accelerate the on-resin Ugi-4CR where completion is reached after 30 min instead of 48 to 72 h at room temperature. The results observed with the best Ugi-4CR conditions were similar to the loading obtained by reductive amination (entry 10). However, the Ugi-4CR anchoring was performed in a single step and required less time and reagents equivalents. Based on these results, the next experiments were conducted with reaction conditions used for entry 2, i.e. H-Xaa-OPG (2.5 equiv), Fmoc-Xaa-OH (5 equiv), *tert*-butyl isocyanide (10 equiv) in MeOH/CH<sub>3</sub>CN (1:1) and MW heating at 60°C for 30 min.

**Table 1.** Selection of the optimal reaction conditions for backbone anchoring by Ugi-4CR

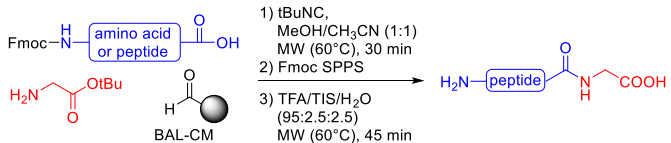
Entry	Time (h)	Temperature (°C)	Amine (equiv.)	Acid (equiv.)	Loading (mmol/g) <sup>a</sup>	Yield (%) <sup>b</sup>
1	1	MW (60°C)	2.5	5	0.298	>99
2	0.5	MW (60°C)	2.5	5	0.293	98
3	0.5	MW (60°C)	5	5	0.293	98
4	0.5	MW (60°C)	5	2.5	0.213	72
5	0.5	MW (60°C)	1	1.2	0.161	54
6	0.5	MW (100°C)	2.5	5	0.107	36
7	24	rt	2.5	5	0.191	64
8	48	rt	2.5	5	0.286	97
9	72	rt	2.5	5	0.296	>99
10 <sup>c</sup>	3 + 3	rt	10	5	0.295	>99

<sup>a</sup>The experimental loading was determined by dosage of the Fmoc group. <sup>b</sup>Yields were calculated according to the experimental loading for Fmoc-Ile-CM (0.297 mmol/g). <sup>c</sup>Performed by reductive amination.<sup>32</sup> *Reagent and conditions:* i) NaBH<sub>3</sub>CN (10 equiv), HCl·H-Gly-OtBu (10 equiv), DMF, rt, 3 h; ii) Fmoc-Gly-OH (5 equiv), HATU (5 equiv), NMM (10 equiv), DMF, 3 h, rt.

To assess the compatibility of the methodology with standard Fmoc solid-phase peptide synthesis (SPPS), various peptides were prepared by iterative amino acids coupling or by fragment ligation (Table 2). First, C-terminal dipeptide anchoring was performed as described above and the peptides assembled by standard Fmoc solid-phase peptide synthesis. Afterward, the peptides were simultaneously deprotected and released from the resin in presence of TFA with MW heating at 60°C for 45 min to be analyzed and purified by HPLC. The results showed that peptides 1-3 were obtained with excellent crude purities and in good yields. Compared to the peptide obtained after reductive amination with 81%

crude purity and in 53% yield, peptide **1** prepared by Ugi-4CR anchoring and MW-assisted cleavage showed a crude purity of 92% and was isolated in 72% yield.

**Table 2.** Crude purities and isolated yields for peptides prepared by Ugi-4CR backbone anchoring



Oligomer	Sequence <sup>a</sup>	Purity <sup>b</sup> (%)	Yield <sup>c</sup> (%)
<b>1<sup>d</sup></b>	GYKL <u>GG</u>	81	53
<b>1</b>	GYKL <u>GG</u>	92	72
<b>2</b>	GYKL <u>AG</u>	92	36
<b>3</b>	GYKL <u>FG</u>	93	51
<b>4<sup>e</sup></b>	GFGYL <u>GG</u>	95	60
<b>5<sup>e</sup></b>	GFGYL <u>FG</u>	82	58
<b>6<sup>e</sup></b>	GFGYL <u>GG</u> FGYLG-NHPr	72	5

<sup>a</sup>Ligation site is underlined. <sup>b</sup>Crude purities were determined by UV absorbance at 220nm. <sup>c</sup>Isolated yields after preparative HPLC purification. Based on the experimental loading for Fmoc-Ile-CM resin (0.297 mmol/g). <sup>d</sup>Anchoring by reductive amination. <sup>e</sup>Fragment coupling with Fmoc-GFGY(tBu)LG-OH, Fmoc-GFGY(tBu)LF-OH or H-GFGY(tBu)LG-NHPr.

Peptide **3** was prepared to evaluate the presence of epimerization at the ligation site. A Phe residue was used at the ligation site because it is particularly prone to C-terminal epimerization.<sup>37</sup> However, only one diastereoisomer was observed, suggesting that the stereochemistry of the C-terminal residue is conserved. This first series of results was very interesting and suggest that the described approach offers several advantages over the reductive amination procedure such as one-pot reaction, shorter reaction time and fewer reagent equivalents.

To perform peptide fragment anchoring, N-terminal fragments were beforehand assembled on 2-chlorotryl chloride resin and released with a solution of 1,1,1,3,3,3-

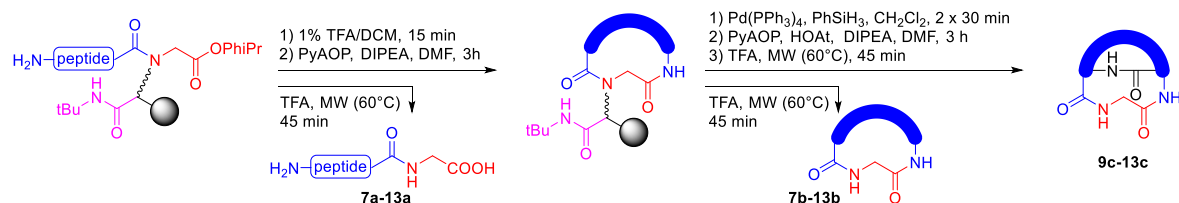
hexafluoroisopropanol (HFIP) in DCM to yield protected hexapeptides with free C-terminal carboxylic acids. Backbone anchoring of the N-terminal fragment with H-Gly-OtBu was performed as described above. After protecting group removal and cleavage from the resin, peptides **4** and **5** were obtained in 95% and 82% crude purities and isolated in 60% and 58% yields, respectively. These results showed that the Ugi-4CR anchoring can also be efficiently achieved with peptide fragments. Finally, to evaluate if peptide fragment ligation can be performed by Ugi-4CR with the BAL-CM resin, a C-terminal fragment was prepared on HMBA resin and release with *N*-propylamine to yield a protected hexapeptide with a free N-terminal amine and a C-terminal *N*-propylamide. Coupling of the C- and N-terminal fragments by Ugi-4CR afforded 12-mer peptide **6** with 72% crude purity but in a very poor 5% isolated yield. This suggests that conditions are not the same for peptides fragments and for amino acids. Therefore, a further optimization for fragments coupling would be necessary.

Finally, to evaluate if the increased steric hindrance of the anchoring site affects cyclization efficiency, backbone anchored peptides were prepared by Ugi-4CR and standard SPPS to be submitted to macrocyclization (Table **3**). As on-resin cyclization requires a third degree of orthogonal protecting groups, the acid sensitive 2-phenylpropan-2-yl (PhiPr) group was used as C-terminal protection. The amino ester H-Gly-OPhiPr was prepared as described by Virta *et al.*<sup>38</sup> and used in the Ugi-4CR anchoring. In this case, the PhiPr ester is very useful because it can prevent the formation of diketopiperazines during Fmoc removal on the anchored dipeptide as observed with methyl, benzyl and allyl esters.<sup>33,39</sup> Moreover, the PhiPr ester can be cleaved with very mild acidic conditions such as 1% TFA in DCM to avoid peptide release from the resin. After their synthesis, a small portion of the supported linear precursors were cleaved by MW-assisted acidolysis to be analyzed and purified by HPLC. The results showed that peptides **7a-13a** were obtained in crude purities ranging from 73% to 95% and isolated in 40% to 77% yields. Afterward, the supported linear precursors were submitted to selective N-terminal Fmoc-group removal with 20% piperidine in DMF and C-terminal PhiPr ester cleavage with a solution of 1% TFA in DCM to allow on-resin head-to-tail macrocyclization with PyAOP and DIPEA in DMF for 3 h. After their release from the resin, cyclic peptides **7b-13b** were obtained in crude purities ranging from 57% to 79% and isolated in 21% to 42% yields after their purification by HPLC. For each case, a 50% decrease in isolated yields was observed with the linear



precursor as the major impurity. Finally, to demonstrate the compatibility of the anchoring moiety with allyl ester and alloc group hydrogenolysis, an additional cyclization was performed between Lys and Glu side chains after their deprotection. With their increased structural rigidity, bicyclic peptides can be very useful scaffolds in combinatorial libraries and drug discovery.<sup>40-42</sup> Bicyclic peptides were prepared from supported cyclic peptides **9b-13b** after Lys(Alloc) and Glu(Oall) side chain deprotection with Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> and phenylsilane in DCM followed by side chain-to-side chain cyclization with PyAOP. Compound release from the resin by MW-assisted cleavage with TFA afforded bicyclic peptides **9c-13c** in 55-97% crude purities and moderate 11-31% yields. For some bicyclic peptides, the observed decrease in isolated yields could be explained by the increased rigidity of the cyclic precursor making the reaction between the reactive ends more difficult. Overall, the peptides, whether linear, cyclic or bicyclic, prepared by Ugi-4CR backbone anchoring were obtained in very good crude purities and good yields. These results showed that the Ugi-4CR backbone anchoring and the MW-assisted acidolysis are compatible with protecting groups used in standard Fmoc SPPS and can be used to efficiently prepare peptide macrocycles.

**Table 3.** Crude purities and purified yields for linear (**7a-13a**), cyclic (**7b-13b**) and bicyclic (**9c-13c**) oligomers



#	Linear peptides ( <b>7a-13a</b> )			Cyclic peptides ( <b>7b-13b</b> )			Bicyclic peptides ( <b>9c-13c</b> )		
	Sequence <sup>a</sup>	Purity (%) <sup>b</sup>	Yield (%) <sup>c</sup>	Sequence	Purity (%) <sup>b</sup>	Yield (%) <sup>c</sup>	Sequence	Purity (%) <sup>b</sup>	Yield (%) <sup>c</sup>
7	GYKL <u>GG</u>	92	66	c[GYKL <u>GG</u> ]	66	36			
8	GFGYL <u>GG</u>	95	48	c[GFGYL <u>GG</u> ]	71	29			
9	GLK*PYKE* <u>GG</u>	76	53	c[GLK*PYKE* <u>GG</u> ]	74	31	c[GLc[KPYKE] <u>GG</u> ]	74	31
10	GLAK*YPAKGE* <u>GG</u>	73	51	c[GLAK*YPAKGE* <u>GG</u> ]	57	25	c[GLAc[KYPAKGE] <u>GG</u> ]	82	22
11	GLK*PYKGE* <u>G</u>	85	77	c[GLK*PYKGE* <u>G</u> ]	79	42	c[GLc[KPYKGE] <u>G</u> ]	75	24
12	GAK*YLKE* <u>GG</u>	79	41	c[GAK*YLKE* <u>GG</u> ]	70	21	c[GAc[KYLKE] <u>GG</u> ]	55	11
13	K*GAPYKAE* <u>GG</u>	79	40	c[K*GAPYKAE* <u>GG</u> ]	66	32	c[c[KGAPYKAE] <u>GG</u> ]	97	12

<sup>a</sup>Ligation site is underlined; K\* = Lys(Alloc); E\* = E(OAll); c = cyclo. <sup>b</sup>Crude purities were determined by HPLC. <sup>c</sup>Isolated yield after purification by preparative HPLC. Based on the experimental loading of 0.297 mmol/g for Fmoc-Ile-CM.

In summary, a convenient one-pot Ugi-4CR was developed to anchor peptides by their backbone to a solid support. The study showed that the use of MW irradiations significantly accelerated the Ugi-4CR anchoring and allowed an efficient peptide release from the resin in presence of TFA. Compared to the reductive amination procedure, the described Ugi-4CR anchoring can be performed in a single step of 30 min with less reagents equivalents. The results obtained in this work demonstrate that the described approach is compatible with standard Fmoc solid-phase peptide synthesis and can be used to prepare linear and macrocyclic peptides. Parameters such as the impact of MW temperature, the efficiency of C- and N-terminal amino acid residues at the anchoring site; and the effect of reagents equivalents are currently under investigation to expand the applicability of the approach and allow one-pot peptide ligation-anchoring and macrocyclization-anchoring. Simple and affordable, the described procedure is likely to become a useful method to perform backbone anchoring and prepare peptide macrocycles by the backbone anchoring strategy.

## Acknowledgments

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). S.J. thanks the Fond d'enseignement et de recherche de la Faculté de pharmacie de l'Université Laval and the Fondation du CHU de Québec for scholarships. The authors are grateful to Nancy Boucher and Pierre-Luc Plante of CHU de Québec Research Centre for HRMS analyses.

## References and notes

1. Driggers, E. M.; Hale, S. P.; Lee, J.; Terrett, N. K. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 608.
2. Yudin, A. K. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 30.
3. Fosgerau, K.; Hoffmann, T. *Drug Discov. Today* **2015**, *20*, 122.
4. Thapa, P.; Espiritu, M.; Cabaltea, C.; Bingham, J.-P. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2014**, *20*, 545.
5. Tyndall, J. D. A.; Nall, T.; Fairlie, D. P. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 973.
6. Hess, S.; Ovadia, O.; Shalev, D. E.; Senderovich, H.; Qadri, B.; Yehezkel, T.; Salitra, Y.; Sheynis, T.; Jelinek, R.; Gilon, C.; Hoffman, A. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 6201.
7. Weide, T.; Modlinger, A.; Kessler, H. In *Spatial screening for the identification of the bioactive conformation of integrin Ligands*; Springer-Verlag Berlin, Berlin, 2007; Vol. 272. pp 1.
8. Heckmann, D.; Kesster, H. In *Design and chemical synthesis of integrin ligands*; Elsevier Academic Press Inc, San Diego, 2007; Vol. 426. pp 463.
9. Hill, T. A.; Shepherd, N. E.; Diness, F.; Fairlie, D. P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 13020.
10. Tapeinou, A.; Matsoukas, M.-T.; Simal, C.; Tselios, T. *Pept. Sci.* **2015**, *104*, 453.
11. Mallinson, J.; Collins, I. *Future Med. Chem.* **2012**, *4*, 1409.
12. Marsault, E.; Peterson, M. L. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1961.
13. De Leon Rodriguez, L. M.; Weidkamp, A. J.; Brimble, M. A. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 6906.
14. White, C. J.; Yudin, A. K. *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 509.
15. Davies, J. S. *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 471.
16. Lambert, J. N.; Mitchell, J. P.; Roberts, K. D. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, 471.
17. Jiang, S.; Li, Z.; Ding, K.; Roller, P. P. *Curr. Org. Chem.* **2008**, *12*, 1502.
18. Schmidt, U.; Langner, J. *J. Pept. Res.* **1997**, *49*, 67.

19. Izumiya, N.; Kato, T.; Waki, M. *Biopolymers* **1981**, *20*, 1785.
20. Schmidt, R.; Neubert, K. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *37*, 502.
21. Malesevic, M.; Strijowski, U.; Bächle, D.; Sewald, N. *J. Biotechnol.* **2004**, *112*, 73.
22. Mazur, S.; Jayalekshmy, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 677.
23. Scott, L. T.; Rebek, J.; Ovsyanko, L.; Sims, C. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 625.
24. Barany, G.; Gross, E.; Meienhofer, J. *Peptides Analysis, Synthesis, Biology*, 1980.
25. Kates, S. A.; Solé, N. A.; Johnson, C. R.; Hudson, D.; Barany, G.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1549.
26. Alsina, J.; Rabanal, F.; Giralt, E.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 9633.
27. Spatola, A. F.; Darlak, K.; Romanovskis, P. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 591.
28. Romanovskis, P.; Spatola, A. F. *J. Pept. Res.* **1998**, *52*, 356.
29. Grieco, P.; Gitu, P. M.; Hruby, V. J. *J. Pept. Res.* **2001**, *57*, 250.
30. Blackburn, C.; Kates, S. A. In *Solid-phase synthesis of cyclic homodetic peptides*; Academic Press, 1997; Vol. 289. pp 175.
31. Bourne, G.; Golding, S.; Meutermans, W. F.; Smythe, M. *Lett. Pept. Sci.* **2000**, *7*, 311.
32. Alsina, J.; Jensen, K. J.; Albericio, F.; Barany, G. *Chemistry – A European Journal* **1999**, *5*, 2787.
33. Jensen, K. J.; Alsina, J.; Songster, M. F.; Vágner, J.; Albericio, F.; Barany, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5441.
34. Jobin, S.; Mejean, A.; Galindo, S.-M.; Liang, X.; Vezina-Dawod, S.; Biron, E. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 11230.
35. García-Martín, F.; Quintanar-Audelo, M.; García-Ramos, Y.; Cruz, L. J.; Gravel, C.; Furic, R.; Côté, S.; Tulla-Puche, J.; Albericio, F. *J. Comb. Chem.* **2006**, *8*, 213.
36. Gude, M.; Ryf, J.; White, P. D. *Lett. Pept. Sci.* **2002**, *9*, 203.
37. Kovacs, J. In *Racemization and coupling rates of N- $\alpha$ -protected amino acid and peptide active esters: Predictive potential*; Academic Press, New York, 1980; Vol. 2. pp 485.
38. Virta, P.; Karskela, M.; Lönnberg, H. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1989.
39. del Fresno, M.; Alsina, J.; Royo, M.; Barany, G.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 2639.
40. Lian, W.; Jiang, B.; Qian, Z.; Pei, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 9830.
41. Lian, W.; Upadhyaya, P.; Rhodes, C. A.; Liu, Y.; Pei, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 11990.
42. Bartoloni, M.; Jin, X.; Marcaida, M. J.; Banha, J.; Dibonaventura, I.; Bongoni, S.; Bartho, K.; Grabner, O.; Sefkow, M.; Darbre, T.; Reymond, J.-L. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 5473.

