

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA

SCIENZE CHIMICHE

Ciclo XX

CHIM/06 CHIMICA ORGANICA

TITOLO TESI

**SINTESI DI PEPTIDI E PEPTIDOMIMETICI
ATTIVI VERSO RECETTORI DI MEMBRANA**

Presentata da: Dr.Federico Squassabia

Coordinatore Dottorato:

**Prof. Vincenzo Balzani
Cardillo**

Relatore:

Prof. ssa. Giuliana

Co-Relatore:

Prof. Luca Gentilucci

Esame finale anno 2008

INDICE

INTRODUZIONE : PEPTIDI E PEPTIDOMIMETICI	pag.1
CAPITOLO 1	
1.1 INTEGRINE: STRUTTURA E ATTIVITA'	pag.9
1.2 INTEGRINE $\alpha v\beta 3$ e $\alpha 5\beta 1$ NEL PROCESSO NEOPLASTICO	pag.13
CAPITOLO 2	
2.1 -RGD- MIMETICI ETEROCHIRALI CONTENENTI –PRO- COME INIBITORI DI ADESIONE DI CELLULE TUMORALI.	pag.15
CAPITOLO 3	
3.1 c-PMRI A 13 TERMINI	pag.22
3.2 PMRI-CTP COME ANTAGONISTI DI INTEGRINE $\alpha v\beta 3$ e $\alpha 5\beta 1$.	pag.35
CAPITOLO 4	
4.1 COMPOSTI OPPIOIDI	pag.43
4.2 RECETTORI DEI PEPTIDI OPPIOIDI	pag.44
4.3 AGONISTI DEL RECETTORE OPPIOIDE μ	pag.47

4.4 PEPTIDOMIMETICI OPPIOIDI	pag.51
4.5 INTERAZIONE AGONISTA-RECETTORE OPPIOIDE	pag.52
4.6 MECCANISMO DI INTERAZIONE DI AGONISTI DEL RECETTORE OPPIOIDE μ	pag.53
4.7 COMPOSTI OPPIOIDI NON CONVENZIONALI	pag.54
 CAPITOLO 5-	
5.1 PENTAPEPTIDI CICLICI COME AGONISTI ATIPICI DEL RECETTORE OPPIOIDE μ	pag.58
5.2 SINTESI E CARATTERIZZAZIONE FARMACOLOGICA DEI CICLOPEPTIDI c[YpwFXaa].	pag.60
5.3 ANALISI CONFORMAZIONALE IN SOLUZIONE DI 3,7 E 8	pag.63
5.4 MOLECULAR DOCKING	pag.67
5.5 OTTIMIZZAZIONE ATTRAVERSO IL METODO IBRIDO QM/MM	pag.74
5.6 DISCUSSIONE	pag.76

CAPITOLO 6

6.1 SINTESI DI AGONISTI DEL RECETTORE H3: IMMETHRIDINE E IMMEPIP.

pag.84

CAPITOLO 7

PARTE SPERIMENTALE

pag.87

INTRODUZIONE

PEPTIDI E PEPTIDOMIMETICI

Una vasta serie di funzioni biologiche e fisiologiche viene controllata da peptidi o residui proteici minimali. Negli esseri umani residui peptidici entrano in gioco, ad esempio, nella regolazione del comportamento, più in particolare in fenomeni di ansia, stress, aggressività, termogenesi, termoregolazione, processi di apprendimento, dolore, capacità mnemoniche, regolazione alimentare e disturbi ad essa connessi, abuso di droghe e di alcol ecc.

Molte volte diversi peptidi risultano essere responsabili dell'attivazione della stessa funzione a livello fisiologico, ad esempio, l'attivazione dei segnali peptidergici che vanno ad aumentare lo stimolo della fame è ad opera dei seguenti peptidi: neuropeptide Y, ormone melanina (controlla), galanina, ormone della crescita, dinorfina, endorfina ecc.^{1,2} Al contrario, altri peptidi sono responsabili della diminuzione dello stimolo della fame: POMC, CART, neurotensina, corticotrofina, insulina, leptina, somatostatina ecc.³

La potenziale attività a livello biologico e farmacologico dei peptidi naturali ha un uso effettivo limitato in quanto è risaputa la loro scarsa biodisponibilità e la loro bassa stabilità in condizioni fisiologiche; proprio per questi motivi sono stati condotti innumerevoli studi per ottenere peptidi modificati (peptidomimetici) in grado di avere una maggiore resistenza in condizioni fisiologiche pur mantenendo la loro attività biologiche.^{4,5,6}

L'ottenimento di peptidomimetici risulta possibile tramite tecniche post-trasduzionali (verifica affermazione) o, più frequentemente, tramite processi di sintesi.

L'approccio iniziale alla costruzione di analoghi dei corrispettivi peptidi nativi può ragionevolmente partire da semplici modificazioni delle parti -N e -C terminali, dalla metilazione di -N e -C α o dalla sostituzione del singolo residuo aminoacidico con il corrispettivo di configurazione D.^{7,8,9}

¹ Levine, A.S.; Olszewski, P.K.; Billington, C.J.; Kotz, C.M. *Nutr.Neurosci.*, **2005**, 111.

² Cupples, W.A. *Am. J. Physiol.*, **2003**, 284, R1370.

³ Szekely, M.; Szelenyi, Z. *Curr. Prot. Pept. Sci.*, **2005**, 6, 327.

⁴ Hruby, V.J.; Matsunaga, T.O. In *Synthetic Peptides (2nd Edition)*, Grant, G.A. Ed.; Oxford University Press: New York, **2002**; pp.292-376.

⁵ Luthman, K.; Hacksell, U. In *Textbook of Drug Design and Discovery (3rd Edition)*, Krosggaard-Larsen, P.; Liljefors, T.; Madsen, U. Eds.; Taylor & Francis: London, **2002**; pp. 459-485.

⁶ Gentilucci, L. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2004**, 4, 19

⁷ Sasubilli, R.; Gutheil, W.G. *J. Comb. Chem.*, **2004**, 6, 911.

⁸ Sagan, S.; Karoyan, P.; Lequin, O.; Chassaing, G.; Lavielle, S. *Curr. Med. Chem.*, **2004**, 11, 2799.

⁹ Luthman, K.; Hacksell, U. In *Textbook of Drug Design and Discovery (3rd Edition)*, Krosggaard-Larsen, P.; Liljefors, T.; Madsen, U. Eds.; Taylor & Francis: London, **2002**; pp. 459-485.

Attraverso l'introduzione di un gruppo isosterico si possono sintetizzare diverse classi di mimetici^{10, 11,12}: peptoidi¹³, peptidi retro-inversi¹⁴, azapeptidi^{15,16}, peptidomimetici contenenti un'urea^{17,18} e peptidi/peptoidi sulfonamidici^{19,20} (Fig.1).

E' possibile poi ottenere ulteriori strutture modificate^{21,22} attraverso l'introduzione di residui inusuali come β -amino acidi²³, γ - and δ -aminoacidi²⁴ o aminoacidi sostituiti in α -o in β .^{25,26,27,28} (Fig. 1).

Considerevoli progressi sono stati compiuti nella realizzazione di molecole di dimensione ridotta, in grado di mimare elementi della struttura secondaria delle proteine (eliche, strands e turns). Queste molecole risultano utili poiché possono mimare in maniera efficace la superficie biotiva di proteine e , quindi, interferire nei processi fisiologici.

Deidroamminoacidi, aminoacidi ciclici^{29,30} e altri mimetici strutturalmente rigidi vengono utilizzati per la loro capacità di indurre turn o eliche³¹.

L'incorporazione di aminoacidi modificati in peptidi biologicamente attivi ne ha, generalmente, conferito una maggiore selettività ed una maggiore stabilità verso gli enzimi proteolitici^{32,33,34,35}

¹⁰ Felix, A.; Moroder, L.; Toniolo, C.; *Houben-Weyl, Methods in Organic chemistry, Vol. E 22c-d*; Goodman, M. Ed.; Thieme Verlag: Berlin, **2003**.

¹¹ Ahn, J.-M.; Boyle, N.A.; MacDonald, M.T.; Janda, K.D. *MiniRev. Med. Chem.*, **2002**, 2, 463.

¹² Guichard, G. In *Solid-Phase Synthesis*, Kates, S. A.; Albericio, F. Ed.; Dekker: New York, **2000**; pp. 649-703.

¹³ Horwell, D.C.; Howson, W.; Rees, D.C. *Drug Des. Discov.*, **1994**, 2, 63

¹⁴ Fletcher, M.D.; Campbell, M.M. *Chem. Rev.*, **1998**, 98, 763.

¹⁵ Gante J.; Krug M.; Lauterbach G.; Weitzel R.; Hiller W. *J. Pept.Sci.*, **1995**, 1, 201.

¹⁶ Zega, A. *Curr. Med. Chem.*, **2005**, 12, 589.

¹⁷ Bakshi, P.; Wolfe, M.S. *J. Med. Chem.*, **2004**, 47, 6485.

¹⁸ Boeijen, A.; Liskamp, R.M.J. *Eur. J. Org. Chem.*, **1999**, 9, 2127.

¹⁹ Brouwer, A.J.; Liskamp, R.M.J. *J. Org. Chem.*, **2004**, 69, 3662.

²⁰ Van Ameijde, J.; Liskamp, R.M.J. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 1103.

²¹ Cardillo, G.; Gentilucci, L.; Tolomelli, A. *Aldrich. Acta*, **2003**, 36, 39

²² Cardillo, G.; Fabbroni, S.; Gentilucci, L.; Perciaccante, R.; Tolomelli, A. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2004**, 15, 593.

²³ Lelais, G.; Seebach, D. *Biopolymers*, **2004**, 76, 206.

²⁴ Trabocchi, A.; Guarna, F.; Guarna, A. *Curr. Org. Chem.*, **2005**, 9, 1127.

²⁵ Cardillo, G.; Gentilucci, L.; Pericot Mohr, G. *Eur. J. Org. Chem.*, **2001**, 18, 3545.

²⁶ Cardillo, G.; Gentilucci, L.; DeMatteis, V. *J. Org. Chem.*, **2002**, 5957.

²⁷ Cardillo, G.; Gentilucci, L.; Tolomelli, A.; Tomasini, C. *Synlett*, **1999**, 11, 1727

²⁸ Cardillo, G.; Gentilucci, L.; Tolomelli, A. *Tetrahedron*, **1999**, 55, 15151.

²⁹ Maechling, S.; Norman, S.E.; McKendrick, J.E.; Basra, S.; Koeppner, K.; Blechert, S. *Tetrahedron Lett.*, **2006**, 47, 189.

³⁰ Labudda-Dawidowska, O.; Wierzba, T.H.; Prah, A.; Kowalczyk, W.; Gawinski, L.; Plackova, M.; Slaninova, J.; Lammek, B. *J. Med. Chem.*, **2005**, 48, 8055.

³¹ Ramanathan, S.K.; Keeler, J.; Lee, H.-L.; Reddy, D.S.; Lushington, G.; Aube, J. *Org. Lett.*, **2005**, 7, 1059.

³² Reissmann, S.; Imhof, D. *Curr. Med. Chem.*, **2004**, 11, 2823.

³³ Janecka, A.; Kruszynski, R. *Curr. Med. Chem.*, **2005**, 2, 471.

³⁴ Che, Y.; Marshall, G.R. *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 111.

³⁵ Ballet, S.; Frycia, A.; Piron, J.; Chung, N.N.; Schiller, K.; Kosson, P.; Lipkowski, A.W.; Tourwe, D. *J. Pept. Res.*, **2005**, 66, 222.

Altro aspetto molto interessante risulta l'ottenimento di strutture conformazionalmente definite che conducano ad una più semplice correlazione tra conformazione e attività biologica: ad esempio l'utilizzo in una sequenza peptidica di mimetici di γ - o β -turn (**Fig. 1**) può rendere possibile l'identificazione della conformazione bioattiva del peptide nativo^{36,37,38}

In questo tipo di ricerca va tenuto in considerazione il fatto che la mancata attività biologica di un peptidomimetico non risulta fondamentale nella determinazione degli elementi strutturali che costituiscono la conformazione bioattiva del peptide nativo³⁹, ad es se un β turn mimetico non mostra attività le cause di ciò possono essere dovute a differenze nell'orientazione delle catene laterali, fattori elettronici o ad un binding preferenziale verso un altro target farmacologico (in test su sistemi *in vivo*).