## Supporting information

### **Solid-phase synthesis of macrocyclic peptides by backbone anchoring using a traceless Ugi multicomponent approach**

Steve Jobin and Eric Biron\*

*Faculté de pharmacie, Université Laval, Québec (QC), G1V 0A6, Canada*

and

*Laboratoire de chimie médicinale, Centre de recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Québec (CHUL Section), 2705 Boulevard Laurier, Québec, Québec. G1V 4G2, Canada*

\*E-mail : [Eric.Biron@pha.ulaval.ca](mailto:Eric.Biron@pha.ulaval.ca)

# Solid-phase synthesis of peptide macrocycles by backbone anchoring using a traceless Ugi multicomponent approach

Steve Jobin and Eric Biron\*

*Faculté de pharmacie, Université Laval, Québec (QC), G1V 0A6, Canada*  
and

*Laboratoire de chimie médicinale, Centre de recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Québec (CHUL Section), 2705 Boulevard Laurier, Québec, Québec. G1V 4G2, Canada*  
E-mail : [Eric.Biron@pha.ulaval.ca](mailto:Eric.Biron@pha.ulaval.ca)

## Table of contents

<b>Materials and equipment</b>	S105
<b>General procedure for solid phase peptide synthesis</b>	S105
<b>Synthesis of C-terminal fragment</b>	S106
<b>Synthesis of N-terminal fragment</b>	S106
<b>Preparation of backbone anchoring linker (BAL resin)</b>	S107
<b>Reductive amination protocol</b>	S107
<b>Synthesis of phenylisopropyl ester C-terminal protected amino acids (PhiPr)</b>	S108
<b>General procedure for Ugi backbone anchoring and cleavage from the solid support</b>	S109
<b>Allyl ester deprotection on solid support</b>	S111
<b>PhiPr ester deprotection on solid support</b>	S111
<b>On resin peptide cyclization protocol</b>	S111
<b>Figures</b>	S114
<b>Figure S1.</b> HPLC profiles ( $\lambda = 220$ nm) and ESI-HRMS spectras.	S114
<b>Figure S2.</b> NMR $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ spectras.	S129

---

## Materials and equipment

All the chemical reagents and solvents from commercial sources were used without further purification. Coupling reagents and amino acid derivatives were purchased from Matrix Innovation Inc. (Québec, QC, Canada). Aminomethyl ChemMatrix® resin (0.55 mmol/g) and HMBA ChemMatrix® (0.46 mmol/g) were purchased from PCAS Biomatrix (St-Jean-sur-Richelieu, QC, Canada). All other reagents and solvents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Reactions on solid support were performed in filter columns (2 and 10 mL) from Roland Vetter Laborbedarf OHG (Ammerbuch, Germany). RP-HPLC analyses were achieved on a Shimadzu Prominence instrument (Columbian, MD, USA) using a Phenomenex Kinetex column (4.6 mm x 100 mm, 2.6 µm XB-C18, 100 Å, 1.5 mL/min) with a 10.5 min gradient from water (0.1% TFA) and MeCN (0.1% TFA) (MeCN 10-100%) and detection at 220 nm and 254 nm. LC-MS analyses were performed on a Shimadzu Prominence LCMS-2020 equipped with an ESI and APCI ion source. Microwave experiments were conducted on a Biotage Initiator microwave instrument (Charlotte, NC, USA) with 0.2-0.5 and 0.5-2 mL microwave vials. Peptides were synthesized on a Prelude peptide synthesizer from Protein Technologies (Tucson, AZ, USA). High-resolution mass spectrometry was performed on a Waters Synapt G2-Si (Quadrupole/TOF) with a Waters UPLC binary pump and FTN injector. The mass spectrometer was operated in High resolution mode and calibration done with a sodium formate solution and lock-mass correction using a Leucine-enkephaline solution (Waters).

## General procedure for solid phase peptide synthesis

Peptides were synthesized by standard Fmoc solid phase synthesis. Briefly, amino acid couplings were performed with a solution of Fmoc-Xaa-OH (3 equiv), HATU (3 equiv) and NMM (6 equiv) in DMF for 20 min. The coupling step was repeated once and the resin washed with DMF (5 × 30 s). The Fmoc protecting group was removed by treating the resin twice with a solution of 20% piperidine in DMF (v/v) for 8 min followed by washing with DMF (5 × 30 s).

## Synthesis of C-terminal fragment

Synthesis of C-terminal peptide fragments bearing a free amine was carried out on hydroxymethylbenzoic acid (HMBA) resin. The first amino acid (3 equiv) was attached to the resin in presence of diisopropylcarbodiimide (DIC) (3 equiv) in DMF for 30 min. Then, the peptide was assembled by standard Fmoc solid-phase synthesis and the resin washed thoroughly with DMF (5×) and DCM (5×). The fully protected peptide was released from the resin with a solution of propylamine (1M) for 1h. The resin was filtered and the solvent removed under reduced pressure. The resulting mixture was analyzed by HPLC and ESI-MS. The peptides were used without further purification in Ugi-4CR ligation.

H-Gly-Phe-Gly-Lys(Boc)-Leu-Gly-CONPr : 99 % purity; RP-HPLC  $t_R$  = 7.93 min; ESI-MS  $m/z$ : 619.45 [M-H]<sup>-</sup>; calcd for C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>N<sub>8</sub>O<sub>6</sub>: 619.39.

## Synthesis of N-terminal fragment

Synthesis of N-terminal peptide fragments bearing a free carboxylic acid was carried out on 2-chlorotriyl chloride (CTC) resin. The first amino acid (3 equiv) was attached to the resin in presence of diisopropylethylamine (DIPEA) (7 equiv) DCM for 3h. After filtration the remaining trityl chloride groups were capped by a solution of DCM, MeOH, DIPEA (17:2:1; v:v:v) for 15 min. Then, the peptide was assembled by standard Fmoc solid-phase synthesis and the resin washed thoroughly with DMF (5×) and DCM (5×). The fully protected peptide was released from the resin with a solution of 20% HFIP in DCM (v/v) for 30 min. The resin was filtered and the solvent removed under reduced pressure and the resulting mixture precipitated with cold diethyl ether. The solid was washed twice with diethyl ether and dried under vacuum to be analyzed by HPLC and ESI-MS. The peptides were used without further purification in Ugi-4CR ligation.

Fmoc-Gly-Phe-Gly-Tyr(tBu)-Leu-Gly-OH : 99 % purity; RP-HPLC  $t_R$  = 11.12 min; ESI-MS  $m/z$ : 889.55 [M-H]<sup>-</sup>; calcd for C<sub>49</sub>H<sub>57</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub>: 889.41.

Fmoc-Gly-Phe-Gly-Tyr(tBu)-Leu-Phe-OH : 92 % crude purity; RP-HPLC  $t_R$  = 11.65 min; ESI-MS  $m/z$ : 979.45 [M-H]<sup>-</sup>; calcd for C<sub>56</sub>H<sub>63</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub>: 979.46.



### Preparation of backbone anchoring linker (BAL resin)

Aminomethyl ChemMatrix® was swollen in DMF before the addition of Fmoc-Ile-OH (3 equiv), HATU (3 equiv) and NMM (6 equiv) and stirred for 2x30 min. The resin was then washed with DMF (5x) and DCM (5x) before being dried under reduced pressure. Once the resin was dry, Fmoc dosage according to the method of Gude *et Al.* was performed and loading was estimated to 0.297 mmol/g. The resin was then treated with a 20% piperidine in DMF solution, washed with DMF and stirred with 4-(4-formyl-3,5-dimethoxyphenoxy)butanoic acid (3 equiv), HATU (3 equiv), DIPEA (6 equiv), in DMF for 3h. The resin was once again washed with DMF and DCM before being dried in vacuo. The resin BAL is then ready to use.

### Reductive amination protocol

BAL resin was swelled in DMF for 10 minutes and a solution of NaBH<sub>3</sub>CN (10 equiv.) and glycine *tert*-butyl ester hydrochloride (10 equiv) was added to the resin and stirred at room temperature for 3h. The resin was washed with DMF (5x) and the subsequent acylation was performed using Fmoc-Xaa-OH (3 equiv), HATU (3 equiv) and NMM (6 equiv) for 3h. The resin was then washed with DMF (5x) and DCM (5x) and dried under reduced pressure. Classic Fmoc SPPS was then performed with the backbone anchored peptide. Following removal of the Fmoc group on the last amino acid, the peptide was cleaved from the resin with a solution of TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS (95:2.5:2.5) for 30 min at room temperature. After filtration and washing with TFA, the filtrate was evaporated under reduced pressure and the resulting mixture precipitated with cold diethyl ether. The solid was washed twice with diethyl ether and dried under vacuum to be analyzed by HPLC and ESI-HRMS.

*H-Gly-Tyr-Lys-Leu-Gly-Gly-OH (1)* (White powder, 3.2 mg, 53% isolated yield): 85% crude purity; RP-HPLC  $t_R$  = 5.49 min; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ . 594.3260 [M+H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>N<sub>7</sub>O<sub>8</sub> 594.3246.

## Synthesis of phenylisopropyl ester C-terminal protected amino acids (PhiPr)

1. Sodium hydride 60% in mineral oil (80 mg, 1.5 mmol) was first dissolved in diethyl ether (2 mL) and a solution of 2-phenyl-2-propanol in diethyl ether (2.0 g, 14.8 mmol in 2 mL) was slowly added dropwise. The mixture was allowed to react at room temperature for 20 minutes before being cold in an ice bath. Trichloroacetonitrile (1.65 mL, 16.3 mmol) was added over 15 minutes and the reaction mixture allowed returning at room temperature for 1h. Diethyl ether was then removed under vacuum. Pentane was added to form a brown precipitate that was removed from the product by filtration. Pentane was evaporated under reduced pressure and the product was analyzed and used without further purification.

2-phenylpropan-2-yl 2,2,2-trichloroacetimidate, pale yellow oil, (3.14 g, 11.2 mmol, 78%);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.20 (broad, s, 1H), 7.47 – 7.42 (m, 2H), 7.38 – 7.34 (m, 2H), 7.30 – 7.27 (m, 1H), 1.89 (s, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  159.36 (Cq), 145.01 (Cq), 129.37 (CH), 128.24 (CH), 127.14 (CH), 125.45 (CH), 124.27 (CH), 112.38 (Cq), 84.99 (Cq), 28.08 ( $\text{CH}_3$ ).

2. Fmoc-Gly-OH (670 mg, 2.30 mmol) was dissolved in DCM and another solution of DCM containing trichloroacetimidate (1.47 g, 4.6 mmol) added dropwise. The reaction was stirred at room temperature overnight and DCM removed under reduced pressure. Crude product was purified by flash chromatography with a gradient from 100% hexanes to 90:10 and then 80:20 hexanes : ethyl acetate.

2-phenylpropan-2-yl(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl) glycinate, white oil, (933 mg, 2.25 mmol, 98%);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.75 (d,  $J = 4.7$  Hz, 2H), 7.57 (d,  $J = 4.7$  Hz, 2H), 7.41 – 7.27 (m, 9H), 5.24 (broad, t,  $J = 3.0$  Hz, 1H), 4.37 (d,  $J = 4.7$  Hz, 2H), 4.20 (t,  $J = 4.4$  Hz, 1H), 4.00 (d,  $J = 3.4$  Hz, 2H), 3.49 (s, 1H), 1.81 (s, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  168.70 (Cq), 156.17 (Cq), 144.92 (Cq), 143.73 (Cq), 141.20 (Cq), 128.35 (CH), 127.63 (CH), 127.29 (CH), 127.00 (CH), 125.04 (CH), 124.21 (CH), 119.90 (CH), 83.36 (Cq), 67.09 ( $\text{CH}_2$ ), 47.01 (CH), 43.35 ( $\text{CH}_2$ ), 28.47 ( $\text{CH}_3$ ).

3. Fmoc-Gly-O $\phi$ Pr (933 mg, 2.25 mmol) was dissolved in DCM (10 mL). Excess of diethylamine (10 mL) was added to the mixture and allowed to react at room temperature for 1h. Solvent was removed under vacuum and product purified by flash chromatography with a gradient from 100% DCM to 99:1 (DCM:TEA) to 97:2:1 (DCM:MeOH:TEA).

2-phenylpropan-2-yl glycinate, yellow oil (384 mg, 1.99 mmol, 88%);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.37 – 7.32 (m, 4H), 7.28-7.23 (m, 1H), 3.41 (s, 2H), 1.79 (s, 6H), 1.40 (broad s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.82 (Cq), 145.31 (Cq), 128.16 (CH), 126.97 (CH), 124.07 (CH), 81.97 (Cq), 44.50 ( $\text{CH}_2$ ), 28.44 ( $\text{CH}_3$ ).

#### **General procedure for Ugi backbone anchoring and cleavage from the solid support**

The supported aldehyde (BAL resin) was first swelled in a minimum of MeCN/MeOH (1:1) ( $\approx 15 \mu\text{L}/\text{mg}$  of resin) in a microwave vial with the previously isolated amine (2.5 equiv). After stirring for 15 min, the carboxylic acid (5 equiv) was added and the mixture stirred for 5 min. Finally, *tert*-butyl isocyanide (10 equiv) was added, the microwave vial sealed and the reaction mixture heated for 30 min at  $60^\circ\text{C}$  under microwave irradiations. The resin was filtered and washed with MeCN/MeOH (1:1) (3x), DMF (3x) and DCM (3x). Classic Fmoc SPPS was then performed with the backbone anchored dipeptide. Following removal of the Fmoc group on the last amino acid, the peptide was cleaved from the resin with a solution of TFA/ $\text{H}_2\text{O}$ /TIPS (95:2.5:2.5) for 45 min under microwave irradiations at  $60^\circ\text{C}$ . After filtration and washing with TFA, the filtrate was evaporated under reduced pressure and the resulting mixture precipitated with cold diethyl ether. The solid was washed twice with diethyl ether and dried under vacuum to be analyzed by HPLC, purified by preparative HPLC and analyzed by HPLC and ESI-HRMS.

*H*-Gly-Tyr-Lys-Leu-Gly-Gly-OH (**1**) (White powder, 5.0 mg, 72% isolated yield): 92% crude purity; RP-HPLC  $t_R = 5.54$  min; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ : 594.3228 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ ; calcd for  $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{N}_7\text{O}_8$  594.3246.

*H-Gly-Tyr-Lys-Leu-Ala-Gly-OH (2)* (White powder, 2.4 mg, 36% isolated yield): 92% crude purity; RP-HPLC  $t_R = 5.65$  min; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ : 608.3382 [M+H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>28</sub>H<sub>46</sub>N<sub>7</sub>O<sub>8</sub> 608.3402.

*H-Gly-Tyr-Lys-Leu-Phe-Gly-OH (3)* (White powder, 3.6 mg, 51% isolated yield): 93% crude purity; RP-HPLC  $t_R = 6.78$  min; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ : 684.3702 [M+H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>34</sub>H<sub>50</sub>N<sub>7</sub>O<sub>8</sub> 684.3715.

*H-Gly-Phe-Gly-Tyr-Leu-Gly-Gly-OH (4)* (White powder, 4.3 mg, 60% isolated yield): 95% crude purity; RP-HPLC  $t_R = 6.82$  min; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ : 670.3240 [M+H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>32</sub>H<sub>44</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub> 670.3195.

*H-Gly-Phe-Gly-Tyr-Leu-Phe-Gly-OH (5)* (White powder, 4.9 mg, 58% isolated yield): 82% crude purity; RP-HPLC  $t_R = 7.60$  min; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ : 760.3700 [M+H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>39</sub>H<sub>50</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub> 760.3665.

*H-Gly-Phe-Gly-Tyr-Leu-Gly-Gly-Phe-Gly-Lys-Leu-Gly-OH (6)* (White powder, 0.5 mg, 5% isolated yield): 72% crude purity; RP-HPLC  $t_R = 7.53$  min; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ : 1213.6790 [M+H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>60</sub>H<sub>89</sub>N<sub>14</sub>O<sub>13</sub> 1213.6728.

*H-Gly-Tyr-Lys-Leu-Gly-Gly-OH (7a)* (White powder, 4.3 mg, 66% isolated yield): 92% crude purity; RP-HPLC  $t_R = 5.49$  min; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ : 594.3260 [M+H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>N<sub>7</sub>O<sub>8</sub> 594.3246.

*H-Gly-Phe-Gly-Tyr-Leu-Gly-Gly-OH (8a)* (White powder, 3.4 mg, 48% isolated yield): 95% crude purity; RP-HPLC  $t_R = 6.86$  min; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ : 670.3198 [M+H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>32</sub>H<sub>44</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub> 670.3195.

*H-Gly-Leu-Lys\*-Pro-Tyr-Lys-Glu\*-Gly-Gly-OH (9a)* (White powder, 4.0 mg, 53% isolated yield): 76% crude purity; RP-HPLC  $t_R = 7.05$  min; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ : 1072.5720 [M+H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>50</sub>H<sub>78</sub>N<sub>11</sub>O<sub>15</sub> 1072.5673.

*H-Gly-Leu-Ala-Lys\*-Tyr-Pro-Ala-Lys-Gly-Glu\*-Gly-Gly-OH (10a)* (White powder, 4.2 mg, 51% isolated yield): 73% crude purity; RP-HPLC  $t_R = 6.96$  min; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ : 1271.6691 [M+H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>58</sub>H<sub>91</sub>N<sub>14</sub>O<sub>18</sub> 1271.6630.

*H-Gly-Leu-Lys<sup>\*</sup>-Pro-Tyr-Gly-Lys-Gly-Glu<sup>\*</sup>-Gly-OH (11a)* (White powder, 5.5 mg, 85% isolated yield): 77% crude purity; RP-HPLC  $t_R = 7.10$  min; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ : 1086.5856 [M+H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>51</sub>H<sub>80</sub>N<sub>11</sub>O<sub>15</sub> 1086.5830.

*H-Gly-Ala-Lys<sup>\*</sup>-Tyr-Leu-Lys-Gly-Glu<sup>\*</sup>-Gly-Gly-OH (12a)* (White powder, 3.1 mg, 41% isolated yield): 79% crude purity; RP-HPLC  $t_R = 7.02$  min; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ : 1046.5510 [M+H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>48</sub>H<sub>76</sub>N<sub>11</sub>O<sub>15</sub> 1046.5517.

*H-Lys<sup>\*</sup>-Gly-Ala-Tyr-Leu-Lys-Gly-Glu<sup>\*</sup>-Gly-Gly-OH (13a)* (White powder, 3.1 mg, 40% isolated yield): 79% crude purity; RP-HPLC  $t_R = 6.72$  min; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ : 1101.5592 [M+H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>50</sub>H<sub>77</sub>N<sub>12</sub>O<sub>16</sub> 1101.5575.

### **Allyl ester deprotection on solid support**

The resin was swollen in DCM for 15 min before the introduction of a mixture of Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.5 equiv) and phenylsilane (15 equiv) in DCM and stirred for 40 minutes. The step was repeated once and the resin washed with DCM (3 × 30 s), with a solution of 0.5% DIPEA in DMF (3 × 30 s), with a solution of 0.5% sodium diethyldithiocarbamate trihydrate in DMF (3 × 30s) and another time with DCM (3 × 30 s).

### **PhiPr ester deprotection on solid support**

The resin was swollen in DCM for 15 min before the introduction of a mixture of 1% TFA in DCM and stirred for 5 min. The step was repeated once and the resin washed with DCM (3 × 30 s) and DMF (3 × 30 s).

### **On resin peptide cyclization protocol**

The resin bearing the free carboxylic acid and the free amine was swollen in DMF for 15 min. Then a solution of PyAOP (5 equiv), HOAt (5 equiv), and DIPEA (10 equiv) in DMF was added to the resin and the resulting mixture was stirred for 3 h. Finally, the resin was washed with DMF (5 × 30 s), DCM (5 × 30 s) and dried under vacuum. The peptide was then cleaved from the resin as described above, with a

solution of TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS (95:2.5:2.5) for 45 min under microwave irradiations at 60°C. After filtration and washing with TFA, the filtrate was evaporated under reduced pressure and the resulting mixture precipitated with cold diethyl ether. The solid was washed twice with diethyl ether and dried under vacuum to be analyzed by HPLC, purified by preparative HPLC and analyzed by HPLC and ESI-HRMS.

*Cyclo [Gly-Tyr-Lys-Leu-Gly-Gly] (7b)* (White powder, 2.5 mg, 36% isolated yield): 66% crude purity; RP-HPLC  $t_R$  = 6.01 min; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ : 576.3144 [M+H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>27</sub>H<sub>42</sub>N<sub>7</sub>O<sub>7</sub> 576.3140.

*Cyclo [Gly-Phe-Gly-Tyr-Leu-Gly-Gly] (8b)* (White powder, 1.9 mg, 29% isolated yield): 71% crude purity; RP-HPLC  $t_R$  = 6.86 min; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ : 652.3072 [M+H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>32</sub>H<sub>42</sub>N<sub>7</sub>O<sub>8</sub> 652.3089.

*Cyclo [Gly-Leu-Lys\*-Pro-Tyr-Lys-Glu\*-Gly-Gly] (9b)* (White powder, 2.3 mg, 31% isolated yield): 74% crude purity; RP-HPLC  $t_R$  = 7.64 min; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ : 1054.5603 [M+H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>50</sub>H<sub>76</sub>N<sub>11</sub>O<sub>14</sub> 1054.5568.

*Cyclo [Gly-Leu-Ala-Lys\*-Tyr-Pro-Ala-Lys-Gly-Glu\*-Gly-Gly] (10b)* (White powder, 2.0 mg, 25% isolated yield): 57% crude purity; RP-HPLC  $t_R$  = 7.45 min; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ : 1253.6576 [M+H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>58</sub>H<sub>89</sub>N<sub>14</sub>O<sub>17</sub> 1253.6525.

*Cyclo [Gly-Leu-Lys\*-Pro-Tyr-Gly-Lys-Gly-Glu\*-Gly] (11b)* (White powder, 3.0 mg, 42% isolated yield): 79% crude purity; RP-HPLC  $t_R$  = 7.73 min; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ : 1068.5767 [M+H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>51</sub>H<sub>78</sub>N<sub>11</sub>O<sub>14</sub> 1068.5724.

*Cyclo [Gly-Ala-Lys\*-Tyr-Leu-Lys-Gly-Glu\*-Gly-Gly] (12b)* (White powder, 1.6 mg, 21% isolated yield): 70% crude purity; RP-HPLC  $t_R$  = 7.49 min; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ : 1028.5421 [M+H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>48</sub>H<sub>74</sub>N<sub>11</sub>O<sub>14</sub> 1028.5411.

*Cyclo [Lys\*-Gly-Ala-Tyr-Leu-Lys-Gly-Glu\*-Gly-Gly] (13b)* (White powder, 2.3 mg, 32% isolated yield): 66% crude purity; RP-HPLC  $t_R$  = 7.16 min; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  1083.5485 [M+H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>50</sub>H<sub>75</sub>N<sub>12</sub>O<sub>15</sub> 1083.5469.

*Cyclo [Gly-Leu- Cyclo [Lys-Pro-Tyr-Lys-Glu] -Gly-Gly] (9c)* (White powder, 1.5 mg, 31% isolated yield): 74% crude purity; RP-HPLC  $t_R$  = 6.50 min; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ : 912.4963 [M+H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>43</sub>H<sub>66</sub>N<sub>11</sub>O<sub>11</sub> 912.4938.

*Cyclo [Gly-Leu-Ala- Cyclo [Lys-Tyr-Pro-Ala-Lys-Gly-Glu] -Gly-Gly] (10c)* (White powder, 1.8 mg, 22% isolated yield): 82% crude purity; RP-HPLC  $t_R$  = 6.45 min; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ : 1111.5909 [M+H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>51</sub>H<sub>79</sub>N<sub>14</sub>O<sub>14</sub> 1111.5895.

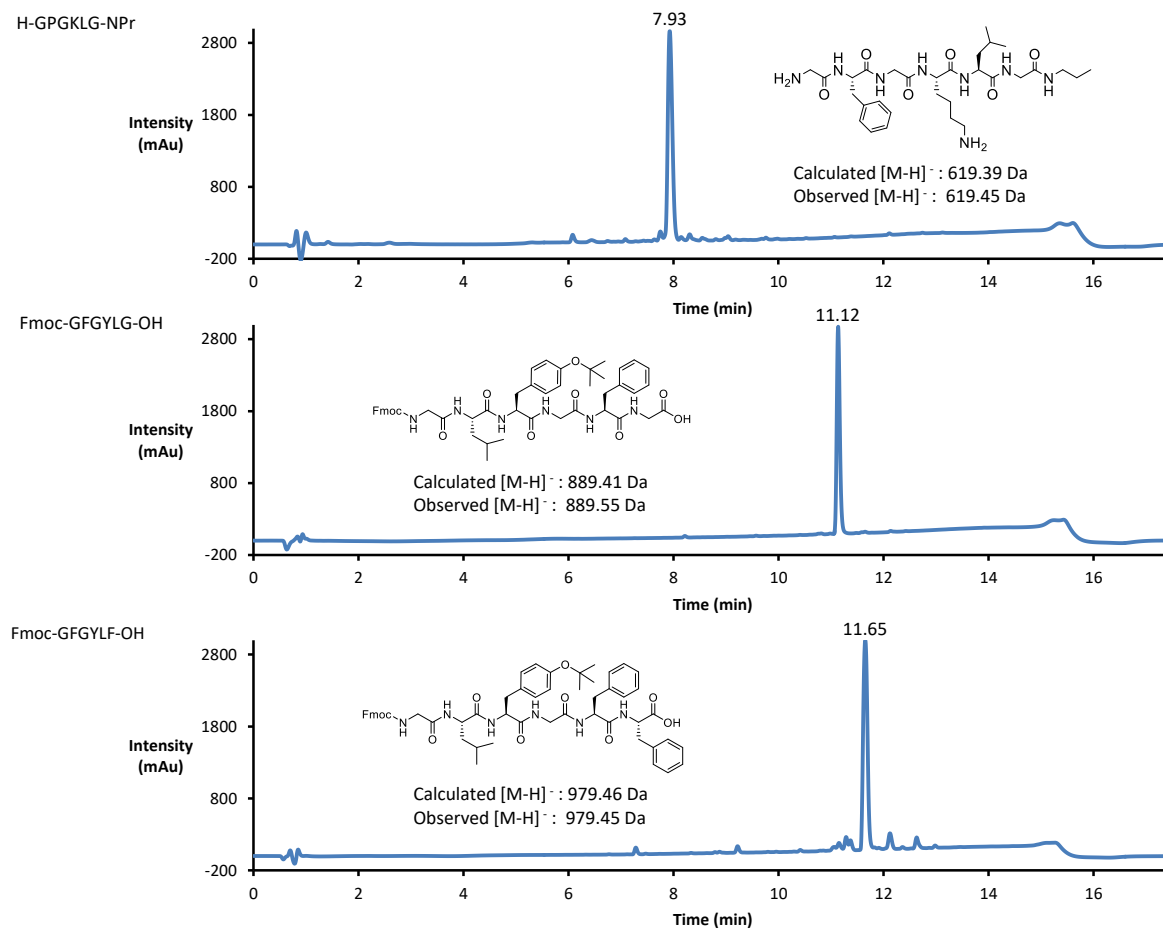
*Cyclo [Gly-Leu- Cyclo [Lys-Pro-Tyr-Gly-Lys-Gly-Glu] -Gly] (11c)* (White powder, 1.6 mg, 24% isolated yield): 75% crude purity; RP-HPLC  $t_R$  = 6.73 min; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ : 926.5120 [M+H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>44</sub>H<sub>68</sub>N<sub>11</sub>O<sub>11</sub> 926.5094.

*Cyclo [Gly-Ala- Cyclo [Lys-Tyr-Leu-Lys-Gly-Glu] -Gly-Gly] (12c)* (White powder, 0.8 mg, 11% isolated yield): 55% crude purity; RP-HPLC  $t_R$  = 6.41 min; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ : 886.4810 [M+H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>41</sub>H<sub>64</sub>N<sub>11</sub>O<sub>11</sub> 886.4781.

*Cyclo [ Cyclo [Lys-Gly-Ala-Tyr-Leu-Lys-Gly-Glu] -Gly-Gly] (13c)* (White powder, 1.0 mg, 12% isolated yield): 97% crude purity; RP-HPLC  $t_R$  = 5.83 and 6.25 min; HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ : 941.4851 [M+H]<sup>+</sup>; calcd for C<sub>43</sub>H<sub>65</sub>N<sub>12</sub>O<sub>12</sub> 941.4839.

## Figures

Figure S1. HPLC profiles ( $\lambda = 220$  nm) and ESI-HRMS spectras.

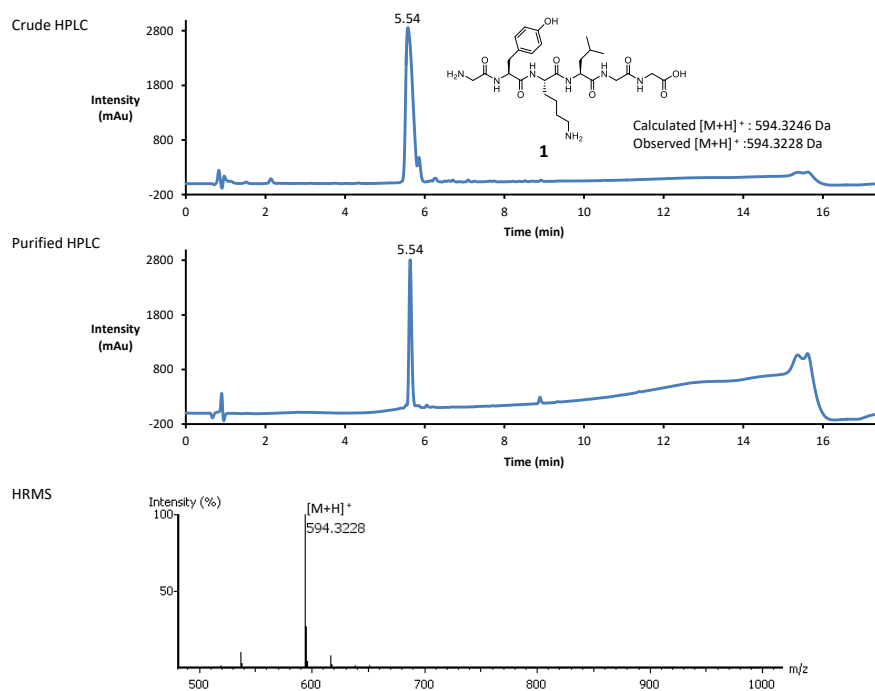




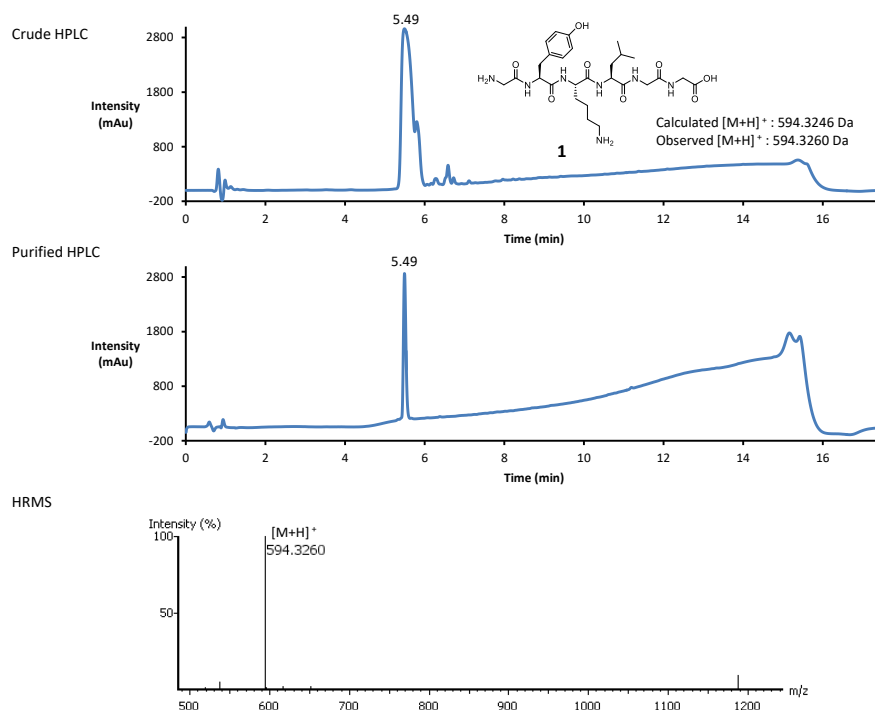
## Figure S1. (Continued)