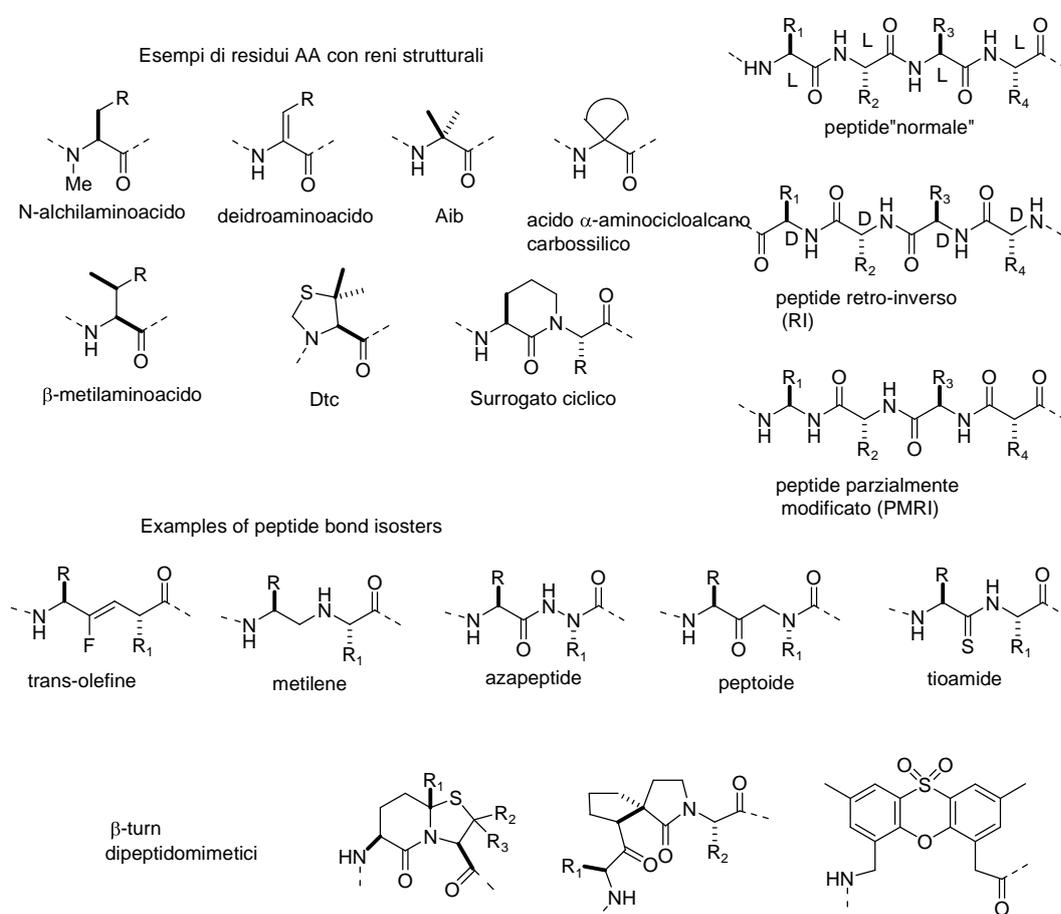


Fig.1⁴⁰ Esempi di possibili modificazioni strutturali

³⁶ Cardillo, G.; Gentilucci, L.; Tolomelli, A.; Qasem, A. R.; Spampinato, S.; Calienni, M. *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, *1*, 3010.

³⁷ Belvisi, L.; Colombo, L.; Manzoni, L.; Potenza, D.; Scolastico, C. *Synlett.*, **2004**, *9*, 1449.

³⁸ Ndungu, J.M.; Cain, J.P.; Davis, P.; Ma, S.-W.; Vanderah, T.W.; Lai, J.; Porreca, F.; Hruby, V.J. *Tetrahedron Lett.*, **2006**, *47*, 2233.

³⁹ Gentilucci, L.; Tolomelli, A. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2004**, *4*, 105.

⁴⁰ L.Gentilucci, A.Tolomelli, F.Squassabia; *Curr. Med. Chem.*, **2006**, *Vol. 13(20)*, 2449-2466

La costruzione di peptidomimetici di tipo ciclico, tramite la semplice condensazione dell'estremità –N e –C o tramite la connessione delle catene laterali funzionalizzate, risulta una valida opzione per l'ottenimento di derivati con una maggiore stabilità verso l'idrolisi enzimatica^{41,42}. Peptidi ciclici sono stati largamente utilizzati per ottenere strutture conformazionalmente definite (scaffold, templati) in cui i gruppi funzionali risultano essere orientati in maniera opportuna per un'ottimale interazione con i target farmacologici^{43,44,45}.

Un'altra possibilità di costruzione di peptidomimetici è data dagli zuccheri amminoacidici, strutture cicliche che possiedono un gruppo amino e carbossilico; essi danno l'opportunità di ottenere strutture conformazionalmente definite. Ad es zuccheri amminoacidici sono stati utilizzati in sequenze peptidiche attive, come antagonisti di integrine contenenti RGD, somatostatina ed encefalite^{46,47}.

Anche monosaccaridi e oligosaccaridi ciclici sono stati utilizzati come scaffolds per dare vita a nuovi peptide e peptidomimetici, includendo nuovi glicopeptidi di sintesi, zuccheri-amminoacidici, carboidrati come scaffold per peptidomimetici ciclici^{48,49}, peptidi ciclodestrine funzionalizzate, carboproteine (mimetici di proteine basati su carboidrati) ecc.

Queste molecole ibride hanno proprietà che mischiano le caratteristiche strutturali dei carboidrati con i diversi gruppi funzionali dei peptidi⁵⁰.

Modificazioni strutturali specifiche nella struttura peptidica risultano essere utili per prolungare e/o aumentare l'attività biologica del composto sul sito attivo del target^{51,52,53}.

La permeabilità alle membrane risulta un significativo ostacolo in tal senso: se è possibile evitare il problema per la barriera intestinale attraverso una somministrazione non orale dei farmaci, permane invece la difficoltà di superamento per la barriera emato-encefalica (BBB).

⁴¹ Tugyi, R.; Mezo, G.; Fellingner, E.; Andreu, D.; Hudecz, F. *J. Pept.Sci.*, **2005**, *11*, 642.

⁴² Tavassoli, A.; Naumann, T.A.; Benkovic, S.J. *In Nucleic Acids and Molecular Biology, Vol. 16 (Homing Endonucleases and Inteins)*, Belfort, M.; Stoddard, B.L.; Wood, D.W.; Derbyshire, V.Eds.; Springer-Verlag: New York, **2005**, pp. 293-305.

⁴³ Kessler, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1982**, *21*, 512.

⁴⁴ Glenn, M.P.; Kelso, M.J.; Tyndall, J.D.A.; Fairlie, D. P. *J. Am.Chem. Soc.*, **2002**, *125*, 640.

⁴⁵ Li, P.; Roller, P.P.; Xu, J. *Curr. Org. Chem.*, **2002**, *6*, 411.

⁴⁶ Lohof, E.; Burkhart, F.; Born, M.A.; Planker, E.; Kessler, H. *In Advances in Amino Acid Mimetics and Peptidomimetics*, Abell, A.Ed.; Lightning Source: La Vergne, **1999**; Vol. 2, pp. 263-292.

⁴⁷ Graf von Roedern, E.; Lohof, E.; Hessler, G.; Hoffmann, H.; Kessler, H. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 10156.

⁴⁸ Gruner, S.A.W.; Locardi, E.; Lohof, E.; Kessler H. *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 491.

⁴⁹ Hirschmann, R.; Nicolaou, K.C.; Pietranico, S.; Leahy, E.M.; Salvino, J.; Arison, B.; Cichy, B.M.A.; Spoor, P.G.; Shakespeare, W.C.; Sprengler, P.A.; Hamley, P.; Smith III, A.B.; Reisine, T.; Raynor, K.; Maechler, L.; Donaldson, C.; Vale, W.; Freidinger, R.M.; Cascieri, M.R.; Strader, C.D. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 12550.

⁵⁰ Jensen, K.J.; Brask, J. *Biopolymers*, **2005**, *80*, 747.

⁵¹ Cardillo, G.; Gentilucci, L.; Tolomelli, A.; Calienni, M.; Qasem, A.R.; Spampinato, S. *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, *1*, 1498.

⁵² Spampinato, S.; Qasem, A.R.; Calienni, M.; Murari, G.; Gentilucci, L.; Tolomelli, A.; Cardillo, G. *Eur. J. Pharm.*, **2003**, *469*, 89.

⁵³ Witt, K.A.; Gillespie, T.J.; Huber, J.D.; Egleton, R.D.; Davis, T.P. *Peptides*, **2001**, *22*, 2329.

I peptidi nel sistema circolatorio sono generalmente eliminati dal sistema renale ed epato-biliare, l'eliminazione dipende dalle dimensioni e la lipoficità dei composti in questione; il fatto di non essere in grado di superare la BBB riduce il tempo in cui essi sono in grado di raggiungere il recettore. Modificando la struttura peptidica (lipidizzazione del peptide) attraverso il mascheramento di gruppi polari o la riduzione dei potenziali responsabili di legami H si possono ridurre le problematiche citate in precedenza e, in generale, migliorare la biodisponibilità di questi composti. Un altro metodo per aumentare la possibilità di attraversamento della BBB è la glicosilazione (**Fig. 2**)⁵⁴: si va ad ancorare alla struttura peptidica una molecola di glucosio, questo permette di sfruttare i trasportatori transmembrana GLUT-1 o GLUT-2, il processo di endocitosi e altri meccanismi di trasporto.

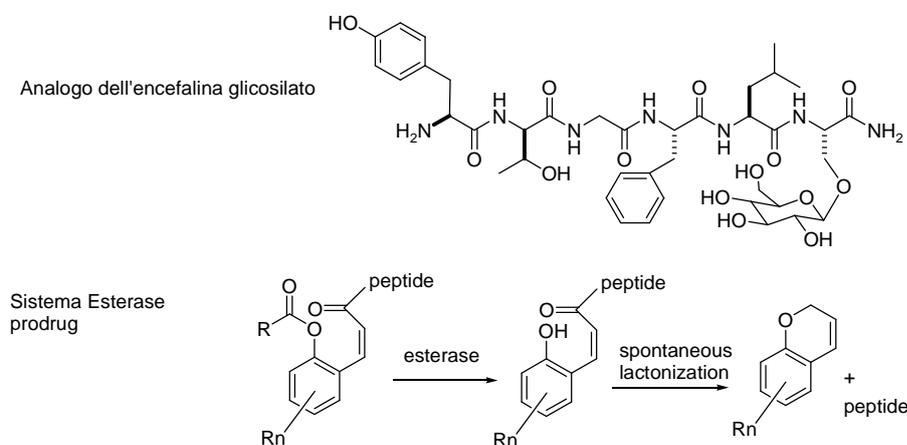


Fig.2 Esempi di Glicosilazione e sistema prodrug

L'approccio prodrug è basato sull'incorporazione di una molecola farmacologicamente attiva ad un trasportatore o ad una molecola lipofila che viene rimossa nei pressi o direttamente sul sito attivo del target. Gli esteri, in generale, si sono mostrati utili a questo scopo proprio per l'abbondanza di esterasi endogene nel sistema nervoso centrale (CNS) che portano, attraverso la loro azione, al successivo rilascio del composto attivo. Il sistema prodrug-esterase cumarinico ne è un esempio rilevante (**Fig.2**)⁵⁵.

Nelle operazioni di drug-design su peptidi, si utilizza spesso la **strategia dei vettori**, ovvero si legano molecole (carrier) che normalmente vengono trasportate attraverso la BBB, alla molecola peptidica. E' utile sottolineare a questo punto, che la maggioranza dei "trucchi" indicati in precedenza, per aumentare l'attività e la stabilità di un peptide (ad es. la sostituzione

⁵⁴ Witt, K.A.; Gillespie, T.J.; Huber, J.D.; Egleton, R.D.; Davis, T.P. *Peptides*, **2001**, 22, 2329.

⁵⁵ Wang, B.; Shan, D.; Wang, W.; Zhang, H.; Gudmundsson, O.; Borchardt, R.T. *Methods Mol. Med.*, **1999**, 23, 71.

al -N e al -C, l'introduzione di D-aminoacidi, la ciclizzazione e la glicosilazione) si osservano in natura in composti peptidici di origine batterica o marina⁵⁶

Durante il mio periodo di ricerca mi sono occupato della costruzione di molecole peptidomimetiche biologicamente attive (inibitori di integrine, agonisti oppioidi) e si è fatto ricorso a diversi tipi di modificazioni strutturali:

-costruzione di composti ciclici peptidici.

-costruzione e ciclizzazione di composti PMRI (peptidi modificati parzialmente retroinversi) a 13 termini.

-utilizzo di aminoacidi della serie D e di residui non-amminoacidici.