### *H-Gly-Tyr-Lys-Leu-Gly-Gly-OH* (**1**)

#### Ugi procedure

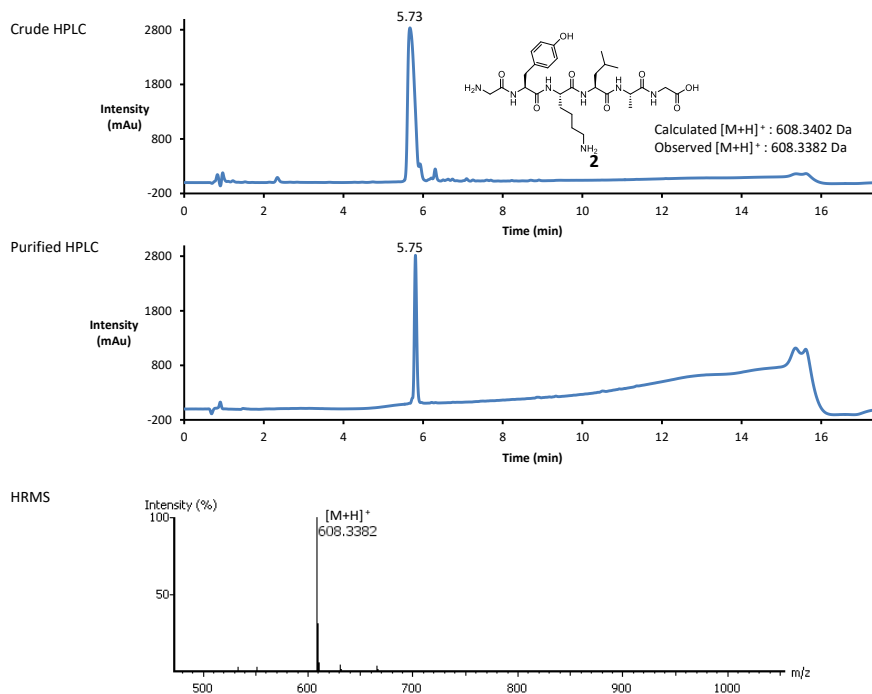


#### Reductive amination procedure

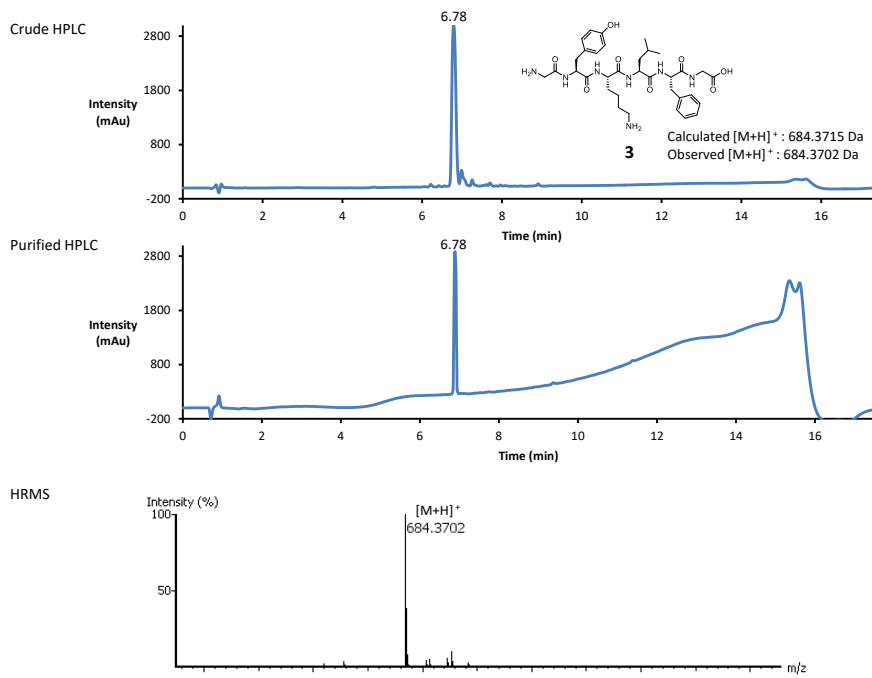


## Figure S1. (Continued)

### *H-Gly-Tyr-Lys-Leu-Ala-Gly-OH (2)*

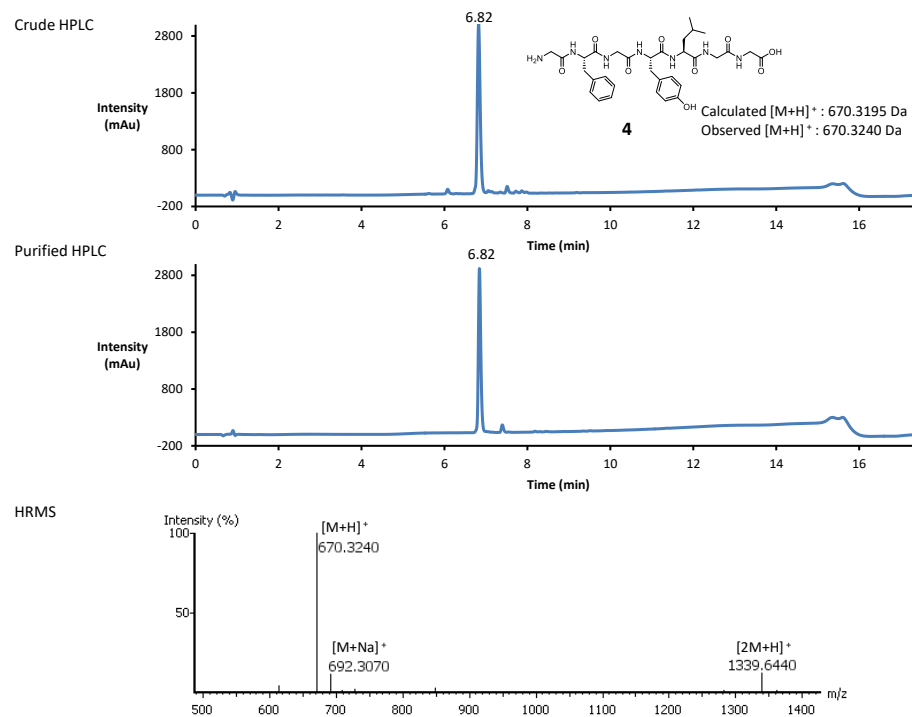


### *H-Gly-Tyr-Lys-Leu-Phe-Gly-OH (3)*

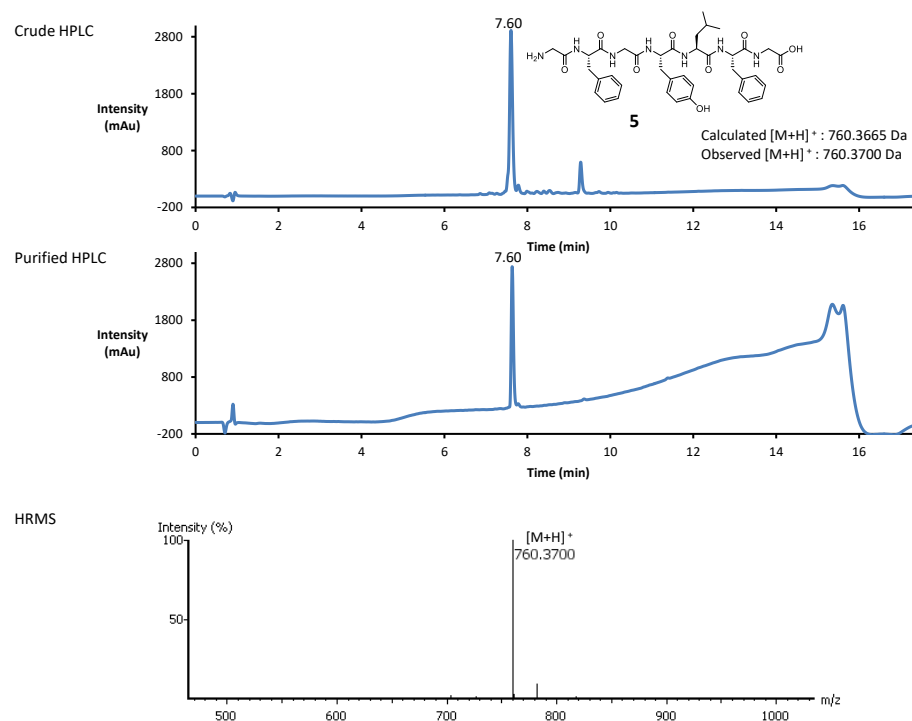


**Figure S1. (Continued)**

*H-Gly-Phe-Gly-Tyr-Leu-Gly-OH (4)*

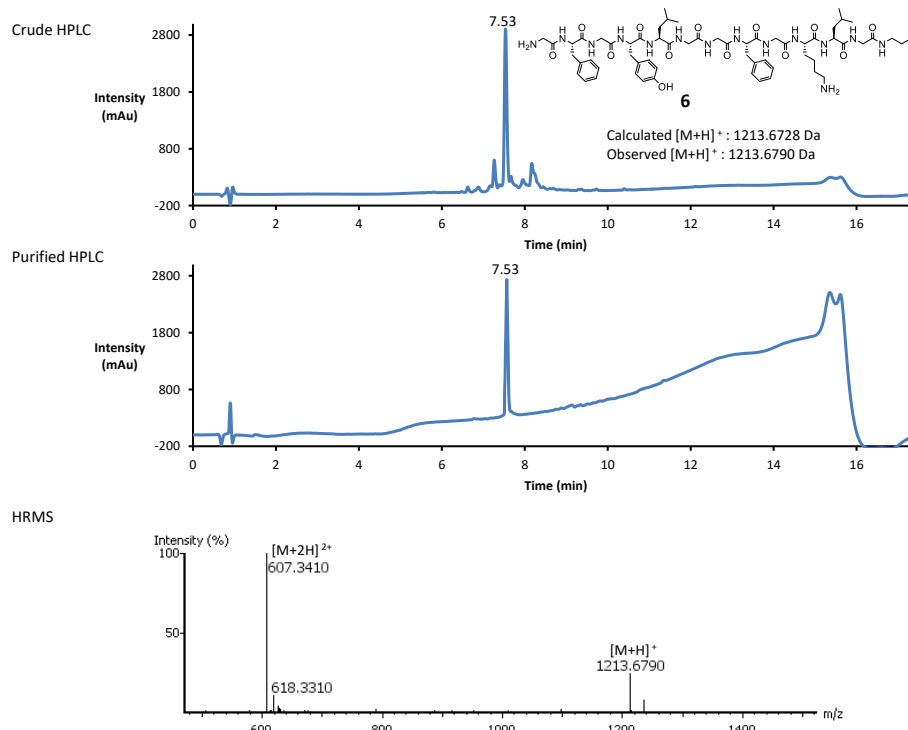


*H-Gly-Phe-Gly-Tyr-Leu-Phe-Gly-OH (5)*

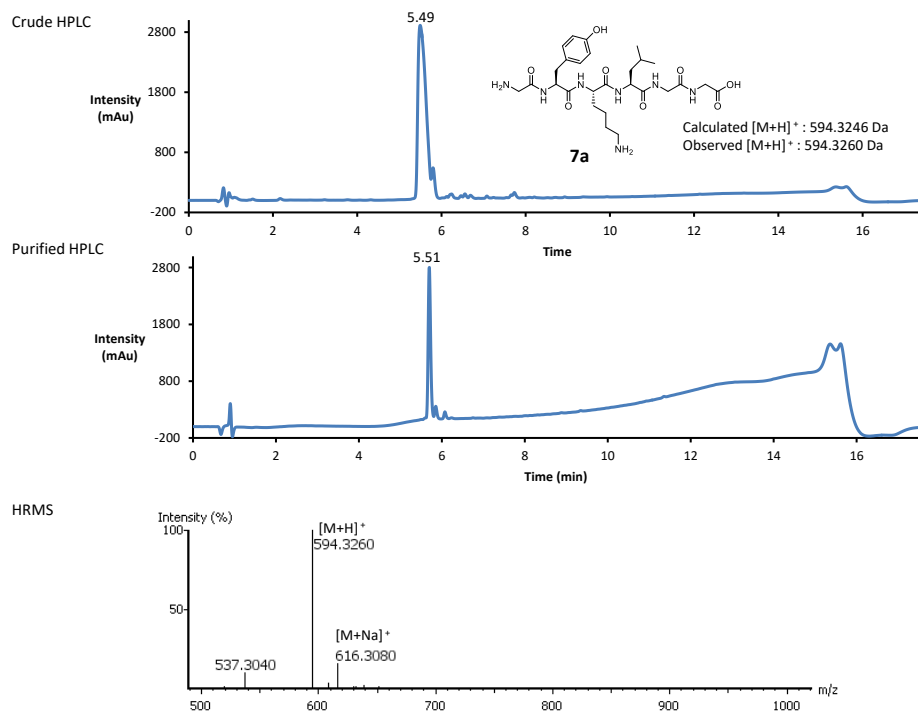


### Figure S1. (Continued)

#### *H-Gly-Phe-Gly-Tyr-Leu-Gly-Gly-Phe-Gly-Lys-Leu-Gly-OH (6)*

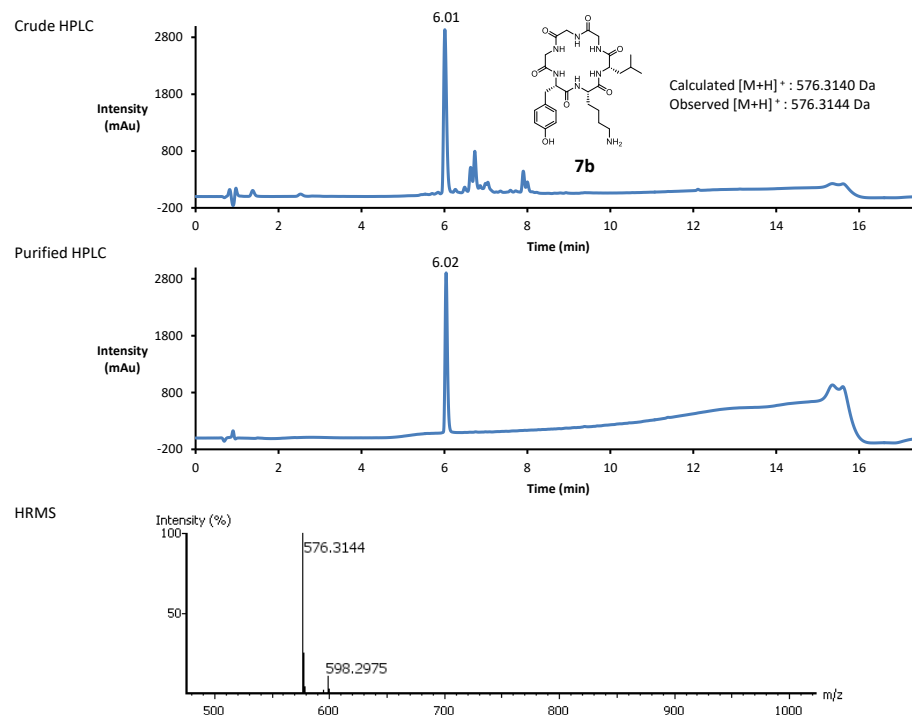


#### *H-Gly-Tyr-Lys-Leu-Gly-Gly-OH (7a)*

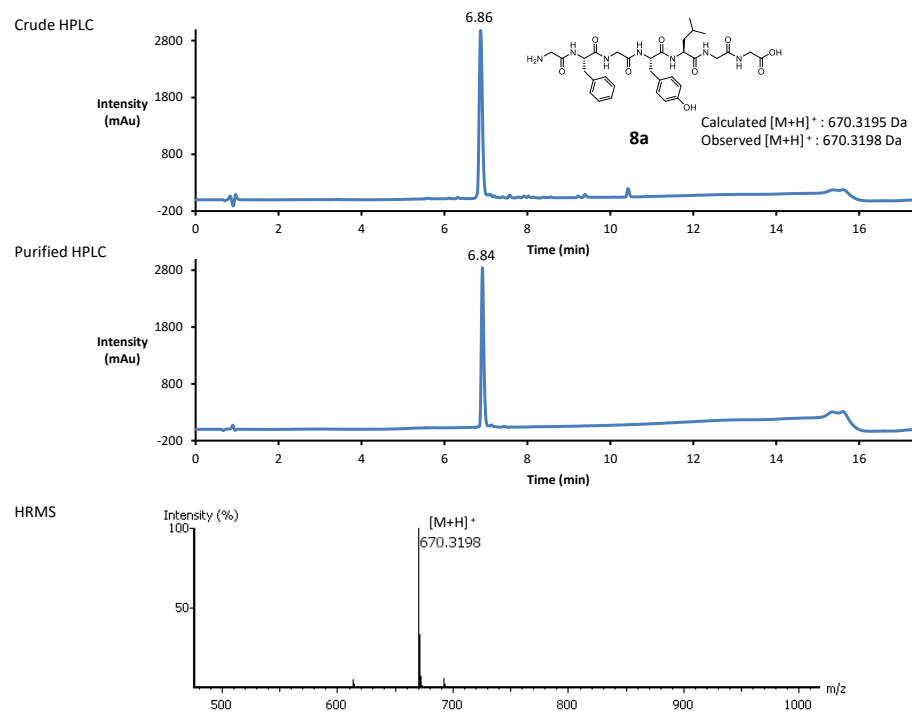


**Figure S1. (Continued)**

*Cyclo [Gly-Tyr-Lys-Leu-Gly-Gly]* (**7b**)

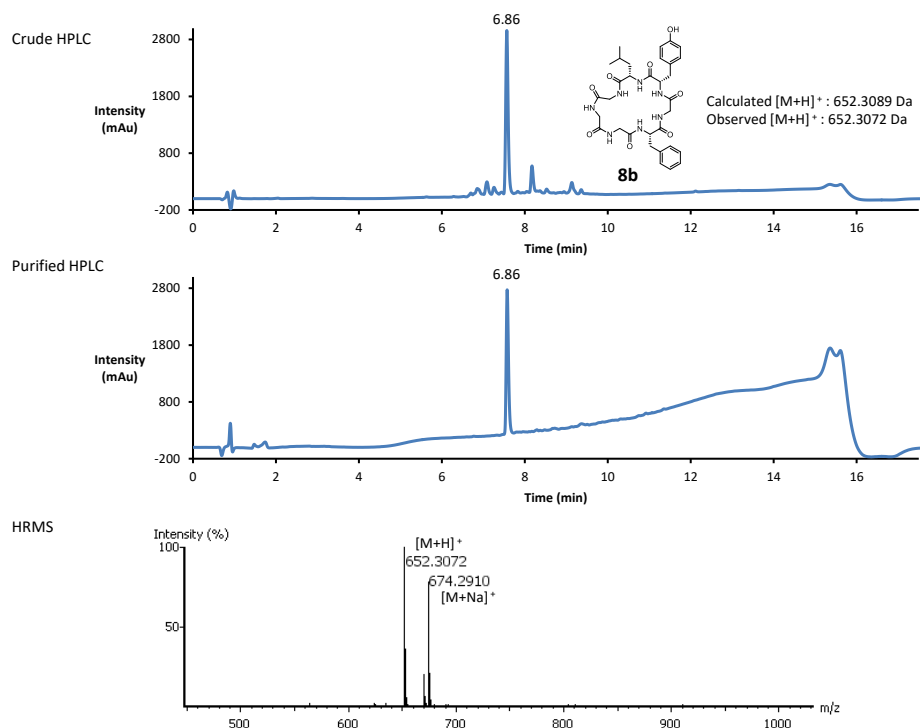


*H-Gly-Phe-Gly-Tyr-Leu-Gly-Gly-OH* (**8a**)