L'utilizzo della ciclizzazione di sequenze lineari peptidiche (**Fig.3**) ha riguardato in particolare la costruzione di nuovi agonisti del recettore oppioide μ . In queste sequenze sono stati inoltre utilizzati aminoacidi della serie D e aminoacidi non usuali a struttura rigida (Aib), β amminoacidi (β -alanina), γ -amminoacidi (GABA):

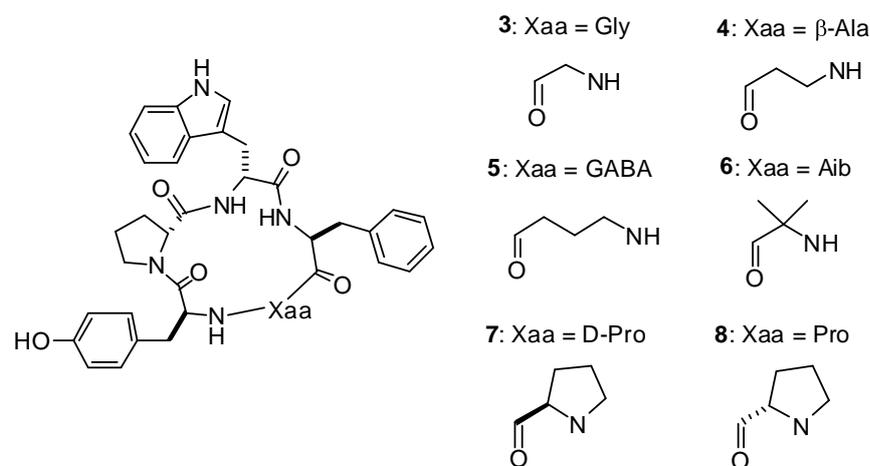


Fig.3

Sono stati poi costruiti composti ciclotetrapeptidi⁵⁷(CTP) parzialmente modificati retroinversi^{58,59} (PMRI) a 13 termini, questi cicli sono strutture nuove, costituite da una diammina, un diacido e due residui amminoacidici. In generale un peptide retro-inverso (RI) è l'isomero di un peptide "normale" in cui la direzione della sequenza amminoacidica è rovesciata e gli aminoacidi presentano una stereochimica opposta (vd **Fig.1**), in maniera da

⁵⁶ Shioiri, T.; Hamada, Y. *Synlett*, **2001**, 184.

⁵⁷ Kim, K.-J.; Park, S.-W.; Yoon, S.S. *J. Kor. Chem. Soc.*, **2000**, *44*, 286-289.

⁵⁸ Fletcher, M. D.; Campbell, M. M. *Chem. Rev.*, **1998**, *98*, 763;

⁵⁹ Chorev, M. *Biopolymers*, **2005**, *80*, 67.

poter piazzare i gruppi R nello stessa parte della molecola. Nei peptidi parzialmente modificati retro inverse (PMRI) questa modificazione riguarda una parte dei residui della struttura, mentre i rimanenti sono inalterati. Inoltre in un peptide modificato parzialmente retroinverso il legame retro.inverso può considerarsi come un effettivo surrogato di un legame peptidico reale. La presenza di questa modificazione porta ovviamente ad un incremento della resistenza all'idrolisi enzimatica di questo composto.

In generale i CTP (ciclotetrapeptidi, 14 termini) costituiscono il più piccolo sistema in grado di mimare tutti i tipi di β - e γ -turn e sono presenti in vari composti naturali; il loro utilizzo in chimica farmaceutica è limitato dalle difficoltà che si incontrano a livello sintetico e dalla scarsa definizione conformazionale in ambiente polare.^{60,61,62,63,64,65}

Attraverso l'incorporazione nella sequenza tetrapeptidica di β^3 - o β^2 -aminoacidi si riesce ad ottenere una maggiore stabilità per tutte le possibili strutture secondarie(β -, γ -turn , singolo loop di α -elica).^{66,67,68,69} I composti ciclici (CTPs-PMRI) a 13 termini sintetizzati (**Fig.4**), contengono una 1,2-diammina come mimetico di un β -amminoacido e l'acido malonico come surrogato della Gly; a livello sintetico risultano facilmente ottenibili e risultano di sicuro interesse per applicazioni in chimica farmaceutica e in biochimica come scaffolds topologicamente definiti. Inoltre, il loro basso peso molecolare , la maggior lipofilità rispetto ai CTP e la presenza di legami modificati indicano un sicuro miglioramento a livello di biodisponibilità e di profilo

ADMET.⁷⁰

⁶⁰ Cavelier-Frontin, F.; Pe`pe, G.; Verducci, J.; Siri, D.; Jacquier, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8885.

⁶¹) Shute, R. E.; Kawai, M.; Rich, D.H. *Tetrahedron* **1998**, *44*, 685

⁶² Loiseau, N.; Gomis, J.-M.; Santolini, J.; Delaforge, M.; Andre, F. *Biopolymers* **2003**, *69*, 363.

⁶³) Kawai, M.; Jasensky, R. D.; Rich, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 4456

⁶⁴ Kawai, M.; Pottorf, R. S.; Rich, D. H. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 2409

⁶⁵ Mascagni, P.; Pope, M.; Gibbons, W. A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, *113*, 10.

⁶⁶ Schumann, F.; Muller, A.; Koksche, M.; Muller, G.; Sewald, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12009.

⁶⁷ Glenn, M. P.; Kelso, M. J.; Tyndall, J. D. A.; Fairlie, D. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 640, and references herein.

⁶⁸ . Norgren, A. S.; Buttner, F.; Prabpai, S.; Kongsaree, P.; Arvidsson, P. I. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 6814.

⁶⁹ Maulucci, N.; Chini, M. G.; Di Micco, S.; Izzo, I.; Cafaro, E.; Russo, A.; Gallinari, P.; Paolini, C.; Nardi, M. C.; Casapullo, A.; Riccio, R.; Bifulco, G.; De Riccardis, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3007.

⁷⁰ a) V. J. Hruby, R. S. Agnes, *Biopolymers* **2000**, *51*, 391–410; b) for a recent review on the use of peptidomimetics in biochemistry, medicine, pharmacology, etc., see: L. Gentilucci, A. Tolomelli, F. Squassabia, *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 2449–2466.

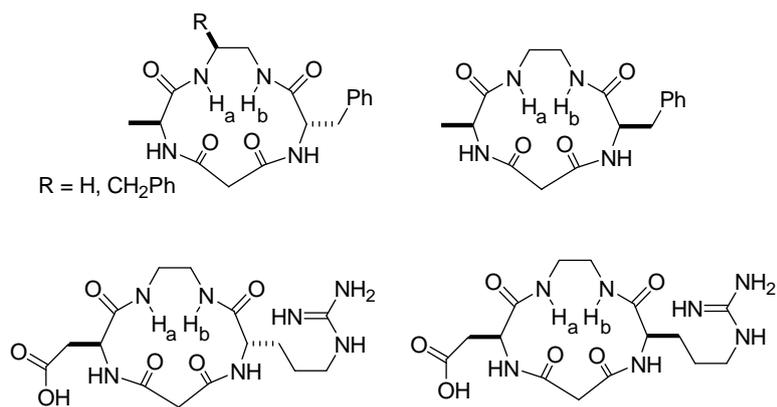


Fig.4 CTP-PMRI e RGD mimetici CTP-PMRI

Le caratteristiche strutturali dei CTP-PMRI a 13 termini sono state sfruttate nella progettazione di nuovi inibitori di integrine -RGD- (Arg-Gly-Asp) mimetici.

Sempre nel campo della sintesi di nuovi inibitori di integrine sono state costruite molecole lineari del tipo RPD (Arg-Pro-Asp), in cui, per modificazioni strutturali successive, sono stati utilizzati aminoacidi della serie D e aminoacidi non usuali come GABA, β -Ala, Ava e residui non aminoacidici (**Fig.5**)



Fig.5 Struttura -RGD mimetica basata sulla sequenza -RPD-

CAPITOLO 1

1.1 INTEGRINE: STRUTTURA ED ATTIVITÀ

Le integrine sono glicoproteine della membrana cellulare in grado di legare elementi della matrice extracellulare, in particolare le fibronectine. Esse svolgono un ruolo nel collegamento della cellula con la matrice extracellulare (ECM) e nella trasduzione del segnale dalla ECM alla cellula. A livello strutturale sono eterodimeri obbligati contenenti due distinte catene, chiamate subunità α e β . Sono state individuate circa 18 subunità α ed 8 β ; queste subunità possono combinarsi tra loro e generare 24 tipi diversi di integrine. Le subunità dell'integrina penetrano nella membrana plasmatica e in genere hanno domini citoplasmici molto corti di circa 40-70 aminoacidi. L'eccezione è la subunità beta-4 che ha un dominio citoplasmico di 1088 aminoacidi, uno dei più estesi domini citoplasmici delle proteine di membrana. Fuori dalla membrana plasmatica, le catene α e β sporgono per una lunghezza di circa 23 nm, gli ultimi 5 dei quali - grazie alla terminazione formata dall' NH_2 di ciascuna catena - forma una regione adibita ai legami per la matrice extracellulare (ECM). La massa molecolare delle subunità dell'integrine possono variare da 90 Kda a 160 Kda. Le subunità β hanno 4 sequenze ripetute ricche di cisteina.

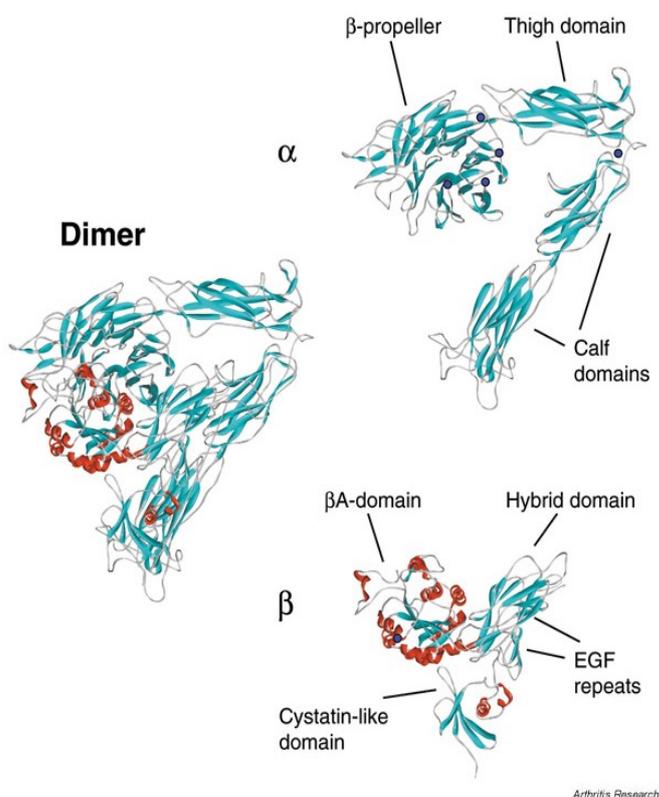


Fig.1 Strutture secondarie delle subunità α e β

La **subunità α** delle integrine è formata in prevalenza da foglietti β e presenta siti in cui sono alloggiati cationi bivalenti come Ca^{2+} , Mn^{2+} e Mg^{2+} . La **subunità β** è invece formata in prevalenza da α eliche e foglietti β legati fra loro da legami di tipo non-covalente.

A livello intracellulare si è visto come le molecole integriniche manchino di attività enzimatica diretta, sia nella subunità α che nella β ; quest'ultima subunità costituisce un elemento indispensabile per l'attivazione dell'enzima *focal adhesion kinase* (FAK, una proteina tirosin chinasi). In seguito alla formazione del complesso integrina-ligando, vi è probabilmente un cambio conformazionale, che induce l'attivazione dell'enzima FAK mediante un meccanismo di autofosforilazione.

Anche le proteine Src, coinvolte in questa via di segnalazione, fosforilano FAK su altri siti.⁷¹

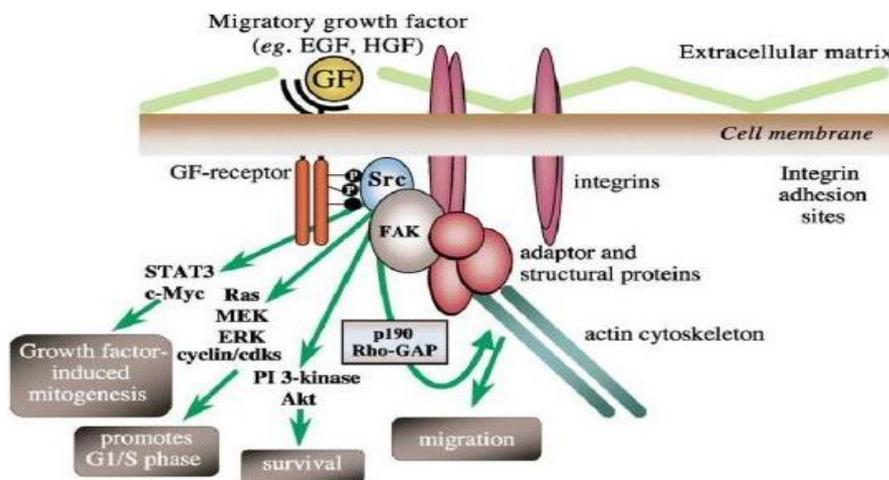


Fig. 2 Modello della segnalazione citoplasmatica

La fosforilazione in tirosina di FAK crea siti di legame per domini SH2 di altre molecole di segnalazione a valle, come Grb2-SOS; questa molecola porta all'attivazione di Ras legandosi ad una sequenza contenente fosfotirosina, tramite il dominio SH2 di Grb2 ed effettuando lo scambio del nucleotide guanilico legato a Ras.

Ras-GDP (forma inattiva) diventa Ras-GTP (forma attiva), la funzione di Ras è quella di accoppiare l'attività delle integrine, all'attivazione della via di segnalazione della MAP-chinasi ERK (*mitogen-activated protein kinase ERK*: una famiglia di MAP-chinasi). Ras-GTP può interagire con proteine effettrici, come la proteina chinasi Raf che fosforila e attiva un'altra proteina chinasi: la proteina MEK, che a sua volta attiva ERK fosforilando residui

⁷¹ M. Frame, 2002, *Src in Cancer*, Biochim Biophys Acta, 114-130

sia di treonina che di tirosina. ERK a sua volta raggiungerà il nucleo regolando, tramite fosforilazione, diversi fattori di trascrizione.