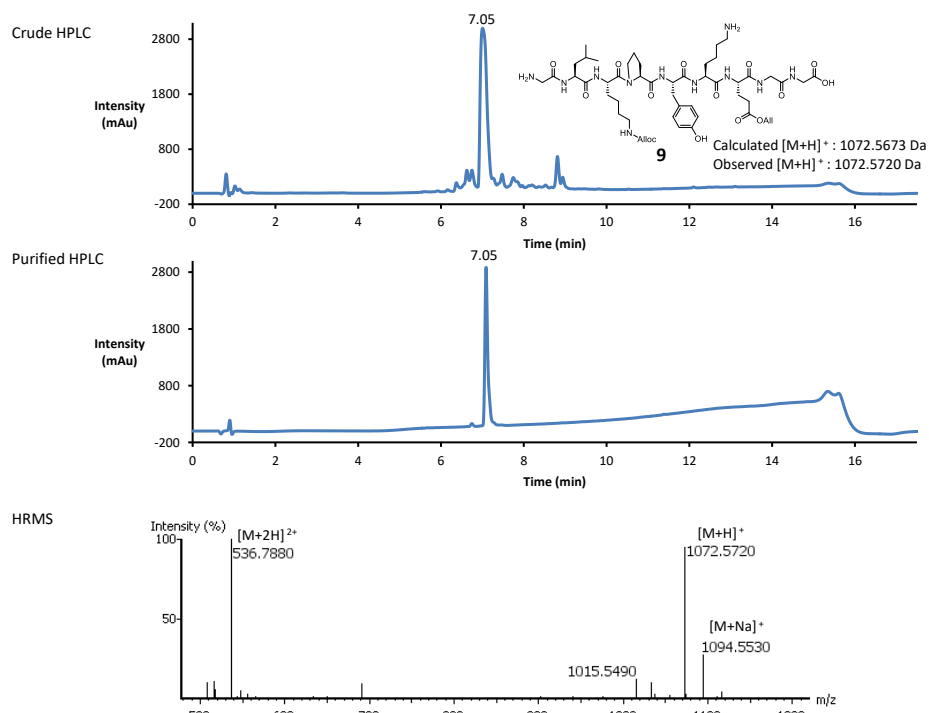


### Figure S1. (Continued)

#### *Cyclo [Gly-Phe-Gly-Tyr-Leu-Gly-Gly] (8b)*

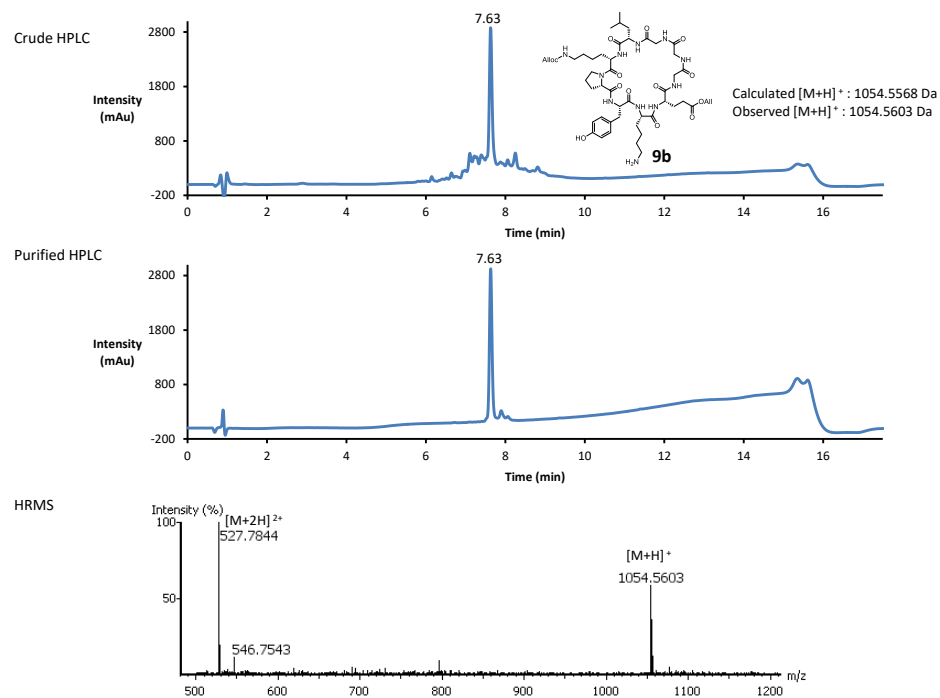


#### *H-Gly-Leu-Lys\*-Pro-Tyr-Lys-Glu\*-Gly-Gly-OH (9a)*

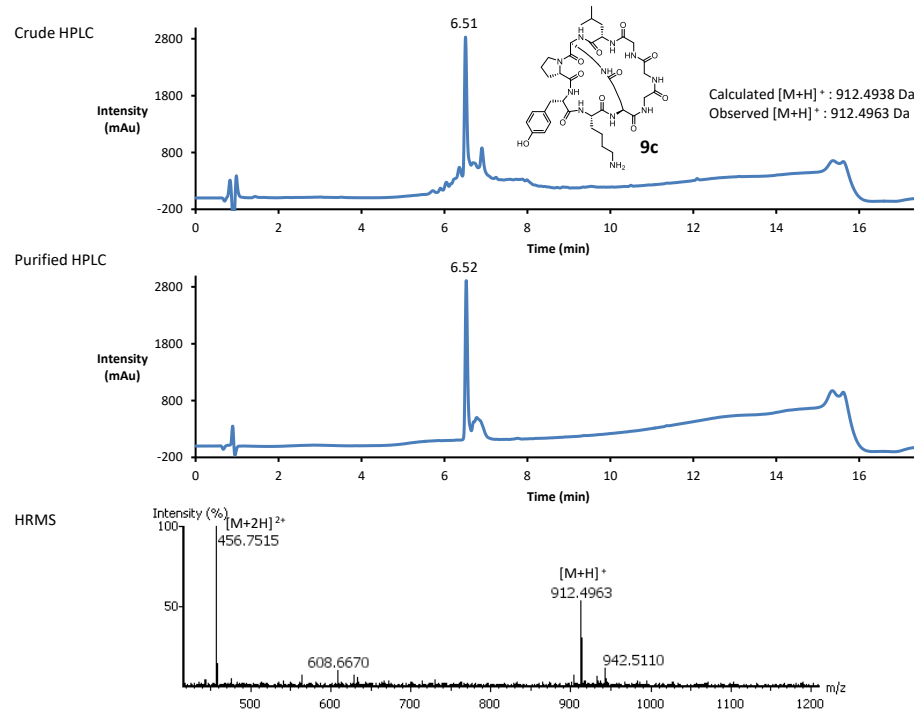


**Figure S1. (Continued)**

*Cyclo [Gly-Leu-Lys\*-Pro-Tyr-Lys-Glu\*-Gly-Gly] (9b)*

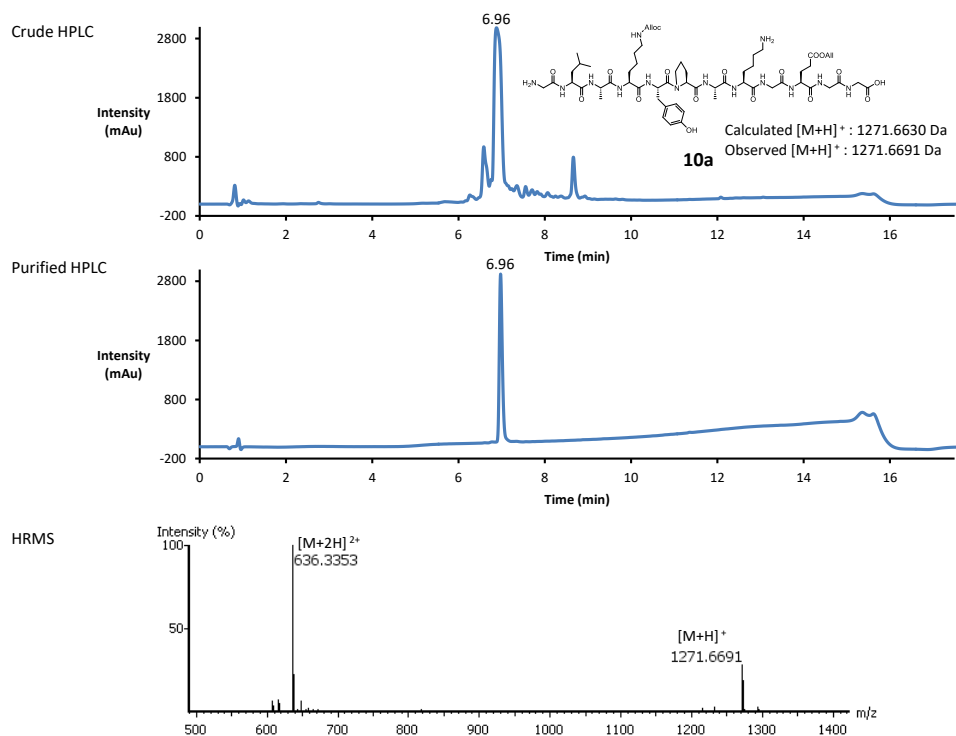


*Cyclo [Gly-Leu- Cyclo [Lys-Pro-Tyr-Lys-Glu] -Gly-Gly] (9c)*

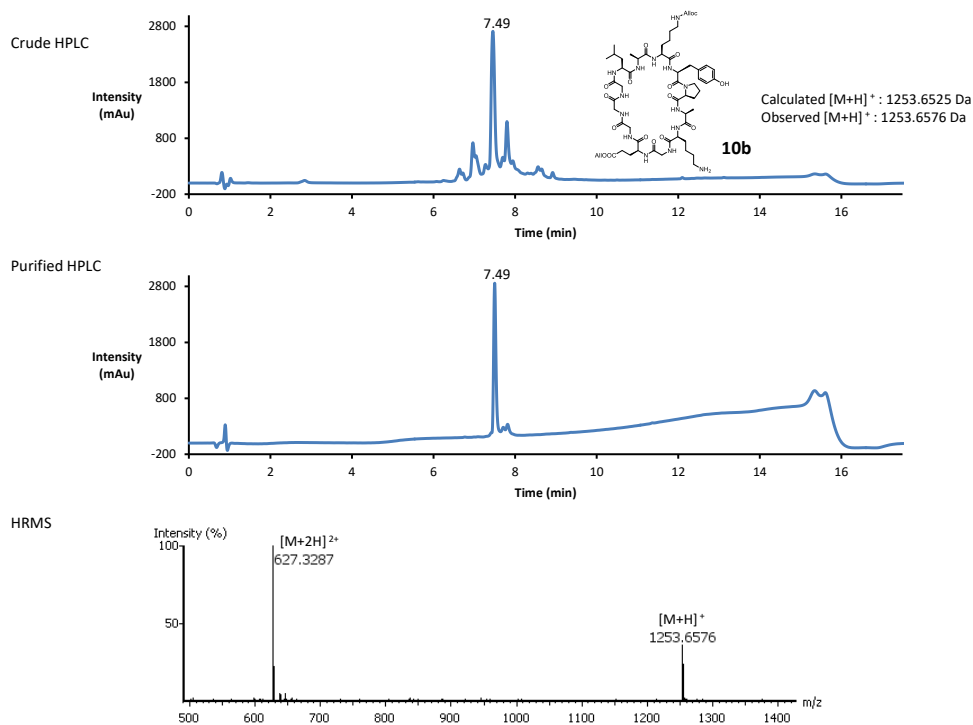


**Figure S1. (Continued)**

*H-Gly-Leu-Ala-Lys\*-Tyr-Pro-Ala-Lys-Gly-Glu\*-Gly-Gly-OH (10a)*



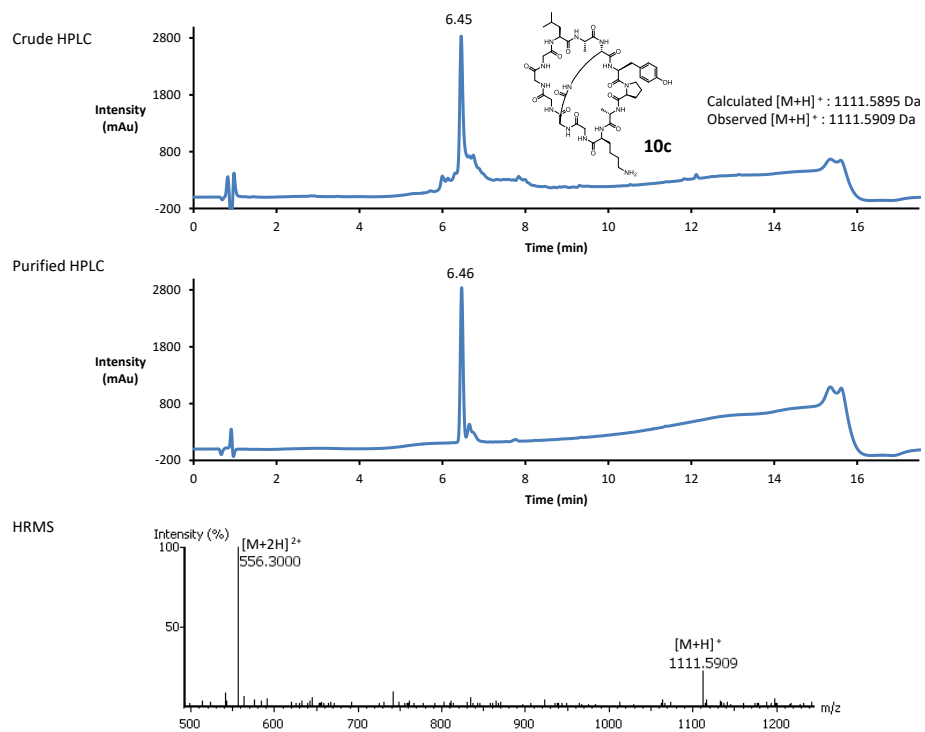
*Cyclo [Gly-Leu-Ala-Lys\*-Tyr-Pro-Ala-Lys-Gly-Glu\*-Gly-Gly] (10b)*



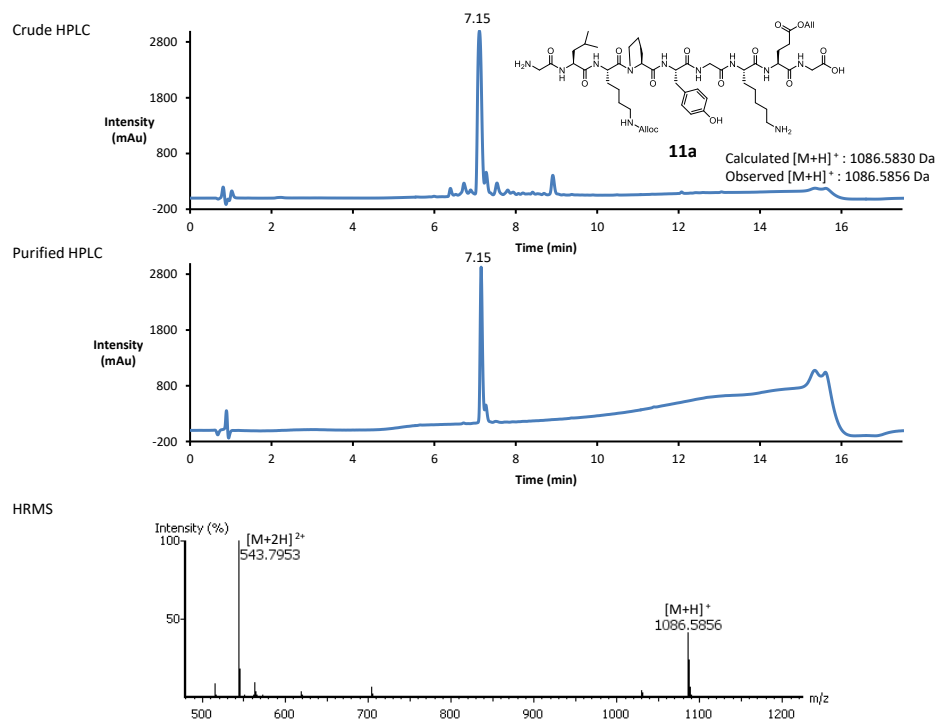


**Figure S1. (Continued)**

*Cyclo [Gly-Leu-Ala- Cyclo [Lys-Tyr-Pro-Ala-Lys-Gly-Glu] -Gly-Gly* (**10c**)

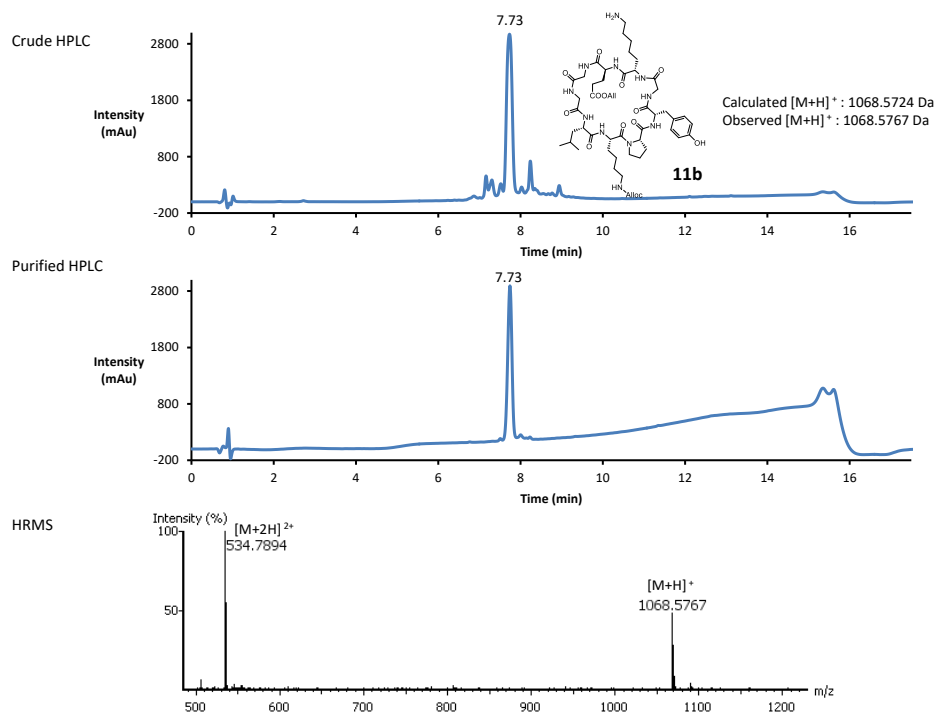


*H-Gly-Leu-Lys\*-Pro-Tyr-Gly-Lys-Gly-Glu\*-Gly-OH* (**11a**)