Il dominio extracellulare riconosce selettivamente sequenze amminoacidiche del ligando naturale, come ad esempio la sequenza RGD (Arg-Gly-Asp) per la fibronectina.

Le integrine, generalmente hanno la caratteristica di avere una bassa affinità per i loro ligandi; la costante di dissociazione K_D , oscilla tra 10^{-6} e 10^{-8} moli/litro; mentre la K_D , di un recettore ormonale oscilla tra 10^{-9} e 10^{-11} M. Queste singole e deboli interazioni, tipiche delle integrine, devono essere moltiplicate per le centinaia o le migliaia di molecole integriniche poste all'esterno di una cellula; questo permette ad una cellula di rimanere saldamente ancorata alla matrice stessa, formando complessi altamente organizzati detti “*adesioni focali*” oppure permette la formazione di “*emidesmosomi*” che connettono i filamenti intermedi alla lamina basale.

Inoltre, in situazioni come le migrazioni cellulari, è fondamentale che le cellule siano in grado di formare e rompere contatti specifici con la matrice extracellulare e ciò risulta più semplice se le singole interazioni sono più deboli.

Tab. 1 Recettori integrinici

Integrina	Tipi di cellule che presentano le integrine	Partner di legame	Es. di malattie che comportano adesione mediata da integrine	Sequenza di riconoscimento del peptide inibitore
α IIb β 3	Piastrine	Fibrinogeno, fattore di von Willebrand	Ricomparsa di trombi (ristesosi)	-R-G-D- -Arg-Gly-Asp-
α v β 3	Cellule endoteliali Cellule muscolari lisce	Fibronectina Vitronectina	Angiogenesi Retinopatia diabetica Ristenosi	-R-G-D- -Arg-Gly-Asp-
α 4 β 1	Vari globuli bianchi Neutrofili	Fibronectina, V-Cam-1	Malattie infiammatorie (asma, artrite). Danni da riperfusione.	-L-D-V- -Leu-Asp-Val-
α 5 β 1	Cellule endoteliali	Fibronectina	Angiogenesi	-RGD-

1.2 INTEGRINE $\alpha v\beta 3$ e $\alpha 5\beta 1$ NEL PROCESSO NEOPLASTICO

Recentemente, una grande parte dell'interesse della ricerca in campo oncologico ha riguardato il funzionamento delle integrine, soprattutto del tipo $\alpha v\beta 3$ e $\alpha 5\beta 1$, come fattori di adesione, in relazione al comportamento delle cellule neoplastiche invasive e metastatizzanti.

La migrazione cellulare è una componente peculiare del fenomeno di invasione tumorale; quindi i meccanismi che regolano l'affinità delle integrine potrebbero essere rilevanti per la conoscenza del ruolo delle integrine nella tumorigenesi.

Se a queste conoscenze aggiungiamo altre scoperte riguardo alla modalità con cui i segnali mediati dalle integrine possono regolare l'espressione di alcuni geni ed influenzare il ciclo cellulare, allora possiamo comprendere, come il ruolo delle integrine nel processo neoplastico, non si esaurisca semplicemente in eventi di adesione cellulare, ma potrebbe coinvolgere anche eventi più complessi, come la regolazione della crescita e la differenziazione stessa delle cellule neoplastiche. Un aspetto critico del comportamento invasivo e metastatico, coinvolge interazioni adesive di cellule tumorali con altre cellule o con la matrice extracellulare; tali interazioni si realizzano quando le cellule migrano localmente dalla massa tumorale primitiva, o quando cellule neoplastiche circolanti aderiscono alle cellule dell'endotelio vascolare o alla membrana basale durante la disseminazione metastatica. E' chiaro che molte di queste interazioni adesive delle cellule neoplastiche sono mediate dai membri della superfamiglia delle integrine.

Negli ultimi tempi si è spinti a pensare che il ruolo delle integrine nella fisiopatologia di vari tumori sia probabilmente molto più complesso, e solo di recente si stia cominciando a prenderne atto. Anche se i primi studi hanno evidenziato un ruolo importante delle integrine nel fenomeno metastatico dei tumori, recenti studi testimoniano l'importanza di queste molecole nel fenomeno cancerogenetico.

Per prima cosa le integrine mediano l'adesione stabile e/o la migrazione di cellule verso componenti della matrice extracellulare; cambiamenti del loro livello di espressione o funzione potrebbero contribuire all'invasione neoplastica. Inoltre, le integrine trasmettono segnali intracellulari che regolano il differenziamento e la proliferazione cellulare, per cui cambiamenti nell'espressione di queste molecole potrebbero contribuire all'alterazione della differenziazione e della proliferazione delle cellule neoplastiche.

Brooks e al. hanno riportato come una serie di ligandi a basso peso molecolare siano in grado di bloccare il fenomeno dell'angiogenesi riconoscendo selettivamente le integrine $\alpha v\beta 3$ e $\alpha 5\beta 1$ e ,quindi, vadano a sopprimere la crescita tumorale⁷² Nelle ultime due decadi si è posta principalmente l'attenzione su $\alpha v\beta 3$ nella ricerca di nuovi farmaci antitumorali⁷³ e sono stati ottenuti significativi risultati : ad es. il ciclo peptide c(-RGDf[NMe]V-), meglio conosciuto come Cilengitide è attualmente in fase II di sperimentazione clinica come cura contro il glioblastoma⁷⁴⁷⁵. Tuttavia recentemente è stato scoperto da esperimenti di ingegneria genetica e da rilevanzze farmacologiche che l'integrina $\alpha v\beta 3$ non sempre si mostra in grado di regolare il processo d'angiogenesi a differenza dell'integrina $\alpha 5\beta 1$ che, senza dubbio, è da considerarsi un fattore proangiogenesi⁷⁶⁷⁷⁷⁸.

⁷² Brooks, P. C.; Clark, R. A.; Cheresch, D. A. *Science* **1994**, *264*, 569-571.

⁷³ Shimaoka, M.; Springer, T. A. *Nat. Rev.* **2003**, *2*, 703-716.

⁷⁴ Burke, P. A.; DeNardo, S. J.; Miers, L. A.; Lamborn, K. R.;Matzku, S.; DeNardo, G. L. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 4263-4272.

⁷⁵ Dechantsreiter, M. A.; Planker, E.; Matha", B.; Lohof, E.; Ho"lzemann,G.; Jonczyk, A.; Goodman, S. L.; Kessler, H. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3033-3040.

⁷⁶ Reynolds, L. E.; Wyder, L.; Lively, J. C.; Taverna, D.; Robinson,S. D.; Huang, X.; Sheppard, D.; Hynes, R. O.; Hodivala-Dikle,K. M. *Nat. Med.* **2002**, *8*, 27-34

⁷⁷ Hynes, R. O. *Nat. Med.* **2002**, *8*, 918-921.

⁷⁸ George, E. L.; Georges-Labouesse, E. N.; Patel-King, R. S.;Rayburn, H.; Hynes, R. O. *Development* **1993**, *119*, 1079-1091.

CAPITOLO 2

2.1 -RGD- mimetici eterochirali contenenti Pro come inibitori dell'adesione di cellule tumorali.

Il basso peso molecolare e l'alta biodisponibilità sono caratteristiche fondamentali per lo sviluppo di molecole che possano essere prese in considerazione come farmaci^{79, 80} così la ricerca di antagonisti delle integrine partendo da strutture cicliche peptidiche grandi si è indirizzata verso peptidomimetici^{9,10} o analoghi non peptidici strutturalmente minimali, tra questi sono identificabili numerosi composti attivi portati in fase clinica⁸¹.

In accordo con queste considerazioni si è deciso di progettare di o tripeptidi minimali analoghi di -RGD- con una intrinseca tendenza ad adottare conformazioni secondarie definite compatibili con i requisiti per un' interazione ottimale ligando-recettore. Studi approfonditi di SAR, Molecular Modeling , Docking^{9,82} hanno evidenziato che una determinata distanza tra il gruppo guanidinico e il gruppo carbossilico sia fondamentale per raggiungere un legame selettivo verso $\alpha\beta 3$ rispetto alle altre integrine ; in diversi casi si è visto che la conformazione bioattiva abbia un γ -turn centrato sulla Gly.^{9,83,84}

E' stata quindi sintetizzata e caratterizzata farmacologicamente una mini-library di -RGD-mimetici contenenti la sequenza eterochirale Xaa-D-Pro-Yaa, dove Xaa è l' Arg o un mimetico dell'Arg e Yaa è un derivato dell'Asp. Le sequenze eterochirali contenenti l'aminoacido Pro sono considerate sequenze privilegiate nell'induzione di conformazioni ripiegate come β e γ turns.^{85,86}

Inoltre è stato rilevato che anelli a 10 o 7 termini definiti da un legame-H si formano, in dipendenza dal solvente, in prevalenza l'uno rispetto all'altro in base alla presenza di un legame amidico precedente la Pro di tipo trans rispetto al cis⁸⁷ e/o in base alla natura e all'ingombro sterico degli aminoacidi che precedono o seguono la Pro.^{88,89}

⁷⁹ Henry, C.; Moitessier, N.; Chapleur, Y. *Mini Rev. Med. Chem.* **2002**, *2*, 531

⁸⁰ Cacciari, B.; Spallato, G. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 51.

⁸¹ Gentilucci, L.; Tolomelli, A.; Squassabia, F. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 2449.

⁸² Marinelli, L.; Lavecchia, A.; Gottschalk, K.-E.; Novellino, E.; Kessler, H. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4393

⁸³ Haubner, R.; Finsinger, D.; Kessler, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1374

⁸⁴ Haubner, R.; Gratias, R.; Diefenbach, B.; Goodman, S.L.; Jonczyk, A.; Kessler, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7461.

⁸⁵ Venkatraman, J.; Shankaramma, S. C.; Balaram, P. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3131.

⁸⁶ Rai, R.; Raghothama, S.; Balaram, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2675.

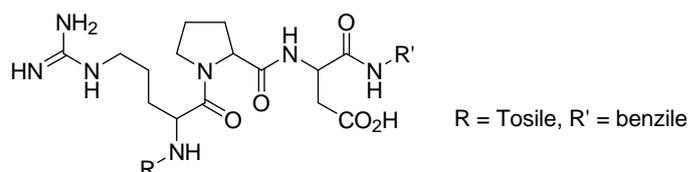
⁸⁷ Ishimoto, B.; Tonan, K.; Ikawa, S. *Spectrochim. Acta, Part A*, **2000**, *56*, 201.

⁸⁸ Jin, Y.; Tonan, V.; Ikawa, S. *Spectrochim. Acta, Part A*, **2002**, *58*, 2795.

⁸⁹ Chin, W.; Mons, M.; Dognon, J. P.; Piuze, F.; Tardivel, B.; Dimicoli, I. *Chem. Phys.* **2004**, *6*, 2700.

E' stata sintetizzata su fase solida (SPPS) una library preliminare (Fig.3)⁹⁰ di -RpD-con differenti gruppi⁹¹ terminali lipofilici ai residui finale -N e -C, che molto spesso si sono dimostrati cruciali per l'alta affinità e elettività recettoriale^{9,10}.

Nell'introduzione di questi gruppi, l'N dell'Asp è stato collegato a differenti acil o tosil derivati, mentre il cleavage del peptide dalla resina è stato condotto per amminolisi con differenti ammine alifatiche e aromatiche. (vd.**Schema 1**)⁹²



R = benzoile, pentanoile, fenilacetile, pivaloile, tostile
R' = propile, benzile, OCH₂Ph, cicloesile, t-Butile

Fig.3 Struttura -RpD-

La valutazione della potenziale attività come inibitori dell'integrina $\alpha v \beta 3$ è stata fatta testando l'abilità di questi composti nell'inibizione dell'adesione di una linea cellulare che esprime selettivamente il recettore in questione, SK-MEL 24 (cellule di melanoma umano), nei confronti del ligando naturale Fibronectina⁹³.

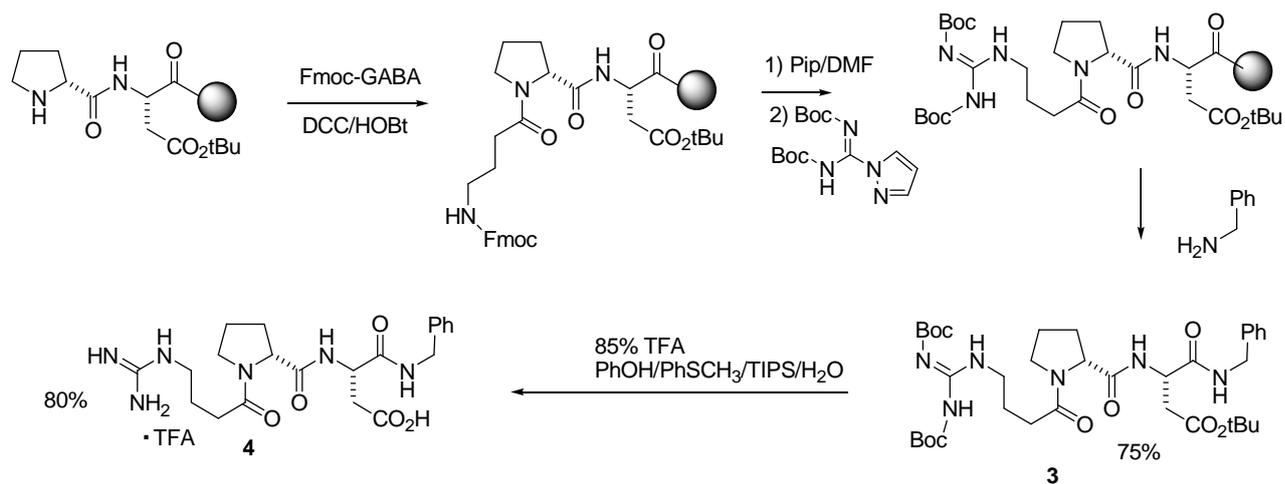
Tra i composti sintetizzati l'unico attivo risulta essere **1**, IC₅₀ di 1.5 10⁻⁷M (Table 2), il composto **2** contenente una L-Pro mostra un'attività molto inferiore. Inoltre risulta non inaspettata la maggior attività di composti aventi il gruppo benzilico vicino all'Asp rispetto ad altri aventi gruppi alchilici.

⁹⁰ Kates, S. A.; Albericio, F., Eds; Solid-Phase Synthesis; Dekker: New York, **2001**; pp 1–826.

⁹¹ Gurrath, M.; Muller, G.; Kessler, H.; Aumailley, M.; Timpl, R. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *210*, 911.

⁹² Greathouse, D. V.; Goforth, R. L.; Crawford, T.; van der Wel, P. C. A.; Killian, J. A. *J. Peptide Res.* **2001**, *57*, 519.

⁹³ Caltabiano, S.; Hum, W. T.; Attwell, G. J.; Gralnick, D.N.; Budman, L. J.; Cannistraci, A. M.; Bex, F. J. *Biochem. Pharm.* **1999**, *58*, 1567.



Scheme 1

Benzil carbammati, fenil sulfonammidi o altri gruppi simili adiacenti al residuo acido sono stati già utilizzati con benefici in termini di attività farmacologica nella costruzione di antagonisti di integrine.^{9,10}

D'altra parte la presenza di sostituenti aromatici in prossimità di Arg dà risultati contrastanti e, in generale, sembra non essere necessaria per ottenere una buona affinità^{9,10}

Basandoci su queste rilevanzze si è deciso, nella ricerca di un aumento dell'attività biologica, di diminuire il peso molecolare e la dimensione rimuovendo la terminazione -N-Tosile. Inoltre è stata modificata la distanza tra il -C terminale del residuo carbossilico e quello di -N-terminale del residuo guanidinico. E' stata quindi sintetizzata una seconda minilibrary di peptidi basati sulla struttura **1** seguendo la metodologia riportata nello **schema 1** per il composto **4**.

Il peptide è stato ottenuto facilmente per sintesi su fase solida, utilizzando la resina Wang e aminoacidi Fmoc protetti, DCC e HOBt come reagenti di coupling in 9/1 DCM/DMF⁹⁴.

Il cleavage dello Fmoc è stato condotto con il 20% di Piperidina in DMF.

L'introduzione del gruppo guanidinico su GABA-D-Pro-Asp è stato fatto tramite il trattamento con N,N0-di-Boc-1H-pyrazole-1-carboxamide,⁹⁵

Il peptide completamente protetto è stato sbloccato per aminolisi dalla resina con Benzilammina⁹⁶. Dopo la purificazione del risultante **4** per flash cromatografia su silica gel (eluente EtOAc/MeOH 98:2), si sono sbloccati i gruppi protettori delle catene laterali attraverso una miscela di TFA e vari scavengers. La purificazione di **4** tramite RP-HPLC fa ottenere il composto finale (80%), puro al 96% (analisi con RP-HPLC/ES-MS).

⁹⁴ Kates, S. A.; Albericio, F., Eds; *Solid-Phase Synthesis*; Dekker: New York, 2001; pp 1–826.

⁹⁵ Peyman, A.; Wehner, V.; Knolle, J.; Stilz, H. U.; Breipohl, G.; Scheunemann, K. H.; Carniato, D.; Ruxer, J. M.; Gourvest, J. F.; Gadek, T. R.; Bodary, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 179.

⁹⁶ Greathouse, D. V.; Goforth, R. L.; Crawford, T.; van der Wel, P. C. A.; Killian, J. A. *J. Peptide Res.* **2001**, *57*, 519.

In questo modo sono stati riportati tutti gli -RpD-analoghi riportati in **Tab.2**.

La loro efficacia come antagonisti dell'integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ è stata determinata, come riportato in precedenza, rilevando la capacità di questi peptidi nell'inibire l'adesione di fibronectina su cellule SK-MEL 24. La sintesi di analoghi di **1**, senza il gruppo N-Ts, danno il composto **5**, ma questa modificazione è seguita da una notevole decrescita dell'attività. Risultati interessanti sono stati ottenuti per i composti **4** e **8**, che mostrano valori di IC50 di $2.6 \cdot 10^{-8}$ and $3.5 \cdot 10^{-8}$ M, comparabili con quelli del potente anatagonista verso $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ AcDRGDS (**Tab.2**)⁹⁷

Il confronto tra **4** e **8** con gli altri peptidi sintetizzati portano ad alcune considerazioni: per prima cosa sia **4** sia **8** hanno 11 legami tra il C-terminale dell'acido carbossilico e l'N-terminale del gruppo guanidinico, **5** e **7**, che possiedono 12 legami e **6**, che ha 10 legami tra le stesse estremità, mostrano bassa attività (Tab.2).

In accordo con la letteratura, come regola generale per un antagonista verso $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, la distanza ottimale tra il C-terminale dell'acido carbossilico e l'N-terminale del gruppo guanidinico sembra essere di 12 legami C-C, come in -RGD-; alcune eccezioni vi sono con composti a 13⁹⁸ o 11 legami^{99,100}

⁹⁷ Fujii, H.; Komazawa, H.; Mori, H.; Kojima, M.; Itoh, I.; Murata, J.; Azuma, I.; Saiki, I. *Biol. Pharm. Bull.* **1995**, *18*,

1681.

⁹⁸ Batt, D. G.; Petraitis, J. J.; Houghton, G. C.; Modi, D. P.; Cain, G. A.; Corjay, M. H.; Mousa, S. A.; Bouchard, P. J.;

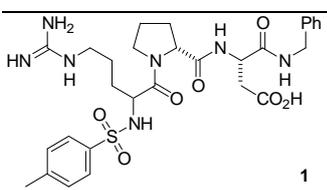
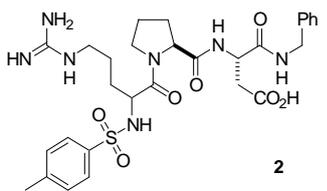
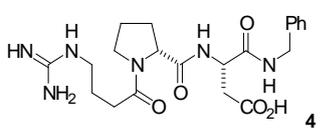
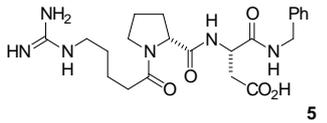
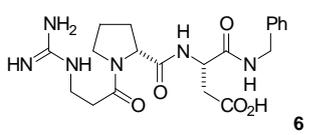
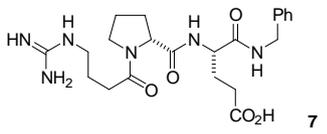
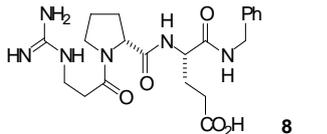
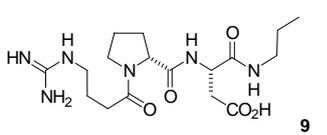
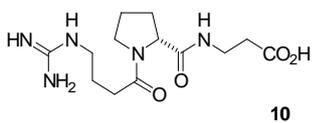
Forsythe, M. S.; Harlow, P. P.; Barbera, F. A.; Spitz, S. M.; Wexler, R. R.; Jadhav, P. K. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 41.

⁹⁹ Keenan, R. M.; Miller, W. H.; Kwon, C.; Ali, F. E.; Callahan, J. F.; Calvo, R. R.; Hwang, S.-M.; Kopple, K. D.; Peishoff, C. E.; Samanen, J. M.; Wong, A. S.; Yuan, C.-K.; Huffman, W. F. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2289.

¹⁰⁰ Keenan, R. M.; Amparo Lago, M.; Miller, W. H.; Ali, F.E.; Cousins, R. D.; Hall, L. B.; Hwang, S. M.; Jakas, D.

R.; Kwon, C.; Loudon, C.; Nguyen, T. T.; Ohlstein, E. H.; Rieman, D. J.; Ross, S. T.; Samanen, J. M.; Smith, B. R.; Stadel, J.; Takata, D. T.; Vickery, L.; Yuan, C. C. K.; Yue, T. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3171.

Tab. 2

Composti	[M+1] vs Calcolato	Purezza (%)	IC ₅₀ , μM
 <p>1</p>	630.5/630.2	94	0.15 ±0.02
 <p>2</p>	630.5/630.2	95	100 ±10
 <p>4</p>	447.3/447.2	96	0.026 ±0.002
 <p>5</p>	461.2/461.2	94	230 ±18
 <p>6</p>	433.5/433.2	93	>100
 <p>7</p>	462.1 /461.2	96	2.6 ±0.3
 <p>8</p>	447.1 /447.2	97	0.035 ±0.004
 <p>9</p>	399.2 /399.2	93	20 ±2
 <p>10</p>	314.3 /314.1	95	1.2
AcDRGDS 11	-	-	0.020 ±0.002

In secondo luogo, comparando l'attività di **4,8** con **9** e **10** si conferma il ruolo positivo in termini di affinità per il gruppo Benzilico alla terminazione –C. Infine, si può affermare che la maggior attività di **4** e **8** in confronto a quella di **1**, può essere collegata all'esistenza di una popolazione di strutture con una ben definita struttura secondaria¹⁰¹. Questa ipotesi è stata verificata conducendo esperimenti ¹H-NMR e VT-NMR di **12**, Ts-Arg(Mtr)-D-Pro-Asp(Ot-Bu)NH-Bzl e **3**, i precursori protetti di **1** e **4**, in un solvente polare (DMSO-d6). Si può postulare che peptidi di lunghezza ridotta adottino in ambiente polare diverse conformazioni, inoltre sequenze contenenti il residuo –Pro-generalmente si posizionano in configurazione trans e cis riguardo al legame omega della Pro.¹⁰²

Nel nostro caso mentre l'analisi ¹H-NMR di **12** mostra la presenza di due conformeri, in proporzione 6:4; l' ¹H-NMR di **3** mostra un singolo set di segnali¹⁰³.

Inoltre, l'analisi VT-NMR di **3** indica che vi sono alcune popolazioni di conformazioni ripiegate stabilizzate da un legame –H, che coinvolge NH-Bzl ammidico; per il composto **12** solo il segnale di NH-Bzldel maggior conformero (trans) tende a formare un legame H.

Per **3** (ppb/k) $\Delta\delta/\Delta t_{\text{NH-Bzl}}=3.1$, mentre $\Delta\delta/\Delta t_{\text{NH-Asp}}=5.1$, in accordo con la letteratura per composti simili con la tendenza a formare strutture tipo turn¹⁰⁴, per **12** invece $\Delta\delta/\Delta t_{\text{NH-Bzl-trans}}=3.4$, $\Delta\delta/\Delta t_{\text{NH-Bzl-cis}}=5.2$. Nonostante queste osservazioni non siano definitive, vanno comunque a supportare l'ipotesi che **4** possa essere conformazionalmente più omogeneo e definito rispetto ad **1**. Apparentemente, il protone di NH-Bzl di **4** sembra essere coinvolto in qualche forma di β -turn. Diversi studi propongono che un β -turn in -RGD- conduca ad un aumento dell'attività verso le integrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ piuttosto che verso le $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ in cui i residui basici e acidi delle catene laterali si orientano da parti opposte.^{9,105,106}

Nonostante ciò peptidi eterochirali con la sequenza Xaa-Pro-D-Yaa si comportano in maniera differente e tendono a ripiegarsi in un β 'II-turn in cui le catene laterali di Xaa e D-Yaa si orientano dalla stessa parte.(**Fig.1**)

¹⁰¹ Imperiali, B.; Moats, R. A.; Fisher, S. L.; Prins, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3182.

¹⁰² Venkatraman, J.; Shankaramma, S. C.; Balaram, P. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3131.

¹⁰³ Vd parte sperimentale.

¹⁰⁴ Imperiali, B.; Moats, R. A.; Fisher, S. L.; Prins, T. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 3182.

¹⁰⁵ Dechantsreiter, M. A.; Planker, E.; Matha, B.; Lohof, E.; Holzemann, G.; Jonczyk, A.; Goodman, S. L.; Kessler, H. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3033.