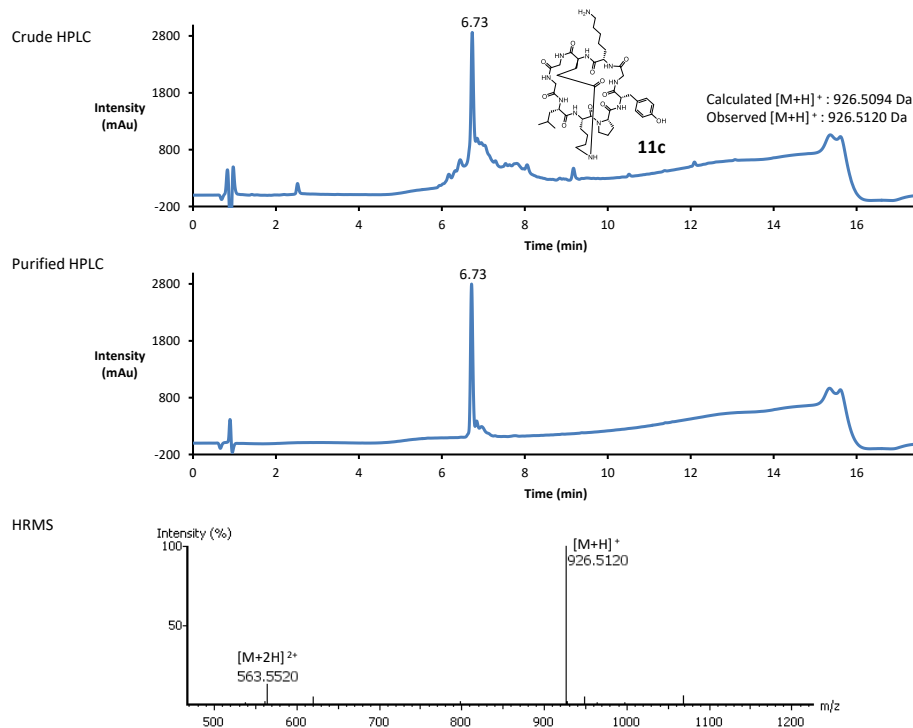


**Figure S1. (Continued)**

*Cyclo [Gly-Leu-Lys\*-Pro-Tyr-Gly-Lys-Gly-Glu\*-Gly] (11b)*

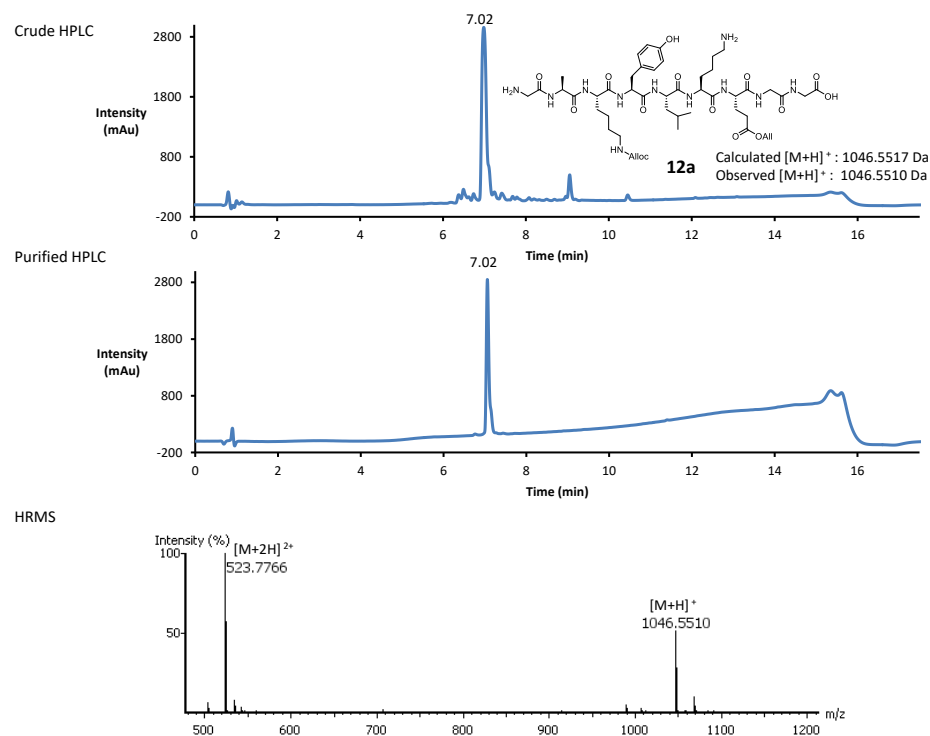


*Cyclo [Gly-Leu- Cyclo [Lys-Pro-Tyr-Gly-Lys-Gly-Glu] -Gly] (11c)*

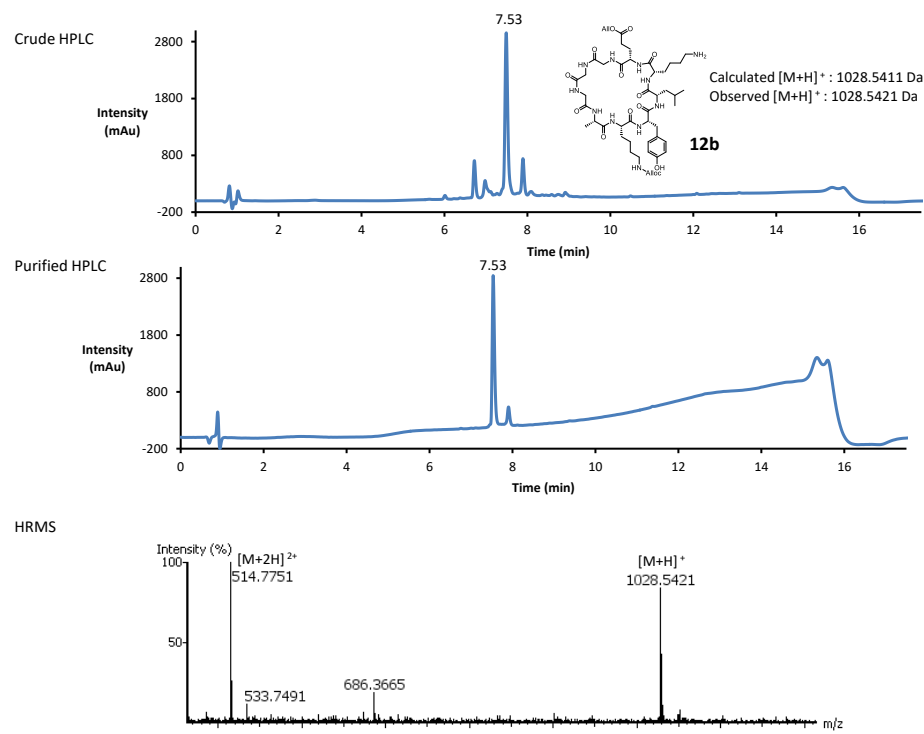


**Figure S1. (Continued)**

*H-Gly-Ala-Lys\*-Tyr-Leu-Lys-Gly-Glu\*-Gly-Gly-OH (12a)*

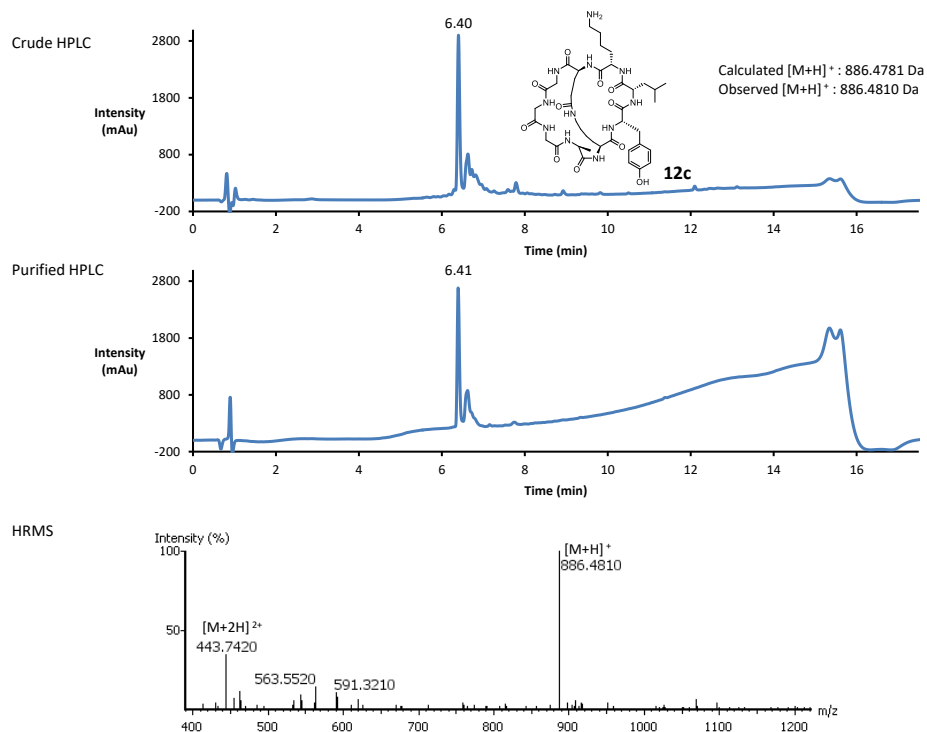


*Cyclo [Gly-Ala-Lys\*-Tyr-Leu-Lys-Gly-Glu\*-Gly-Gly] (12b)*

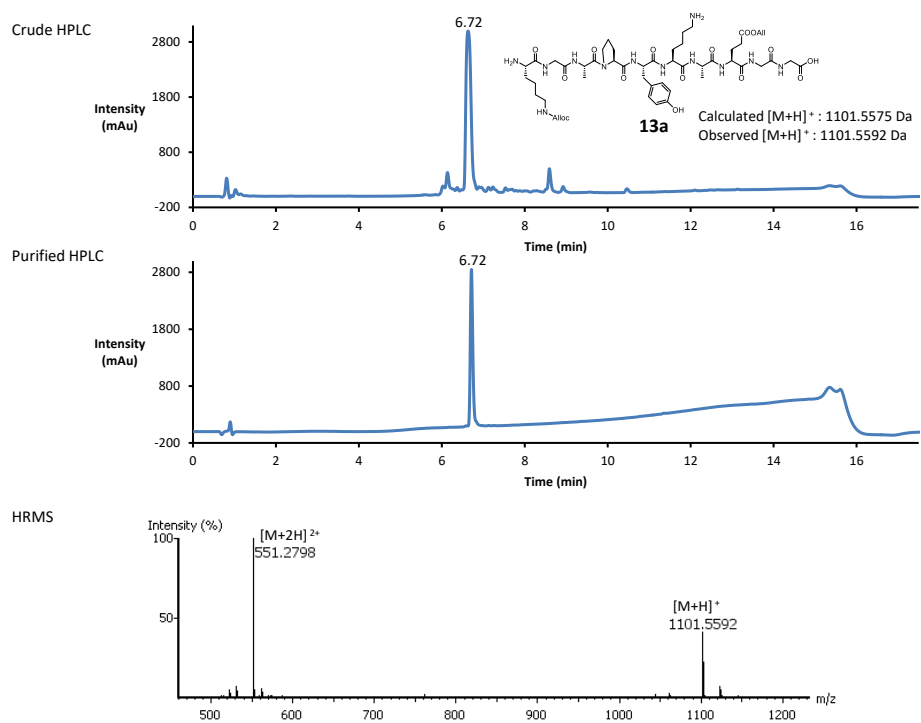


**Figure S1. (Continued)**

*Cyclo [Gly-Ala- Cyclo [Lys-Tyr-Leu-Lys-Gly-Glu] -Gly-Gly] (12c)*

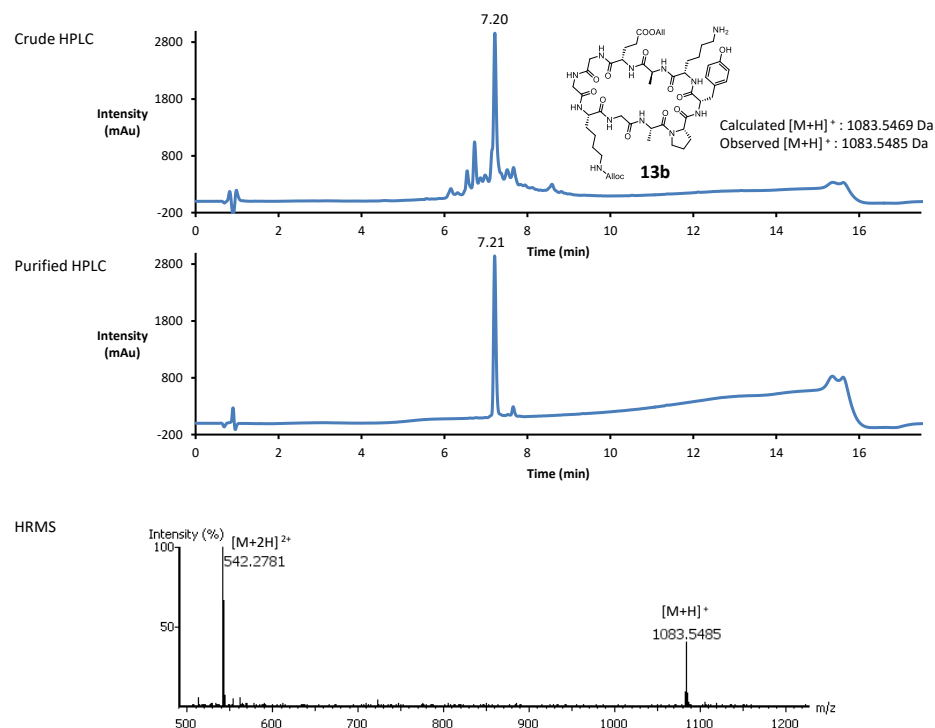


*H-Lys\*-Gly-Ala-Tyr-Leu-Lys-Gly-Glu\*-Gly-Gly-OH (13a)*



**Figure S1. (Continued)**

*Cyclo [Lys\*-Gly-Ala-Tyr-Leu-Lys-Gly-Glu\*-Gly-Gly] (13b)*



*Cyclo [ Cyclo [Lys-Gly-Ala-Tyr-Leu-Lys-Gly-Glu] -Gly-Gly ] (13c)*

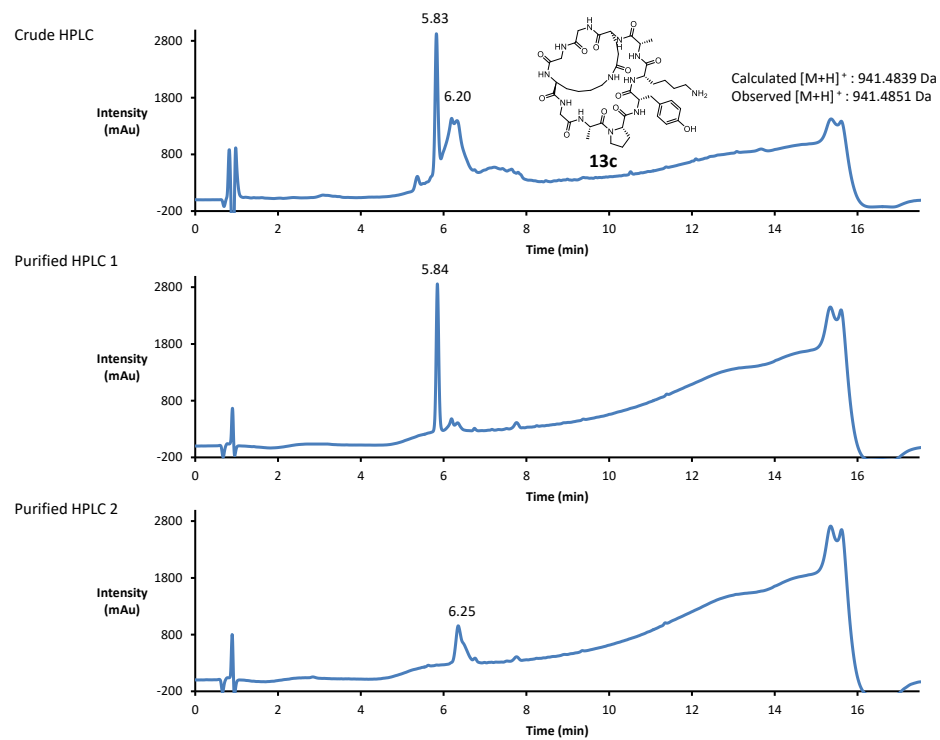
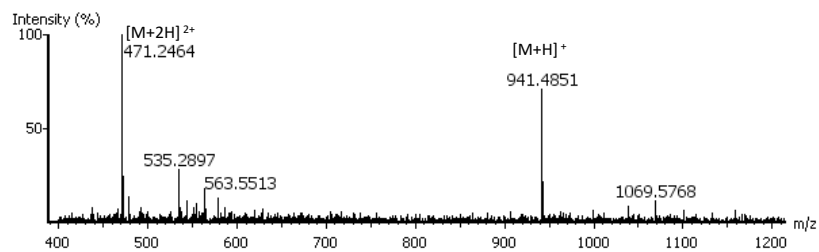


Figure S1. (Continued)

HRMS 1



HRMS 2

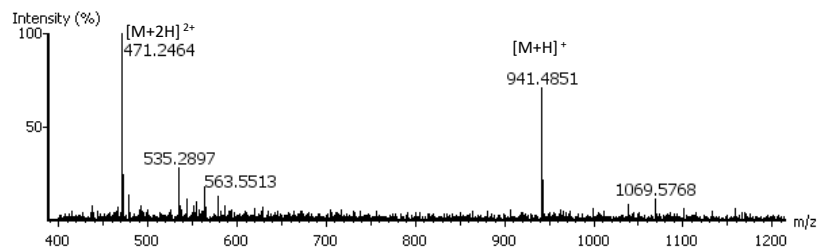


Figure S2. NMR  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  spectras.

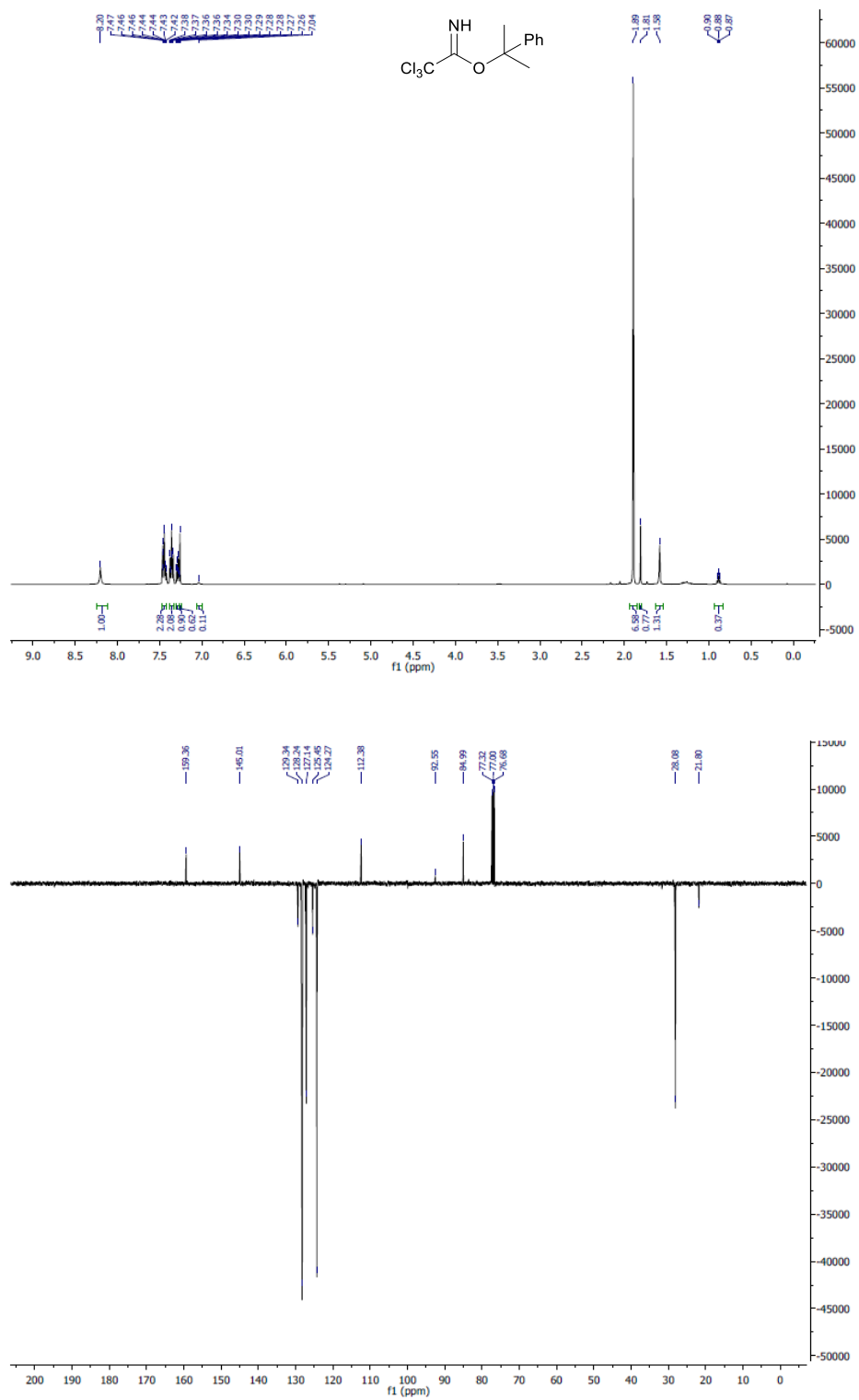


Figure S2. (Continued)

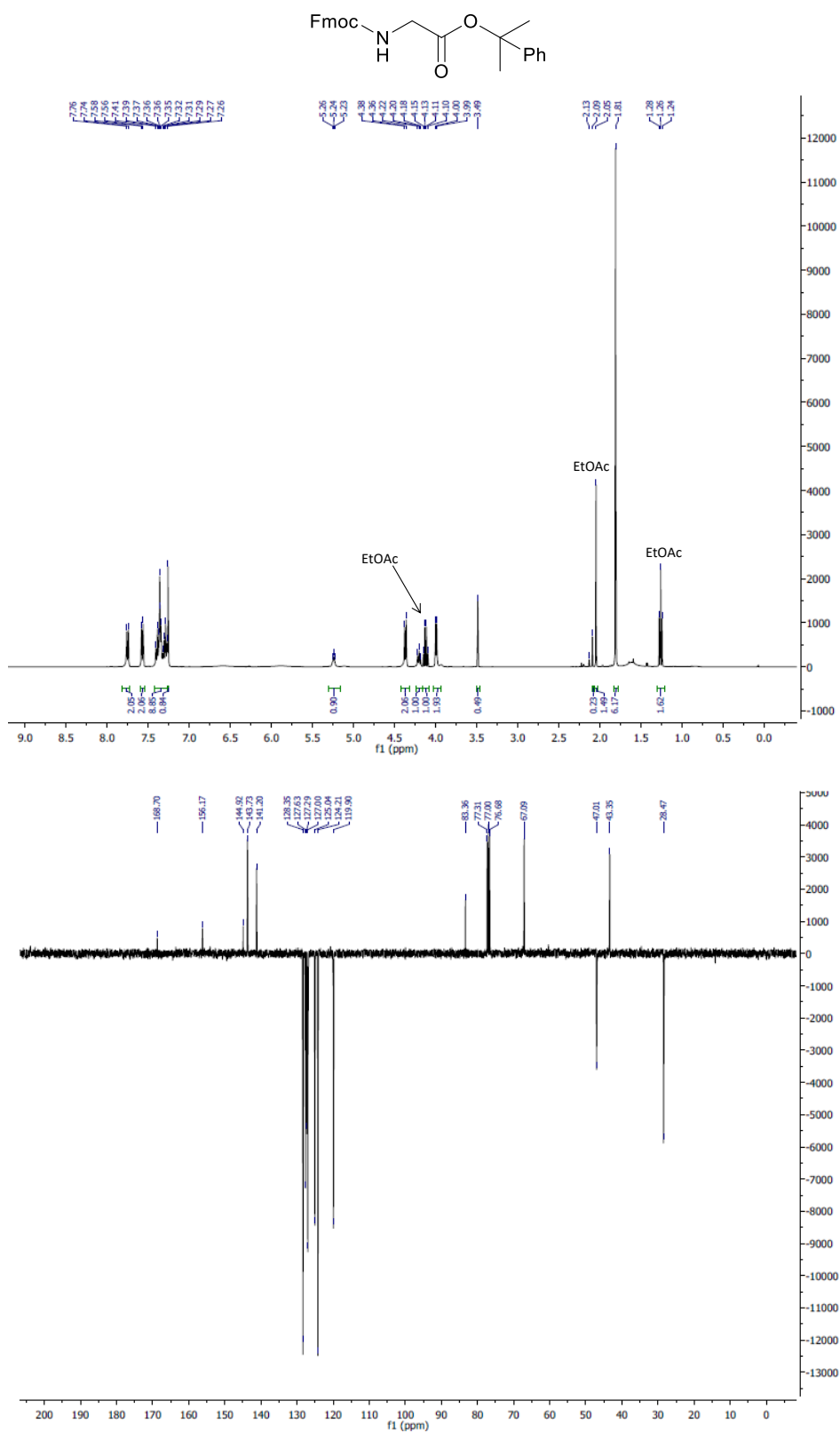
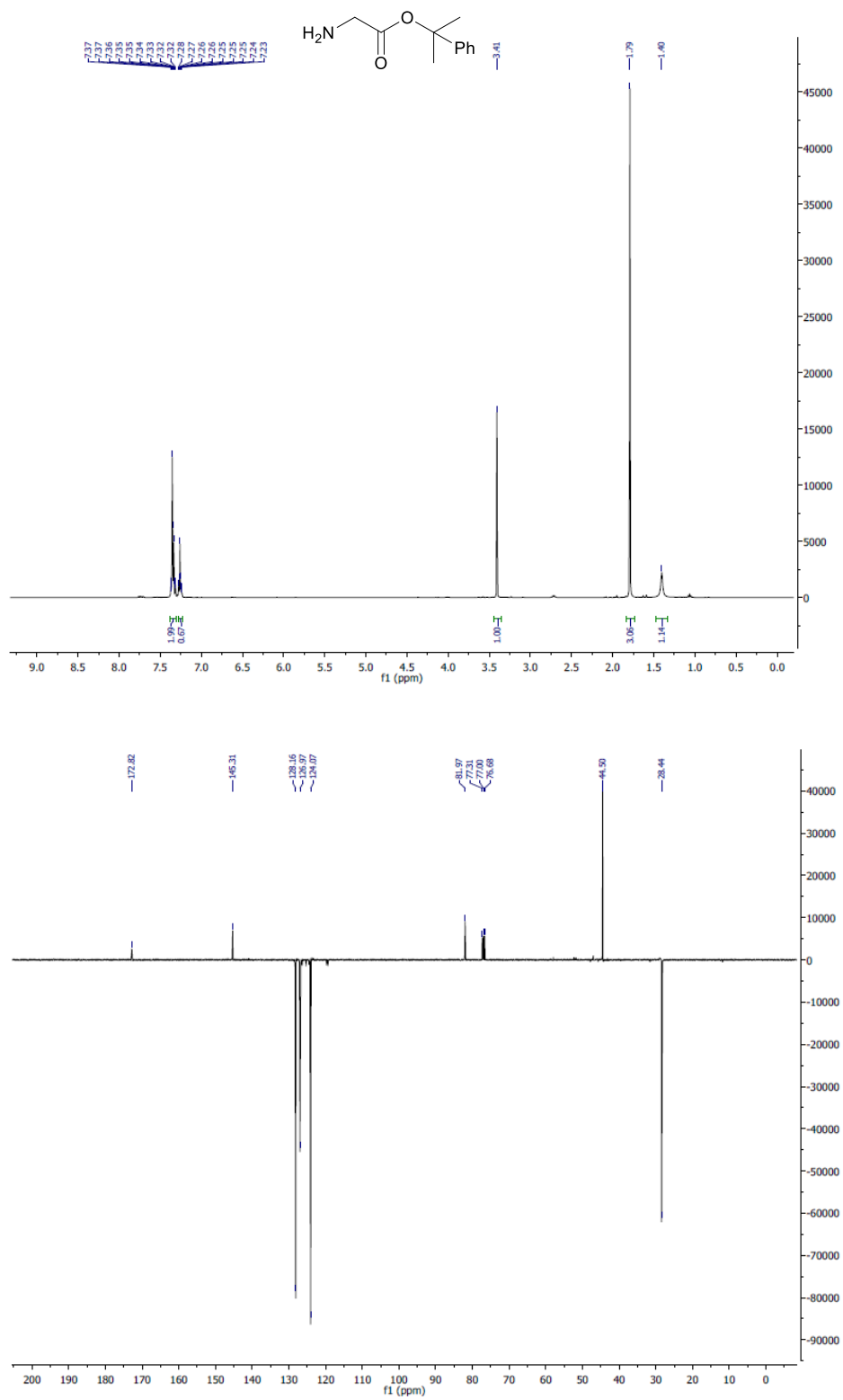




Figure S2. (Continued)





## **Chapitre 5**

### **Discussion et conclusion**



## 5.1 Discussion générale

Les peptides sont des molécules en forte progression dans la découverte et le développement de nouveaux agents thérapeutiques et de plus en plus en demande dans l'industrie pharmaceutique. Si la plupart des premiers peptides thérapeutiques utilisés cliniquement étaient de faible poids moléculaire et relativement simples du point de vue structural, ceux présentement en développement dans les études cliniques ou nouvellement sur le marché sont de plus grande taille et beaucoup plus complexes. Par exemple, on retrouve présentement dans les études cliniques un grand nombre de peptides comportant plus de trente résidus d'acides aminés ainsi que plusieurs structures macrocycliques et même polycycliques. Comme la synthèse de peptides complexes reste relativement difficile et nécessite beaucoup d'étapes de synthèses, dût aux modifications qu'il faut généralement apporter avec des approches de couplages de fragments, il est d'intérêt de concevoir et développer de nouvelles procédures dans ce champ d'études.

Dans le cadre de ce mémoire, il a été démontré aux chapitres 3 et 4 que la réaction multicomposante de Ugi peut s'avérer un outil très intéressant dans la synthèse de structures peptidiques complexes. Notamment, l'approche U-4CR/déprotection a été appliquée aux couplages de fragments peptidiques et à l'ancrage d'acides aminés par leur squelette amide afin de permettre la synthèse de peptides complexes.

Dans un premier temps, le chapitre 3 a tracé des lignes directrices pour toute autre équipe de laboratoire voulant utiliser des approches U-4CR/déprotection sur support solide. D'abord, des peptides modèles ont été synthétisés sur support solide. Le premier a été synthétisé sur une résine 2-Cl TCP permettant d'obtenir un acide carboxylique en C-terminal tout en gardant les groupements protecteurs des chaînes latérales via un clivage en conditions très faiblement acides, soit avec 20% HFIP/DCM. L'autre fragment a été synthétisé sur Rink Amide en déprotégeant l'amine terminale et en laissant ce peptide sur le support solide ChemMatrix®. Après une première U-4CR, une étude cinétique de déprotection du lien amide tertiaire a été effectuée avec différents aldéhydes afin de prouver l'importance de la présence d'un aldéhyde possédant un très fort caractère électrodonneur afin de stabiliser le carbocation instable formé. L'utilisation de micro-ondes s'est également avérée essentielle à la déprotection quantitative en seulement 45 minutes de la protection de l'amide, afin de fournir le peptide totalement déprotégé. Ceci confirme

notre hypothèse initiale qui consistait au fait que les micro-ondes stabilisent généralement les états de transitions possédant des dipôles. Cet effet stabilisateur a d'ailleurs permis la déprotection du résidu qui fait pourtant intervenir un carbocation en alpha d'un carbonyle, un intermédiaire relativement instable.

Par la suite, une optimisation sommaire de la U-4CR au niveau des solvants, des temps de réaction et des supports solides a été effectuée. Comme discuté précédemment, bien que la réaction fonctionne généralement bien dans le méthanol, la solvataion de longs peptides protégés dans ce solvant peut s'avérer inefficace. Des conditions alternatives intéressantes ont été développées, entre autres, l'utilisation du TFE et des mélanges DCM/MeOH et  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  sont prometteurs pour solubiliser les longs fragments. Toutefois, dans le cas de nos peptides modèles, l'utilisation d'un mélange MeCN/MeOH semblait offrir les meilleurs résultats avec la résine ChemMatrix® sous irradiations de micro-ondes à 60°C pendant 1h.

Ayant des résultats intéressants avec des peptides modèles de 6 acides aminés, la méthode a été étendue à de plus longs fragments. La limite de la méthode était surtout au niveau de la synthèse des fragments, ce qui explique les rendements faibles obtenus pour les peptides de 25 et 30 acides aminés. D'ailleurs, la méthode a été arrêtée à 30 acides aminés dans le cadre de la publication, mais des tests ont été effectués avec des fragments plus longs, atteignant les 40 acides aminés, mais les résultats n'étaient pas concluants. La synthèse du Forteo™ un peptide commercialisé utilisé pour traiter l'ostéoporose a aussi été tentée, mais sans succès, encore une fois en raison de la synthèse des fragments qui posait problème, puisque ces derniers n'ont pas été purifiés avant d'être utilisés. D'autres conditions de solvants ont été tentées, mais encore une fois sans succès, de sorte qu'il faudra ultimement trouver d'autres conditions afin d'effectuer la réaction.

Une expérience en présence d'un fragment N-terminal qui possédait une phénylalanine au site de liaison a finalement permis de démontrer que même si le mécanisme de la réaction passe par la formation d'un ester activé, peu, voire aucune, épimérisation n'est observable. L'absence d'épimérisation est notamment explicable par le fait que la réaction est en milieu relativement neutre et non basique, ce qui ne favorise pas la formation d'oxazolone.

La méthode développée au chapitre 3 est donc énantiosélective, ne nécessite pas de modifications pré réactionnelles, ni de restriction théorique d'acides aminés tout en utilisant des réactifs abordables en faible excès stœchiométrique. Elle est une méthode alternative intéressante dans la synthèse de peptides complexes. À la lumière des travaux de Danishefsky sur l'utilisation d'isonitriles pour coupler des fragments qui n'avait pas donné de très bons résultats initialement,<sup>81</sup> ces travaux préliminaires auront besoin d'optimisation, mais c'est un bon début pour paver la voie à l'obtention de plus longs peptides. Ainsi, pour cette partie du projet, les objectifs spécifiques ont tous été atteints, tout comme l'objectif général.

Dans la deuxième partie de mon projet de maîtrise présentée au chapitre 4, la stratégie U-4CR/déprotection a été appliquée à une autre facette de la chimie des peptides, soit l'ancrage par le squelette amide d'un peptide pour la production de peptides cycliques. Inspiré de la procédure de Jensen *et al*,<sup>48</sup> nous avons synthétisé un support solide fonctionnalisé tris(alkoxy)benzaldéhyde. Ce type de support solide mime en fait le 2,4,6-triméthoxybenzaldéhyde utilisé au chapitre 3, de sorte que nous croyions qu'en attachant cet aldéhyde au support solide et en le faisant réagir avec deux acides aminés, il serait possible de cliver sélectivement le peptide du support solide via acidolyse sous micro-ondes. Cette déprotection devrait pouvoir s'effectuer sous les mêmes conditions que celles décrites dans le chapitre 3, puisque l'aldéhyde utilisé est très similaire, si ce n'est que sur le support solide cette fois-ci.

Nous avons donc débuté par une optimisation de l'ancrage des acides aminés en calculant les taux de substitutions de la résine à l'aide du groupement protecteur Fmoc qui, lorsqu'en présence de DBU, régénère l'amine libre tout en formant un dibenzofulvène qui possède une absorbance spécifique à 304 nm.<sup>136</sup> Comme les réactifs initiaux coûtent moins cher que les fragments peptidiques utilisés dans le chapitre 3, 2,5 équivalents d'amine et 5 équivalents d'acides sont utilisés, diminuant les temps de réaction nécessaires pour que la réaction se complète, cette dernière nécessitant seulement 30 minutes à 60°C sous l'effet des micro-ondes.

Par la suite, la compatibilité de l'ancrage avec la SPPS a été vérifiée pour pouvoir synthétiser d'abord des peptides linéaires. Le clivage de l'ancrage par acidolyse avec une solution de TFA a encore une fois nécessité l'irradiation à 60°C aux micro-ondes afin

qu'elle opère. Il est à noter que le clivage du support solide et des groupements protecteurs de chaînes latérales sont effectués simultanément avec cette procédure, diminuant les étapes de synthèse.

La méthode développée a ensuite été comparée avec la méthode plus classique d'amination réductive. Les rendements étaient similaires pour la quantification du groupement Fmoc, mais la pureté du peptide **1b** est inférieure à celles obtenues pour les peptides **1a** et **1c** obtenus par U-4CR, ce qui a aussi entraîné un rendement légèrement plus faible pour le peptide **1b**. Ainsi, en plus d'offrir une économie de temps et de réactifs, l'utilisation de la réaction de Ugi pour former *in situ* un ancrage positionné sur le lien amide entre deux acides aminés semble être légèrement plus efficace.

Le fait d'avoir un ancrage relativement stable aux acides forts fait en sorte qu'il est possible de retirer sélectivement des groupements protecteurs sensibles en milieu acide sans cliver le peptide du support solide. À partir de ces observations, l'utilisation du groupement protecteur orthogonal phénylisopropyl ester (PhiPr) a été placée en C-terminal afin de pouvoir synthétiser des peptides cycliques et bicycliques fonctionnalisés. Ce groupement a été choisi, car il est connu comme étant sensible aux acides faibles, tout en évitant la formation de dicétopipérazines, soit un dipeptide cyclique qui est en fait un sous-produit non désiré dans le cadre de la synthèse de macrocycles peptidiques. La synthèse de tels composés s'est effectuée en obtenant des rendements et puretés brutes acceptables étant donné la complexité des structures synthétisées.

Cette approche d'ancrage par le squelette amide faisant intervenir la réaction multicomposante de Ugi est donc une approche qui s'avère intéressante afin d'éviter les longs temps de réaction et les excès de réactifs nécessaires à l'amination réductive. Une fois de plus, nous avons pu remplir les conditions décrites en tant qu'objectifs afin de prouver adéquatement l'utilité de cette méthode dans l'éventualité d'une synthèse de peptides d'intérêts.



## 5.2 Conclusion

Au cours de ma maîtrise, j'ai eu l'opportunité de concevoir et de développer une nouvelle approche synthétique utilisant la réaction multicomposante de Ugi permettant la condensation sur support solide de fragments peptidiques ainsi que l'ancrage de peptides par le squelette pour la synthèse de macrocycles peptidiques. Au cours des travaux, plusieurs paramètres ont été analysés et optimisés afin de mieux comprendre l'approche Ugi/déprotection mise au point et démontrer son potentiel dans différentes applications.

Dans la première partie, le développement d'une nouvelle méthode de couplage de fragments peptidiques a été effectué. L'étude suivant le processus de déprotection par une cinétique de réaction a permis de s'assurer que le temps de réaction soit optimal pour obtenir le produit désiré, tout en prouvant l'importance d'un aldéhyde fortement électrodonneur par résonance. L'analyse des conditions réactionnelles a également permis d'en apprendre plus sur le sujet, sans compter l'analyse d'épimérisation qui prouve que la méthode peut s'avérer utile dans un contexte de synthèse de peptides complexes. Néanmoins, des travaux restent à faire pour étendre l'applicabilité de la méthode, surtout au niveau de la solubilisation des fragments pour une U-4CR optimale et efficace.

Les résultats des travaux décrits précédemment ont été repris dans un tout autre contexte soit la synthèse de peptides cycliques fonctionnalisés. Le fait d'ancrer le peptide par son squelette sur le support solide via un aldéhyde électrodonneur permet de relarguer efficacement le composé désiré du support solide en clivant le lien amide tertiaire formé par la réaction de Ugi. La synthèse de peptides complexes a été possible à partir de cette approche, pavant la voie vers la découverte de nouveaux agents thérapeutiques. Les suites possibles à ce projet sont nombreuses. Entre autres, l'application à la synthèse de produits réellement d'intérêt n'a pas encore été effectuée. La prochaine étape de ce projet consiste en la combinaison de l'approche développée, couplée à une cyclisation par Ugi-Smiles qui pourrait notamment mener à la synthèse d'ansa peptides, soit une classe de produits naturels issus principalement de plantes, au potentiel intéressant en tant que molécules peptidomimétiques.<sup>114,137</sup>

En conclusion, le développement d'un point de vue fondamental de l'approche U-4CR/déprotection a été effectué lors de mon projet de maîtrise. Ces travaux pavent donc la voie aux travaux futurs concernant l'application de ces procédures à la synthèse de molécules d'intérêt.



## RÉFÉRENCES

1. Vlieghe, P.; Lisowski, V.; Martinez, J.; Khrestchatisky, M., Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discov. Today*. **2010**, 15, 40-56.
2. Craik, D. J.; Fairlie, D. P.; Liras, S.; Price, D., The future of peptide-based drugs. *Chem. Biol. Drug. Des.* **2013**, 81, 136-147.
3. Kaspar, A. A.; Reichert, J. M., Future directions for peptide therapeutics development. *Drug Discov. Today*. **2013**, 18, 807-817.
4. Fosgerau, K.; Hoffmann, T., Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discov. Today*. **2015**, 20, 122-128.
5. Santos, G. B.; Ganesan, A.; Emery, F. S., Oral administration of peptide-based drugs: Beyond Lipinski's rule. *ChemMedChem*. **2016**, 11, 2245-2251.
6. Siegert, T. R.; Bird, M. J.; Makwana, K. M.; Kritzer, J. A., Analysis of loops that mediate protein-protein interactions and translation into submicromolar inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 12876-12884.
7. Wójcik, P.; Berlicki, Ł., Peptide-based inhibitors of protein-protein interactions. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, 26, 707-713.
8. Nevola, L.; Giralt, E., Modulating protein-protein interactions: the potential of peptides. *Chem. Commun.* **2015**, 51, 3302-3315.
9. Tsomaia, N., Peptide therapeutics: Targeting the undruggable space. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 94, 459-470.
10. Nguyen, L. T.; Haney, E. F.; Vogel, H. J., The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.* **2011**, 29, 464-472.
11. Reddy, K. V. R.; Yedery, R. D.; Aranha, C., Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int. J. Antimicrob. Ag.* **2004**, 24, 536-547.
12. Rodriguez, J. M.; Martinez, M. I.; Kok, J., Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Crit. Rev. Food Sci.* **2002**, 42, 91-121.
13. Wu, D. D.; Gao, Y. F.; Qi, Y. M.; Chen, L. X.; Ma, Y. F.; Li, Y. Z., Peptide-based cancer therapy: Opportunity and challenge. *Cancer Lett.* **2014**, 351, 13-22.
14. Xiao, Y. F.; Jie, M. M.; Li, B. S.; Hu, C. J.; Xie, R.; Tang, B.; Yang, S. M., Peptide-based treatment: A promising cancer therapy. *J. Immun. Res.* **2015**, Vol. 2015, 13 pages.

15. Eng, C.; Kramer, C. K.; Zinman, B.; Retnakaran, R., Glucagon-like peptide-1 receptor agonist and basal insulin combination treatment for the management of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Lancet*. **2014**, 384, 2228-2234.
16. Drucker, D. J.; Nauck, M. A., The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet*. **2006**, 368, 1696-1705.
17. Flegal, K. M.; Kruszon-Moran, D.; Carroll, M. D.; Fryar, C. D.; Ogden, C. L., Trends in obesity among adults in the United states, 2005 to 2014. *JAMA*. **2016**, 315, 2284-2291.
18. Cai, Y. P.; Wei, L. M.; Ma, L. Q.; Huang, X. W.; Tao, A. Q.; Liu, Z. G.; Yuan, W. E., Long-acting preparations of exenatide. *Drug Des. Devel. Ther.* **2013**, 7, 963-970.
19. Russell-Jones, D., Molecular, pharmacological and clinical aspects of liraglutide, a once-daily human GLP-1 analogue. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2009**, 297, 137-140.
20. Elkinson, S.; Keating, G. M., Lixisenatide: First global approval. *Drugs*. **2013**, 73, 383-391.
21. Rosenstock, J.; Reusch, J.; Bush, M.; Yang, F.; Stewart, M., Potential of albiglutide, a long-acting GLP-1 receptor agonist, in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. **2009**, 32, 1880-1886.
22. Lau, J.; *et al.*, Discovery of the once-weekly glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogue semaglutide. *J. Med. Chem.* **2015**, 58, 7370-7380.
23. Nauck, M.; Weinstock, R. S.; Umpierrez, G. E.; Guerci, B.; Skrivanek, Z.; Milicevic, Z., Efficacy and safety of dulaglutide versus sitagliptin after 52 weeks in type 2 diabetes in a randomized controlled trial (AWARD-5). *Diabetes Care*. **2014**, 37, 2149-2158.
24. Diao, L.; Meibohm, B., Pharmacokinetics and pharmacokinetic-pharmacodynamic correlations of therapeutic peptides. *Clin. Pharmacokinet.* **2013**, 52, 855-868.
25. Werner, H. M.; Cabalteja, C. C.; Horne, W. S., Peptide backbone composition and protease susceptibility: Impact of modification type, position, and tandem substitution. *ChemBioChem*. **2016**, 17, 712-718.
26. Yang, P. Y.; *et al.*, Engineering a long-acting, potent GLP-1 analog for microstructure-based transdermal delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2016**, 113, 4140-4145.
27. Scott, L. J., Exenatide extended-release. *Drugs*. **2012**, 72, 1679-1707.