¹⁰⁶ Fisher, M. J.; Gunn, B.; Harms, C. S.; Kline, A. D.; Mullaney, J. T.; Nunes, A.; Scarborough, R. M.; Arfsten, A. E.; Skelton, M. A.; Um, S. L.; Utterback, B. G.; Jakubowski, J. A. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2085.

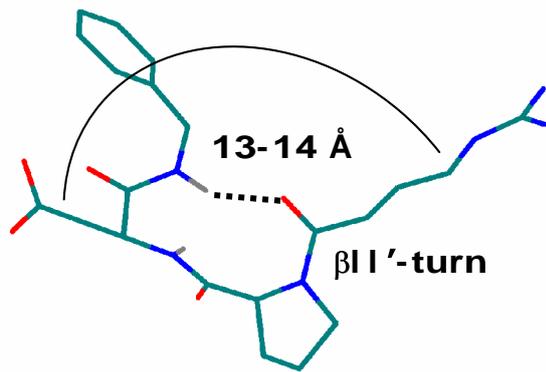


Fig.1

In accordo con queste considerazioni, in quanto il GABA può comportarsi da D aminoacido, l'enantiomerica sequenza GABA-D-Pro-Asp può adottare una conformazione tipo $\beta'II$ -turn centrato su D-Pro-L-Yaa con i gruppi guanidinico e acido orientati dalla stessa parte, conformazione in grado di soddisfare i requisiti per un legame preferenziale verso le integrine $\alpha v \beta 3$.

CAPITOLO 3

3.1 c-PMRI A 13 TERMINI

Molti peptidi e proteine attive a livello biologico svolgono la loro funzione attraverso regioni spazialmente definite della loro superficie ripiegata¹⁰⁷.

Proprio per questo è stata rivolta molta attenzione nella progettazione di peptidi minimalisti e conformazionalmente definiti o analoghi¹⁰⁸ che siano in grado di mimare queste regioni ripiegate. Nella costruzione di-RGD- mimetici si è voluto utilizzare una serie di peptidi ciclici sviluppati e studiati dal nostro gruppo di ricerca: ciclotrapeptidi modificati parzialmente retroinversi (PMRI-CTP) in grado di assumere conformazioni definite¹⁰⁹.

Questi composti risultano essere degli ottimi “descrittori dello spazio chimico” in quanto permettono di ricavare informazioni sulla struttura 3D¹¹⁰ e mostrano inoltre altri vantaggi già ampiamente illustrati nel capitolo introduttivo.

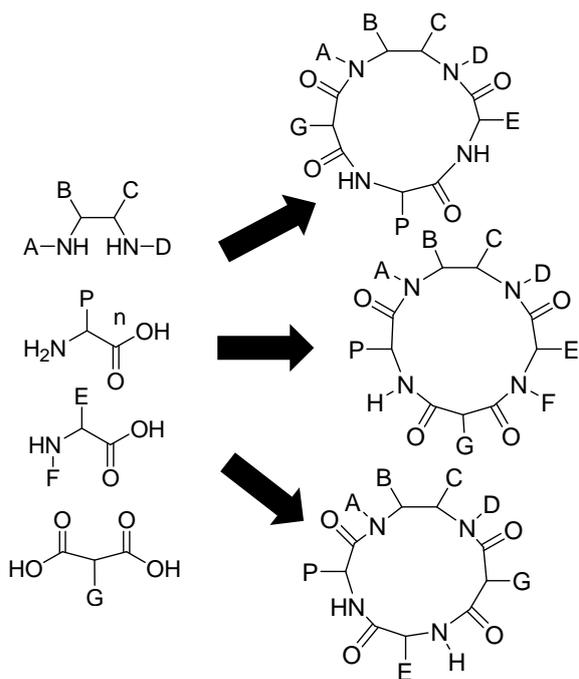


Fig.1

¹⁰⁷ J. D. A. Tyndall, B. Pfeiffer, G. Abbenante, D. P. Fairlie, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 793–826; b) V. J. Hruby, P. M. Balse, *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 945–970.

¹⁰⁸ V. J. Hruby, R. S. Agnes, *Biopolymers* **2000**, *51*, 391–410; b) for a recent review on the use of peptidomimetics in biochemistry, medicine, pharmacology, etc., see: L. Gentilucci, A. Tolomelli, F. Squassabia, *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 2449–2466.

¹⁰⁹ M. Chorev, M. Goodman, *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 266–506 273; b) M. D. Fletcher, M. M. Campbell, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 763–795; c) M. Chorev, *Biopolymers* **2005**, *80*, 67–84; d) Y. S. Lee, R. S. Agnes, P. Davis, S.-w. Ma, H. Badghisi, J. Lai, F. Porreca, V. J. Hruby, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 165–168; e) K.-J. Kim, S.-W. Park, S. S. Yoon, *J. Kor. Chem. Soc.* **2000**, *44*, 511 286–289; f) for the use of a 10-membered ethylene-bridged PMRI peptide as β -turn mimetic, see: Y. Han, C. Giragossian, D. F. Mierke, M. Chorev, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 5085–5097.

¹¹⁰ Balaban, A.T. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1997**, *37*, 645.

Si è quindi progettato di sintetizzare una piccola libreria di peptidomimetici introducendo una 1,2-diammina come β^2 -aminacido mimetico, una L-Phe, una L-Ala e un residuo malonilico in diverse posizioni della sequenza peptidica.(**Fig.1**).

La diammina (2-Amino-1-benzil-etil)-acido carbammico benzil estere (**1**) è stata facilmente ottenuta dalla riduzione di Cbz-Phe-NH₂ con BH₃, **Fig.2**¹¹¹

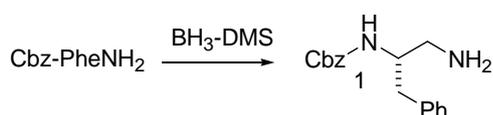


Fig.2

Per testare la fattibilità della sintesi di CTP contenenti una 1,2-diammina N sostituita , è stato preparata anche la diammina **2**, [2-(4-Metil-benzilamino)-etil]-*tert*-butil estere dell'acido carbammico è stato preparato attraverso la riduzione con il NaBH₄ in MeOH della corrispondente ammina ottenuta attraverso la condensazione di (2-aminoetil) *tert*-butyl estere dell'acido carbammico¹¹² con la

p-metilbenzaldeide in presenza di MgSO₄ in DCM. Le diammine sono state poi in seguito fatte reagire in soluzioni con i rimanenti residui secondo procedura standard. Come esempio si riporta la sintesi di **3** e **4** in **Fig 4**.

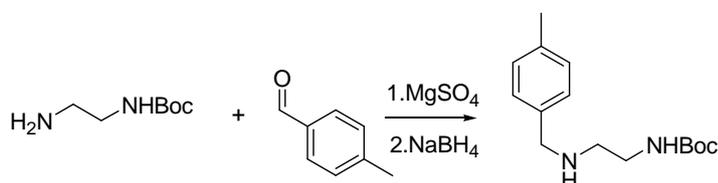


Fig.3

¹¹¹ Morie, T.; Kato, S.; Harada, H.; Fujiwara, I.; Watanabe, K.; Matsumoto, J.-I. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1994**, 2565.

¹¹² Pittelkow, M.; Lewinsky, R.; Christensen, J. B. *Synthesis* **2002**, 15, 2195

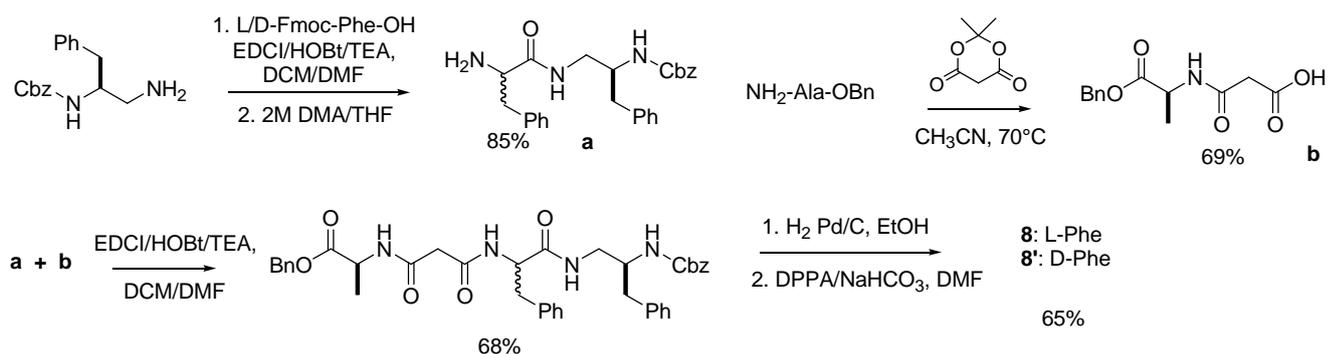


Fig.4

Accoppiando la Cbz-diammina con la Phe N-Fmoc protetta si ottiene il dipeptide **a** con buona resa. Il dipeptide viene successivamente deprotezionato dallo Fmoc tramite trattamento con Dimetilammina in THF. Il dipeptide **b** è stato facilmente preparato dall'acido di Maeldrum e NH₂-Ala-OBz. L'accoppiamento dei dipeptidi **a** e **b** ha permesso di ottenere il tetrapeptide lineare completamente protetto. La rimozione dei gruppi protettivi attraverso H₂ and Pd/C e la ciclizzazione finale con DPPA, danno i ciclopeptidi **3** e **4** con buona resa. I composti sono stati caratterizzati tramite analisi HPLC-MS.

E' stato osservato che gli intermedi lineari peptidici N-protetti hanno una notevole solubilità in solventi clorurati, come cloroformio e diclorometano, mentre risultano praticamente insolubili in solventi come l'etere, etilacetato; mostrano poi una parziale solubilità in dimetilformamide e metanolo, che aumenta se si aggiungono percentuali crescenti di solventi clorurati. Questo comportamento è imputabile probabilmente alla presenza della 1,2 diammina. Queste considerazioni hanno portato ad un processo di purificazione semplificato, facendo precipitare gli intermedi peptidici con etere e isolando... per filtrazione. Come esempio, si riporta l'analisi HPLC del tetrapeptide lineare protetto dopo semplice precipitazione **Fig. 5**.

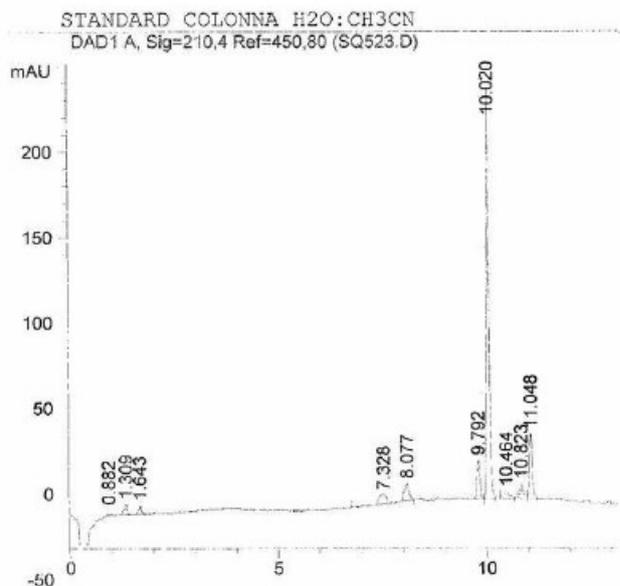


Fig. 5. Analisi HPLC della miscela di reazione del terapeptide lineare $R_t = 10.02$ min,

Attraverso una procedura simile sono stati sintetizzati gli altri ciclopeptidi analoghi Fig. 6.

L'introduzione della diammina e del di acido in diverse posizioni della sequenza porta alla costruzione di diversi composti aventi uno, due o tre legami peptidici "retro"

In accordo con la nomenclature IUPAC, la notazione ψ , per i surrogati dei legami amidici, indica che il legame peptidico tra due residui è inverso. Il peptide **7** può essere nominato come $[\beta\text{Phe-}\psi(\text{NHCO})\text{-Ala-Gly-Phe}]$, **8** come $[\beta\text{Phe-}\psi(\text{NHCO})\text{-Ala-}\psi(\text{NHCO})\text{-Gly-Phe}]$, **9** come $[\beta\text{Phe-}\psi(\text{NHCO})\text{-Ala-}\psi(\text{NHCO})\text{-Gly-}\psi(\text{NHCO})\text{-Phe}]$, e **10** come $[N\text{-Bz-}\beta\text{Phe-}\psi(\text{NHCO})\text{-Ala-}\psi(\text{NHCO})\text{-Gly-Phe}]$, **Fig. 6**

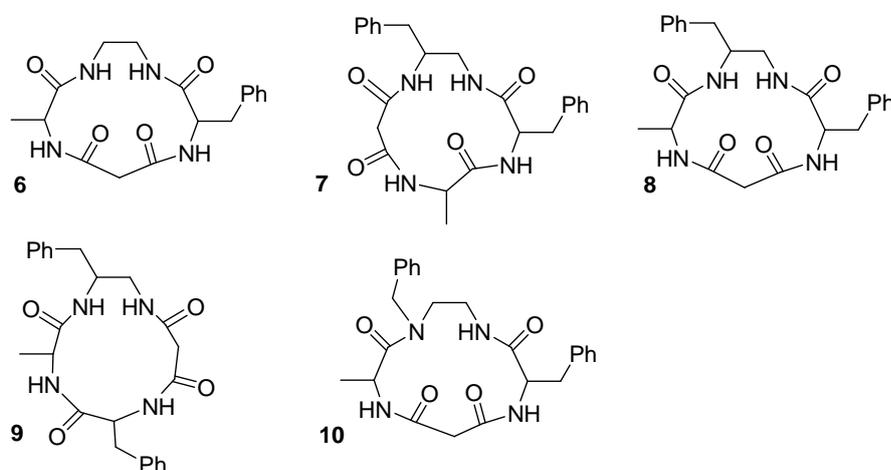


Fig.6

Strutture dei ciclotrapeptidi sintetizzati contenenti uno (**6**), due (**8**), e tre (**9**) legami peptidici inversi. **10** invece mostra la contemporanea introduzione di una diammina N-sostituita e di due legami peptidici inversi.