28. Werle, M.; Bernkop-Schnürch, A., Strategies to improve plasma half life time of peptide and protein drugs. *Amino Acids*. **2006**, 30, 351-367.
29. Roberts, M. J.; Bentley, M. D.; Harris, J. M., Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2012**, 64, 116-127.
30. Dennis, M. S.; Zhang, M.; Meng, Y. G.; Kadkhodayan, M.; Kirchhofer, D.; Combs, D.; Damico, L. A., Albumin binding as a general strategy for improving the pharmacokinetics of proteins. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 35035-35043.
31. Knudsen, L. B.; *et al.*, Potent derivatives of glucagon-like peptide-1 with pharmacokinetic properties suitable for once daily administration. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 1664-1669.
32. Cereghino, J. L.; Cregg, J. M., Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Fems Microbiol. Rev.* **2000**, 24, 45-66.
33. Baneyx, F., Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotech.* **1999**, 10, 411-421.
34. Structural Genomics Consortium; *et al.* Protein production and purification. *Nat. Methods*. **2008**, 5, 135-146.
35. Li, Y. F., Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: A review. *Protein. Expres. Purif.* **2011**, 80, 260-267.
36. Merrifield, R. B., Solid phase peptide synthesis 1. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149-2154.
37. Merrifield, R. B., Solid phase synthesis (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **1985**, 24, 799-810.
38. Cameron, L.; Meldal, M.; Sheppard, R. C., Feedback control in organic synthesis. A system for solid phase peptide synthesis with true automation. *Chem. Commun.* **1987**, 270-272.
39. Caruthers, M. H., Gene synthesis machines: DNA chemistry and its uses. *Science*. **1985**, 230, 281-285.
40. Dalvi, P. B.; Lin, S. F.; Paik, V.; Sun, C. M., Microwave-assisted multicomponent synthesis of dihydroquinoxalinones on soluble polymer support. *ACS. Comb. Sci.* **2015**, 17, 421-425.
41. Franzen, R. G., Recent advances in the preparation of heterocycles on solid support: A review of the literature. *J. Comb. Chem.* **2000**, 2, 195-214.

42. Hewitt, W. M.; Leung, S. S. F.; Pye, C. R.; Ponkey, A. R.; Bednarek, M.; Jacobson, M. P.; Lokey, R. S., Cell-permeable cyclic peptides from synthetic libraries inspired by natural products. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 715-721.
43. Liang, X. X.; Vezina-Dawod, S.; Bedard, F.; Porte, K.; Biron, E., One-pot photochemical ring-opening/cleavage approach for the synthesis and decoding of cyclic peptide libraries. *Org. Lett.* **2016**, 18, 1174-1177.
44. Santini, R.; Griffith, M. C.; Qi, M., A measure of solvent effects on swelling of resins for solid phase organic synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 8951-8954.
45. Quarrell, R.; Claridge, T. D. W.; Weaver, G. W.; Lowe, G., Structure and properties of TentaGel resin beads: Implications for combinatorial library chemistry. *Mol. Divers.* **1996**, 1, 223-232.
46. Garcia-Martin, F.; *et al.*, ChemMatrix, a poly(ethylene glycol)-based support for the solid-phase synthesis of complex peptides. *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 213-220.
47. Guillier, F.; Orain, D.; Bradley, M., Linkers and cleavage strategies in solid-phase organic synthesis and combinatorial chemistry. *Chem. Rev.* **2000**, 100, 2091-2157.
48. Jensen, K. J.; Alsina, J.; Songster, M. F.; Vagner, J.; Albericio, F.; Barany, G., Backbone Amide Linker (BAL) strategy for solid-phase synthesis of C-terminal-modified and cyclic peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 5441-5452.
49. Isidro-Llobet, A.; Alvarez, M.; Albericio, F., Amino Acid-Protecting Groups. *Chem. Rev.* **2009**, 109, 2455-2504.
50. Fields, G. B.; Noble, R. L., Solid-phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylcethoxycarbonyl amino acids. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1990**, 35, 161-214.
51. Fanny, G.; Sonia, B.; Andrés, I., Peptide synthesis: chemical or enzymatic. *Electron. J. Biotechnol.* **2007**, 10, 40 pages.
52. El-Faham, A.; Albericio, F., Peptide coupling reagents, more than a letter soup. *Chem. Rev.* **2011**, 111, 6557-6602.
53. Carpino, L. A., 1-hydroxy-7-azabenzotriazole – An efficient peptide coupling additive. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4397-4398.
54. Carpino, L. A. *et al.*, The uronium/guanidinium peptide coupling reagents: finally the true uronium salts. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 441-445.
55. Chen, M.; Heimer, P.; Imhof, D., Synthetic strategies for polypeptides and proteins by chemical ligation. *Amino Acids.* **2015**, 47, 1283-1299.

56. Paradis-Bas, M.; Tulla-Puche, J.; Albericio, F., The road to the synthesis of "difficult peptides". *Chem. Rev.* **2016**, 45, 631-654.
57. Tailhades, J.; Patil, N. A.; Hossain, M. A.; Wade, J. D., Intramolecular acyl transfer in peptide and protein ligation and synthesis. *J. Pept. Sci.* **2015**, 21, 139-147.
58. Thapa, P.; Zhang, R.-Y.; Menon, V.; Bingham, J.-P., Native chemical ligation: A boon to peptide chemistry. *Molecules.* **2014**, 19, 14461-14483.
59. Bacsa, B.; Horvati, K.; Bosze, S.; Andrae, F.; Kappe, C. O., Solid-phase synthesis of difficult peptide sequences at elevated temperatures: A critical comparison of microwave and conventional heating technologies. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 7532-7542.
60. Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clarklewis, I.; Kent, S. B. H., Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science*, **1994**, 266, 776-779.
61. Malins, L. R.; Payne, R. J., Recent extensions to native chemical ligation for the chemical synthesis of peptides and proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, 22, 70-78.
62. Kumar, K. S. A.; Bavikar, S. N.; Spasser, L.; Moyal, T.; Ohayon, S.; Brik, A., Total chemical synthesis of a 304 amino acid K48-linked tetraubiquitin protein. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 6137-6141.
63. Masuda, K.; Furumitsu, M.; Ooyama, H.; Iwakoshi-Ukena, E.; Ukena, K., Synthesis of neurosecretory protein GM composed of 88 amino acid residues by native chemical ligation. *Tetrahedron Lett.* **2016**, 57, 804-807.
64. Dirksen, A.; Dawson, P. E., Expanding the scope of chemoselective peptide ligations in chemical biology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, 12, 760-766.
65. Tam, J. P.; Xu, J. X.; Eom, K. D., Methods and strategies of peptide ligation. *Biopolymers.* **2001**, 60, 194-205.
66. Yan, L. Z.; Dawson, P. E., Synthesis of peptides and proteins without cysteine residues by native chemical ligation combined with desulfurization. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 526-533.
67. Wan, Q.; Danishefsky, S. J., Free-radical-based, specific desulfurization of cysteine: A powerful advance in the synthesis of polypeptides and glycopolypeptides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 9248-9252.
68. Crich, D.; Banerjee, A., Native chemical ligation at phenylalanine. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 10064-10065.

69. Haase, C.; Rohde, H.; Seitz, O., Native chemical ligation at valine. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 6807-6810.
70. Siman, P.; Karthikeyan, S. V.; Brik, A., Native chemical ligation at glutamine. *Org. Lett.* **2012**, 14, 1520-1523.
71. Tam, J. P.; Yu, Q. T., Methionine ligation strategy in the biomimetic synthesis of parathyroid hormones. *Biopolymers.* **1998**, 46, 319-327.
72. Todorovski, T.; Sunol, D.; Riera, A.; Macias, M. J., Addition of HOBt improves the conversion of thioester-amine chemical ligation. *Biopolymers.* **2015**, 104, 693-702.
73. Nilsson, B. L.; Kiessling, L. L.; Raines, R. T., Staudinger ligation: A peptide from a thioester and azide. *Org. Lett.* **2000**, 2, 1939-1941.
74. Soellner, M. B.; Nilsson, B. L.; Raines, R. T., Staudinger ligation of alpha-azido acids retains stereochemistry. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 4993-4996.
75. Köhn, M.; Breinbauer, R., The Staudinger ligation - A gift to chemical biology. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 3106-3116.
76. Merx, R.; Rijkers, D. T. S.; Kemmink, J.; Liskamp, R. M. J., Chemoselective coupling of peptide fragments using the Staudinger ligation. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 4515-4518.
77. Saxon, E.; Armstrong, J. I.; Bertozzi, C. R., A "traceless" Staudinger ligation for the chemoselective synthesis of amide bonds. *Org. Lett.* **2000**, 2, 2141-2143.
78. Saxon, E.; Bertozzi, C. R., Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. *Science.* **2000**, 287, 2007-2010.
79. Kiick, K. L.; Saxon, E.; Tirrell, D. A.; Bertozzi, C. R., Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2002**, 99, 19-24.
80. Nilsson, B. L.; Hondal, R. J.; Soellner, M. B.; Raines, R. T., Protein assembly by orthogonal chemical ligation methods. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 5268-5269.
81. Li, X. C.; Danishefsky, S. J., New chemistry with old-functional groups: On the reaction of isonitriles with carboxylic acids - A route to various amide types. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 5446-5448.
82. Yuan, Y.; Zhu, J.; Li, X.; Wu, X.; Danishefsky, S. J., Preparation and reactions of N-thioformyl peptides from amino thioacids and isonitriles. *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 2329-2333.



83. Rao, Y.; Li, X. C.; Danishefsky, S. J., Thio FCMA intermediates as strong acyl donors: A general solution to the formation of complex amide bonds. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 12924-12926.
84. Wang, P.; Danishefsky, S. J., Promising general solution to the problem of ligating peptides and glycopeptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 17045-17051.
85. Wilson, R. M.; Stockdill, J. L.; Wu, X. Y.; Li, X. C.; Vadola, P. A.; Park, P. K.; Wang, P.; Danishefsky, S. J., A fascinating journey into history: Exploration of the world of isonitriles en route to complex amides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 2834-2848.
86. Wang, T.; Danishefsky, S. J., Revisiting oxytocin through the medium of isonitriles. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 13244-13247.
87. Wu, X. Y.; Stockdill, J. L.; Park, P. K.; Danishefsky, S. J., Expanding the limits of isonitrile-mediated amidations: On the remarkable stereosubtleties of macrolactam formation from synthetic seco-cyclosporins. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 2378-2384.
88. Wang, T.; Danishefsky, S. J., Solid-phase peptide synthesis and solid-phase fragment coupling mediated by isonitriles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2013**, 110, 11708-11713.
89. Roberts, A. G.; Johnston, E. V.; Shieh, J. H.; Sondey, J. P.; Hendrickson, R. C.; Moore, M. A. S.; Danishefsky, S. J., Fully synthetic granulocyte colony-stimulating factor enabled by isonitrile-mediated coupling of large, side-chain-unprotected peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 13167-13175.
90. Pusterla, I.; Bode, J. W., An oxazetidine amino acid for chemical protein synthesis by rapid, serine-forming ligations. *Nat. Chem.* **2015**, 7, 668-672.
91. Zhang, Y.; Xu, C.; Lam, H. Y.; Lee, C. L.; Li, X., Protein chemical synthesis by serine and threonine ligation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2013**, 110, 6657-6662.
92. Hu, L.; Xu, S. L.; Zhao, Z. G.; Yang, Y.; Peng, Z. Y.; Yang, M.; Wang, C. L.; Zhao, J. F., Ynamides as racemization-free coupling reagents for amide and peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 13135-13138.
93. He, C. M.; Kulkarni, S. S.; Thuaud, F.; Bode, J. W., Chemical synthesis of the 20kDa heme protein nitrophorin4 by ketoacid-hydroxylamine (KAHA) ligation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 12996-13001.
94. White, C. J.; Yudin, A. K., Contemporary strategies for peptide macrocyclization. *Nat. Chem.* **2011**, 3, 509-524.

95. Yudin, A. K., Macrocycles: lessons from the distant past, recent developments, and future directions. *Chem. Sci.* **2015**, 6, 30-49.
96. Hill, T. A.; Shepherd, N. E.; Diness, F.; Fairlie, D. P., Constraining cyclic peptides to mimic protein structure motifs. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 13020-13041.
97. Dubos, R. J., Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus. *J. Exp. Med.* **1939**, 70, 11.
98. Matsuda, S.; Koyasu, S., Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology.* **2000**, 47, 119-125.
99. Harris, K. S.; Durek, T.; Kaas, Q.; Poth, A. G.; Gilding, E. K.; Conlan, B. F.; Saska, I.; Daly, N. L.; van der Weerden, N. L.; Craik, D. J.; Anderson, M. A., Efficient backbone cyclization of linear peptides by a recombinant asparaginyl endopeptidase. *Nat. Commun.* **2015**, 6, 10199.
100. Davies, J. S., The cyclization of peptides and depsipeptides. *J. Pept. Sci.* **2003**, 9, 471-501.
101. Romanovskis, P.; Spatola, A. F., Preparation of head-to-tail cyclic peptides via side-chain attachment: Implications for library synthesis. *J. Pept. Res.* **1998**, 52, 356-374.
102. Lambert, J. N.; Mitchell, J. P.; Roberts, K. D., The synthesis of cyclic peptides. *J. Chem. Soc. Perk. T. 1.* **2001**, 471-484.
103. Domling, A.; Wang, W.; Wang, K., Chemistry and biology of multicomponent reactions. *Chem. Rev.* **2012**, 112, 3083-3135.
104. Biginelli, P., Ueber aldehyduramide des acetessigäthers. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1891**, 24, 1317-1319.
105. Strecker, A., Ueber einen neuen aus aldehyd - Ammoniak und blausäure entstehenden körper. *Liebigs Ann. Chem.* **1854**, 91, 349-351.
106. Sunderhaus, J. D.; Martin, S. F., Applications of multicomponent reactions to the synthesis of diverse heterocyclic scaffolds. *Chem-Eur. J.* **2009**, 15, 1300-1308.
107. Ugi, I. Versammlungsberichte. *Angew. Chem.* **1959**, 71, 373-388.
108. Domling, A., Recent developments in isocyanide based multicomponent reactions in applied chemistry. *Chem. Rev.* **2006**, 106, 17-89.

109. Koopmanschap, G.; Ruijter, E.; Orru, R. V. A., Isocyanide-based multicomponent reactions towards cyclic constrained peptidomimetics. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 544-598.
110. Ruijter, E.; Scheffelaar, R.; Orru, R. V. A., Multicomponent reaction design in the quest for molecular complexity and diversity. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 6234-6246.
111. Hili, R.; Rai, V.; Yudin, A. K., Macrocyclization of linear peptides enabled by amphoteric molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2889-2891.
112. Wessjohann, L. A.; Rivera, D. G.; Vercillo, O. E., Multiple multicomponent macrocyclizations (MiBs): A strategic development toward macrocycle diversity. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 796-814.
113. Vasco, A. V.; Perez, C. S.; Morales, F. E.; Garay, H. E.; Vasilev, D.; Gavin, J. A.; Wessjohann, L. A.; Rivera, D. G., Macrocyclization of peptide side chains by the Ugi reaction: Achieving peptide folding and exocyclic *N*-functionalization in one shot. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 6697-6707.
114. Morejon, M. C.; Laub, A.; Westermann, B.; Rivera, D. G.; Wessjohann, L. A., Solution and solid-phase macrocyclization of peptides by the Ugi-Smiles multicomponent reaction: synthesis of *N*-aryl-bridged cyclic lipopeptides. *Org. Lett.* **2016**, *18*, 4096-4099.
115. Arabanian, A.; Mohammadnejad, M.; Balalaie, S.; Gross, J. H., Synthesis of novel Gn-RH analogues using Ugi-4MCR. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 887-890.
116. Wessjohann, L. A.; Morejon, M. C.; Ojeda, G. M.; Rhoden, C. R. B.; Rivera, D. G., Applications of convertible isonitriles in the ligation and macrocyclization of multicomponent reaction-derived peptides and depsipeptides. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 6535-6545.
117. Waki, M.; Meienhofer, J., Peptide synthesis using 4 component condensation (Ugi reaction). *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 6075-6082.
118. Ugi, I.; Fetzer, U.; Eholzer, U.; Knupfer, H.; Offerman, K., Isonitrile syntheses. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1965**, *4*, 472-484.
119. de Graaff, C.; Ruijter, E.; Orru, R. V. A., Recent developments in asymmetric multicomponent reactions. *Chem. Rev.* **2012**, *41*, 3969-4009.
120. Toure, B. B.; Hall, D. G., Natural product synthesis using multicomponent reaction strategies. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4439-4486.
121. Marcaccini, S.; Torroba, T., The use of the Ugi four-component condensation. *Nat. Prot.* **2007**, *2*, 632-639.

122. Portlock, D. E.; Naskar, D.; West, L.; Ostaszewski, R.; Chen, J. J., Solid-phase synthesis of five-dimensional libraries via a tandem Petasis-Ugi multi-component condensation reaction. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 5121-5124.
123. Short, K. M.; Mjalli, A. M. M., A solid-phase combinatorial method for the synthesis of novel 5- and 6-membered ring lactams. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 359-362.
124. Chen, J. J.; Golebiowski, A.; McClenaghan, J.; Klopfenstein, S. R.; West, L., Universal Rink-isonitrile resin: application for the traceless synthesis of 3-acylamino imidazo 1,2-a pyridines. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 2269-2271.
125. Liu, Z.; Nefzi, A., Solid-phase synthesis of *N*-substituted pyrrolidinone-tethered *N*-substituted piperidines via Ugi reaction. *J. Comb. Chem.* **2010**, 12, 566-570.
126. Rotstein, B. H.; Rai, V.; Hili, R.; Yudin, A. K., Synthesis of peptide macrocycles using unprotected amino aldehydes. *Nature Protocols.* **2010**, 5, 1813-1822.
127. Hoel, A. M. L.; Nielsen, J., Microwave-assisted solid-phase Ugi four-component condensations. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 3941-3944.
128. Harriman, G. C. B., Synthesis of small and medium sized 2,2-disubstituted lactams via the "intramolecular" three component Ugi reaction. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 5591-5594.
129. Tempest, P. A.; Brown, S. D.; Armstrong, R. W., Solid-phase, parallel syntheses by Ugi multicomponent condensation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, 35, 640-642.
130. Dai, W. M.; Shi, J. Y., Diversity-oriented synthesis and solid-phase organic synthesis under controlled microwave heating. *Comb. Chem. High. Scr.* **2007**, 10, 837-856.
131. Gedye, R.; Smith, F.; Westaway, K.; Ali, H.; Baldisera, L.; Laberge, L.; Rousell, J., The use of microwave ovens for rapid organic synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 279-282.
132. Perreux, L.; Loupy, A., A tentative rationalization of microwave effects in organic synthesis according to the reaction medium, and mechanistic considerations. *Tetrahedron.* **2001**, 57, 9199-9223.
133. Caddick, S., Microwave assisted organic reactions. *Tetrahedron.* **1995**, 51, 10403-10432.
134. Bacsa, B.; Horváti, K.; Bősze, S.; Andrae, F.; Kappe, C. O., Solid-phase synthesis of difficult peptide sequences at elevated temperatures: A critical comparison of microwave and conventional heating technologies. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 7532-7542.

135. Jobin, S.; Mejean, A.; Galindo, S.-M.; Liang, X.; Vezina-Dawod, S.; Biron, E., Toward solid-phase peptide fragment ligation by a traceless-Ugi multicomponent reaction approach. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, 14, 11230-11237.
136. Gude, M.; Ryf, J.; White, P. D., An accurate method for the quantitation of Fmoc-derivatized solid phase supports. *Lett. Pept. Sci.* **2002**, 9, 203-206.
137. Gournelis, D. C.; Laskaris, G. G.; Verpoorte, R., Cyclopeptide alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* **1997**, 14, 75-82.