E' stato previsto che l'introduzione della modificazione retro-inversa porti a strutture 3D diverse, dipendenti dalla sequenza specifica. In un normale CTP, la struttura 3D è determinata dalla specifica combinazione delle chiralità dei residui, mentre risulta meno importante la natura del residuo. In un normale CTP quindi, cambiando la posizione di due residui (ad esempio da $Xaa^1-Xaa^2-Xaa^3-Xaa^4$, a $Xaa^1-Xaa^3-Xaa^2-Xaa^4$), non si notano in generale mutazioni a livello della struttura. Al contrario nelle sequenze contenenti modificazioni retro (ad es. da $Xaa^1-diammina^2-Xaa^3-diacido^4$, a $Xaa^1-Xaa^3-diammina^2-diacido^4$) si hanno conseguenze a livello strutturale in quanto il diacido e la diammina non sono comparabili ad un amminoacido. Inoltre, la sostituzione di un normale AA con uno stesso residuo in posizione retro equivale a posizionare i suoi residui della catena laterale in posizione opposte. Infine la struttura 3D sono meno prevedibili in quanto si riscontrano inusuali legami H intramolecolari. Le prime strutture analizzate sono state **6** e **8** e, con la mutazione della chiralità del residuo Phe, **6'** e **8'** (**Fig.8**)

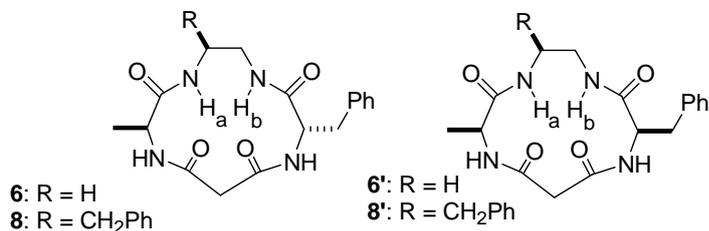


Fig.8

L'analisi ¹H-NMR di questi modelli mostra un singolo set di segnali, nonostante ciò i valori $J_{NH,CH}$ risultano modesti (<9Hz) e sono indice di un rapido equilibrio piuttosto di una completa rigidità conformazionale¹¹³. Tuttavia esperimenti di temperatura variabile VT-¹H-NMR sottolineano la presenza di legami H coinvolgenti i protoni ammidici NHa and NHb (**Fig.8**) ($\Delta\delta/\Delta t$ risulta minore o vicino al valore 1 ppb/K¹¹⁴ (Tab.1), questo valore supporta l'esistenza di strutture con elementi strutturali secondari definiti. Attraverso uno studio di Dinamica Molecolare abbinato ai dati spettroscopici è stato possibile esplorare le caratteristiche conformazionali di questi composti

¹¹³ a) S. J. Stradley, J. Rizo, M. D. Bruch, A. N. Stroup, L. M. Gierasch, *Biopolymers* **1990**, 29, 263–287; b) H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, 21, 512–523.

¹¹⁴ C. Toniolo, *CRC Crit. Rev. Biochem.* **1980**, 9, 1–44.

Tab.1 Valori di $\Delta\delta/\Delta t$ (ppb/K) dei protoni amidici per **6-6'**, **8-8'** determinati tramite VT-NMR in $[D_6]$ DMSO al 400 MHz utilizzando il range di T: 298–348°K

Comp	$\Delta\delta/\Delta t_{\text{AlaNH}}$	$\Delta\delta/\Delta t_{\text{L/D-PheNH}}$	$\Delta\delta/\Delta t_{\text{NHb}^b}$	$\Delta\delta/\Delta t_{\text{NH}\alpha}^b$
6	-5.0	-5.3	-0.05	-0.7
6'	-4.4	-4.1	-0.5 ^a	-1.3
8	-5.5 ^c	-5.0 ^c	-1.2	+1.4
8'	-4.1	-3.0	-0.2	-1.3

[a] Determinati attraverso esperimenti gCOSY registrati a 298 e 313°K.

[b] Vedi Fig.8. [c] PheNH e AlaNH in **8** sono sovrapposti

Non è stato possibile eseguire gli esperimenti $^1\text{H-NMR}$ in acqua in quanto i peptidi in questione sono praticamente insolubili in questo solvente. Molti peptidi e peptidomimetici di interesse descritti in letteratura non sono molto solubili in acqua e sono stati studiati sperimentalmente in ambiente organico polare, in particolare in DMSO^{115,116,117}. Gli esperimenti NMR sui ciclopeptidi lipofili sono stati quindi condotti al 400MHz in $[D_6]$ DMSO.

L'analisi 2D-ROESY ha fornito dettagli sulla conformazione dello scheletro del ciclopeptide ed è stato rilevato che la maggior differenza strutturale tra **6,6'** e **8, 8'**, a parte l'inversione di configurazione della Phe, si riduce alla zona L/D-PheNH (vd. Cross-Peaks del ROESY tra i protoni COCH₂CO e L/D-PheNH o AlaNH (**Fig. 9**). In **6**, AlaNH è in prossimità spaziale di uno dei due protoni COCH₂CO (δ 3.2 ppm), mentre PheNH è vicino all'altro (δ = 3.1 ppm). In **6'**, sia AlaNH sia D-PheNH sono prossimi allo stesso protone COCH₂CO (δ = 3.3 ppm), e D-PheNH mostra anche un picco di media intensità con il secondo COCH₂CO (δ = 2.8 ppm). Il comportamento di **8** è avvicinabile a quello di **6**, mentre il comportamento di **8'** è simile a quello di **6'**.

Il fatto che vi siano ROESY cross-peaks tra D-PheNH ed entrambi i protoni COCH₂CO, che presumibilmente occupano parti opposte del piano molecolare, sembra suggerire che, in **6'** e **8'**, D-PheNH possa muoversi indifferentemente da sotto il piano a sopra e viceversa.

Inoltre, l'esistenza di forti cross peaks ROESY in **6** e **6'** per NHb-PheNH e NHb-PheH α , e

¹¹⁵ a) F. Schumann, A. 486 Muller, M. Kokschi, G. Muller, N. Sewald, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12009–12010;

b) M. P. Glenn, M. J. Kelso, J. D. A. Tyndall, D. P. Fairlie, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 640–641.

¹¹⁶ Y. Han, C. Giragossian, D. F. Mierke, M. Chorev, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 5085–5097.

¹¹⁷ P. A. Temussi, D. Picone, G. Saviano, P. Amodeo, A. Motta, T. Tancredi, S. Salvadori, R. Tomatis, *Biopolymers*

1992, *32*, 367–372. Esempi più recenti a) J. Chatterjee, D. Mierke, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15164–15172; b) E. Locardi, D. G. Mullen, R.-H. Mattern, M. Goodman, *J. Pept. Sci.* **1999**, *5*, 491–506; c) H. B. Lee, M. Pattarawarapan, S. Roy, K. Burgess, *Chem. Commun.* **2003**, *14*, 1674–1675.

per NHa-AlaNH e NHa-AlaH α , è indicativa che NHa e NHb possano liberamente muoversi da sotto il piano molecolare a sopra e viceversa., come PheNH e PheH α , anche AlaNH e AlaH α sono *trans*

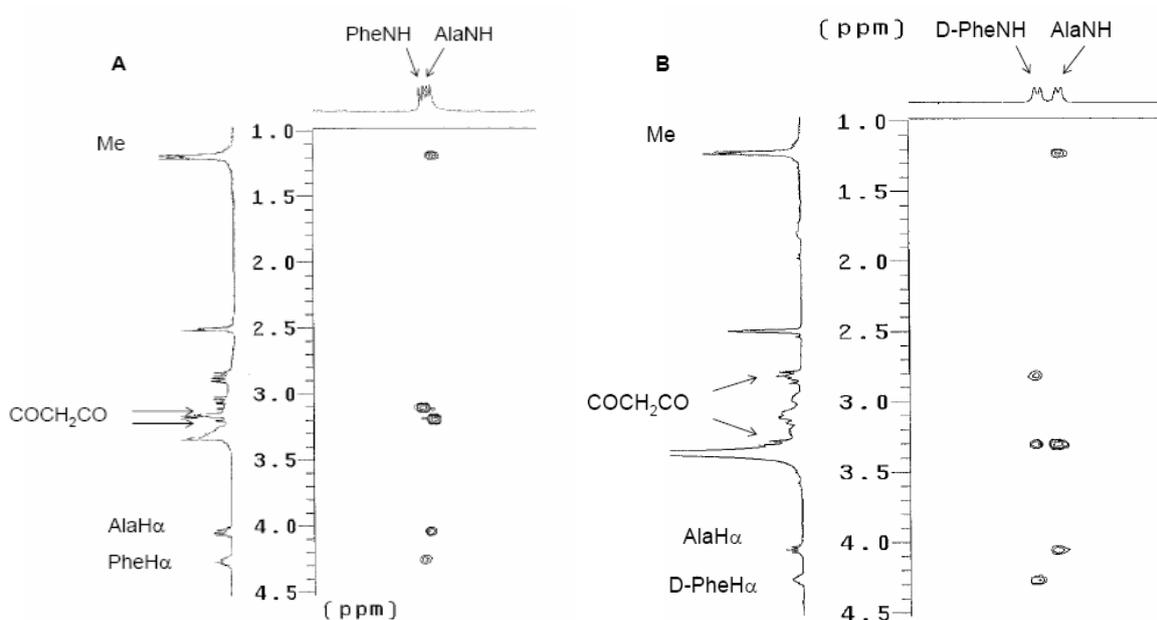


Fig. 9. Sezione di ROESY osservata per **6** (A) and **6'** (B) in [D₆]-DMSO al 400 MHz (R.T). In evidenza i cross peaks tra COCH₂CO e i protoni L/D-PheNH/AlaNH.

Attraverso esperimenti di MD con restrizioni, usando le distanze ricavate dagli esperimenti ROESY, sono state ottenute le conformazioni a più bassa energia.

Per **6** e **6'**, si ottengono strutture differenti ed in ognuna di queste si notano violazioni delle restrizioni applicate. In **Fig.10** sono raffigurate le strutture aventi l'energia interna più bassa e il minor numero di violazioni.

La struttura proposta per **6** è caratterizzata da due γ -turns inversi, uno centrato su Phe ($\Phi = -101$, $\psi = +51$) e l'altro su Ala ($\Phi = -98$, $\psi = +50$), mentre la struttura rappresentativa di **6'** è circa compatibile con un γ -turn inverso centrato su Ala ($\Phi = -130$, $\psi = +68$).

Al contrario, più del 90% delle strutture di **8** calcolate tramite MD con restrizioni non mostrano nessuna violazione e risultano tutte omogenee. Apparentemente, l'introduzione di una diammina sostituita è sufficiente per conferire alla struttura omogeneità conformazionale.

La struttura rappresentativa di **8** (**Fig.10**) è compatibile con β -turn di tipo I centrato su Phe-diammina e un secondo centrato su Ala-diammina. Comunque, questa struttura non conferma la presenza di legami H intramolecolari come era stato rilevato dalle analisi VT- ^1H -NMR, probabilmente per la presenza di un veloce equilibrio tra geometrie leggermente diverse, la cui media rispetto alla scala dei tempi NMR dà la risultante struttura discussa in precedenza.

Il passo successivo è stato quello di condurre esperimenti di Free-MD, in maniera tale da riuscire a visualizzare il comportamento dinamico della molecola in acqua e di determinare la presenza di eventuali strutture secondarie fissate da legami-H intramolecolari.

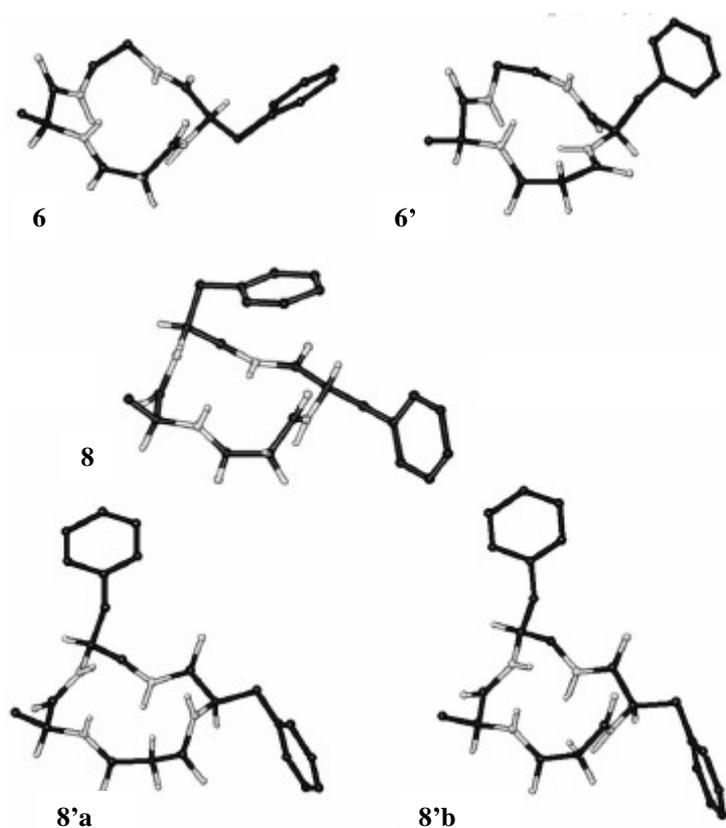


Fig. 10. Strutture rappresentative di **6,6'** e **8,8'** calcolate con MD con restrizioni (numero minore di violazioni ROESY).

Le simulazioni sono state condotte utilizzando un “box” di molecole d’acqua per 5.0 ns, utilizzando la geometria derivata dagli esperimenti NMR come struttura di partenza. E’ stata osservata una modesta flessibilità del “backbone” della molecola. Inoltre si nota chiaramente come vi siano strutture (**A** e **B**) che hanno NHa e NHb alternativamente impegnati in legami-H (**Fig.11**).

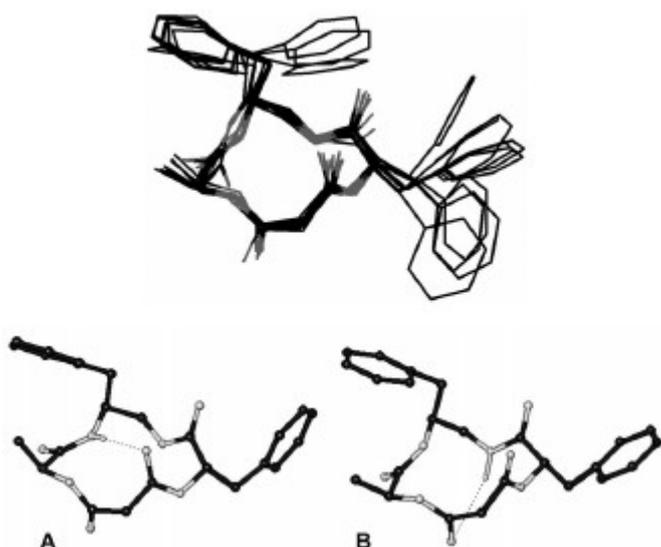


Fig. 11. Strutture minimizzate di **8** ottenute ogni 500 ps durante MD (5.0ns) senza restrizioni in acqua. A e B mostrano espliciti legami-H e elementi di strutture secondarie.

Analizzando gli angoli della struttura si vede che: la Phe-diammina (per **A**): $\Phi_{i+1} = -54$, $\psi_{i+1} = -40$, $\Phi_{i+2} = -96$, $\psi_{i+2} = -28$; per **B**: $\Phi_{i+1} = -83$, $\psi_{i+1} = -38$, $\Phi_{i+2} = -92$, $\psi_{i+2} = -37$, e Ala-diammina (per **A**: $\Phi_{i+1} = -65$, $\psi_{i+1} = -33$, $\Phi_{i+2} = -116$, $\psi_{i+2} = -28$; per **B**: $\Phi_{i+1} = -73$, $\psi_{i+1} = -29$, $\Phi_{i+2} = -89$, $\psi_{i+2} = -37$). I frammenti Phe-diammina e Ala-diammina sono entrambi avvicinabili a due turn β -turns simmetrici di tipo I¹¹⁸, sebbene soltanto l'ultimo possa considerarsi un mimetico realistico di un β -turn di tipo I, per la posizione del gruppo benzilico. Per quanto riguarda **8'**, MD senza restrizioni dà due famiglie di strutture, **8'a** e **8'b** (**Fig.10**), con circa la stessa energia e che differiscono tra loro per la posizione di .D-Phe-NH. Entrambe le strutture sono compatibili con β -turn di tipo I centrato sul frammento Ala-diammina, ma anche **8'b** mostra β -turn di tipo I centrato su Phe-diammina. Le due strutture ragionevolmente rappresentano distinti conformeri in equilibrio, anche se **8'b**, mostra un minor numero di violazioni e risulta avere una struttura più compatibile con i dati VT-NMR, che portano alla deduzione della presenza di due legami-H coinvolgenti NHa e NHb. Esperimenti di MD senza restrizioni condotti su **8'a** evidenziano la formazione di un solo legame-H coinvolgente NHb, mentre MD senza restrizioni su **8'a**, mostra la presenza di legami-H coinvolgenti NHa e/o NHb. (**Fig.12**). Le simulazioni falliscono nel riprodurre l'inversione di D-PheNH, evidentemente questa rotazione è molto lenta in relazione al tempo selezionato per la simulazione (5.0 ns)

¹¹⁸ F. Schumann, A.486 Muller, M. Kokschi, G. Muller, N. Sewald, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12009–12010; b) M. P. Glenn, M. J. Kelso, J. D. A. Tyndall, D. P. Fairlie, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 640–641.

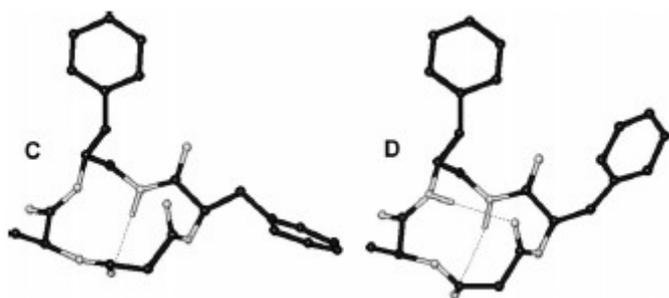


Fig. 12. Strutture rappresentative **C**, **D** di **8'b** calcolate tramite MD senza restrizioni: vi sono legami-H espliciti e elementi di strutture secondarie.

In conclusione, si può affermare che i PMRI-CTPs contenenti una diammina sostituita si mostrano conformazionalmente omogenei a differenza di quelli aventi una diammina non sostituita, si può comunque notare che la disposizione delle catene laterali risulta definita per tutti e quattro i modelli valutati. Questa osservazione non è inaspettata, infatti, è stato ben documentato che penta o esapeptidi ciclici possono adottare una struttura 3D e un posizionamento delle catene laterali definito, in base alla stereochimica degli aminoacidi utilizzati nella costruzione del ciclo. Si nota poi che la presenza di una Gly all'interno della sequenza genera un rapido cambiamento locale nella struttura del backbone.¹¹⁹

Il peptide **8**, poi $c[\beta\text{Phe-}\psi(\text{NHCO})\text{-Ala-}\psi(\text{NHCO})\text{-Gly-Phe}]$, può essere considerato un analogo PMRI del CTP contenente un β 2-aminoacido $c[(S)\text{-}\beta$ 2Phe-D-Pro-Lys-Phe]¹²⁰ (**E**, **Fig. 13**).

In generale in un normale ciclotrapeptide la struttura 3D è determinata principalmente dallo specifico riarrangiamento della sequenza dei centri stereogenici, mentre la natura dei residui passa in secondo piano.

¹¹⁹ a) S. J. Stradley, J. Rizo, M. D. Bruch, A. N. Stroup, L. M. Gierasch, *Biopolymers* **1990**, 29, 263–287; b) H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, 21, 512–523. c) R. Haubner, R. Gratias, B. Diefenbach, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H.

Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7461–7472; d) K. Burgess, D. Lim, S. A. Mousa, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 4520–4526; e) G. Casiraghi, G. Rassa, L. Auzzas, P. Burreddu, E. Gaetani, L. Battistini, F. Zanardi, C. Curti, G. Nicastro, L. Belvisi, I. Motto, M. Castorina, G. Giannini, C. Pisano, *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 7675–7687.

¹²⁰ A. S. Norgren, F. Buttner, S. Prabhari, P. Kongsaeree, P. I. Arvidsson, *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 6814–6821;

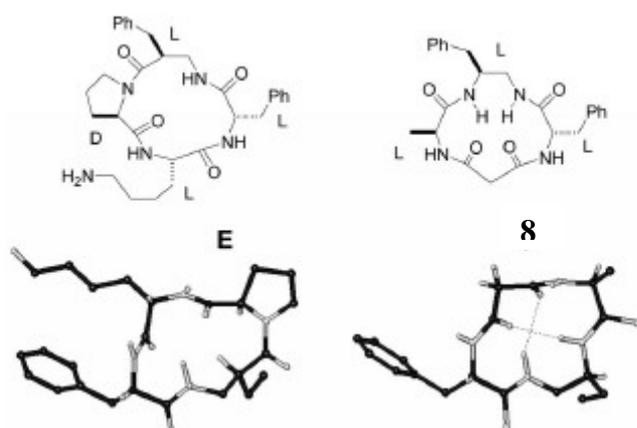


Fig. 13 Confronto tra i backbones delle strutture rappresentative di $c[\beta\text{Phe-}\psi(\text{NHCO})\text{-Ala-}\psi(\text{NHCO})\text{-Gly-Phe}]$ (**8**) e $c[(S)\text{-}\beta\text{2hPhe-D-Pro-Lys-Phe}]$ **E**.

I peptidi **8** e **E** hanno la stessa sequenza a livello di stereochimica: la (*S*)-diammina in **8** si comporta come la (*S*)- β2Phe in **E**; la configurazione di Ala in PMRI **8** corrisponde alla configurazione D della Pro in **E**. Il residuo malonile, $\psi(\text{NHCO})\text{-Gly}$, possono agire da D amminoacido e l'ultimo residuo è il medesimo sia per **8** sia per **E**. Il confronto tra le due strutture mostra che i due scaffolds mantengono caratteristiche distinte, in particolare per la presenza di un legame ω di tipo *cis* $\beta\text{-Phe-D-Pro}$ in **E** e per la posizione della catena laterale della $\beta\text{-Phe}$, la quale in **E** è piazzata sotto il piano, mentre in **8** rimane sopra.

La struttura **8**¹²¹ è stata confrontata poi con **9** (si connettono i residui componenti **8** in maniera diversa) per confermare la capacità di questi ciclopeptidi nel generare strutture con una varietà spaziale rilevante. L'analisi conformazionale è stata condotta come in precedenza (¹H-NMRs, MD). In **Fig.14** si mostrano le analisi NMR

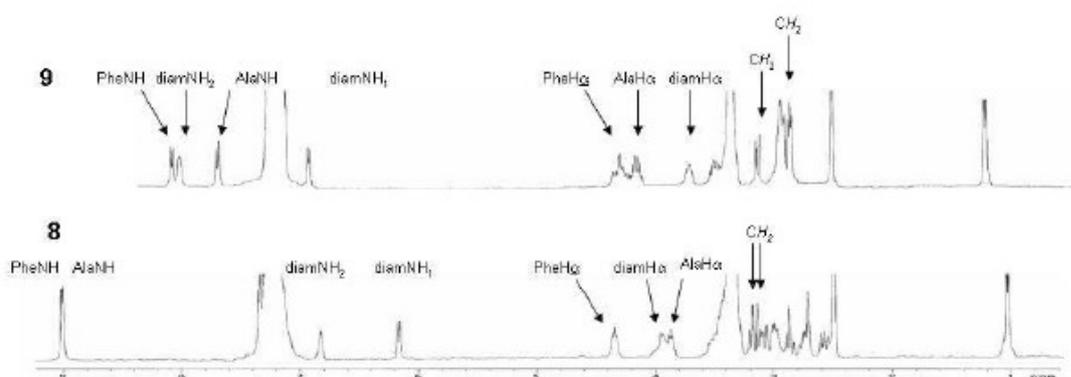


Fig. 14. ¹H-NMR analyses of **8** and **9**, 400 MHz, DMSO-d₆, r.t.

¹²¹ Luca Gentilucci, Giuliana Cardillo, Alessandra Tolomelli, Santi Spampinato, Antonino Sparta, Federico Squassabia European Journal of Organic Chemistry, **2008**, 4, 729-735.

VT-¹H-NMR indicava per **8** che i due NHs della diammina sono coinvolti in legami-H. Per **9**, l'analisi VT-¹H-NMR suggerisce che i protoni coinvolti in legami-H sono NHAla, e NH₁ ($\Delta\delta/\Delta t$ (ppb/°K)= -1.4 e -1.3). Questo risultato mette in evidenza la presenza di una popolazione di strutture ordinate con elementi strutturali secondari.

Per quanto riguarda il 2D-ROESY si riporta la regione particolarmente diagnostica per **9** in **Fig.15** (cross-peaks di NHammidico – H α e NHammidico – H β)

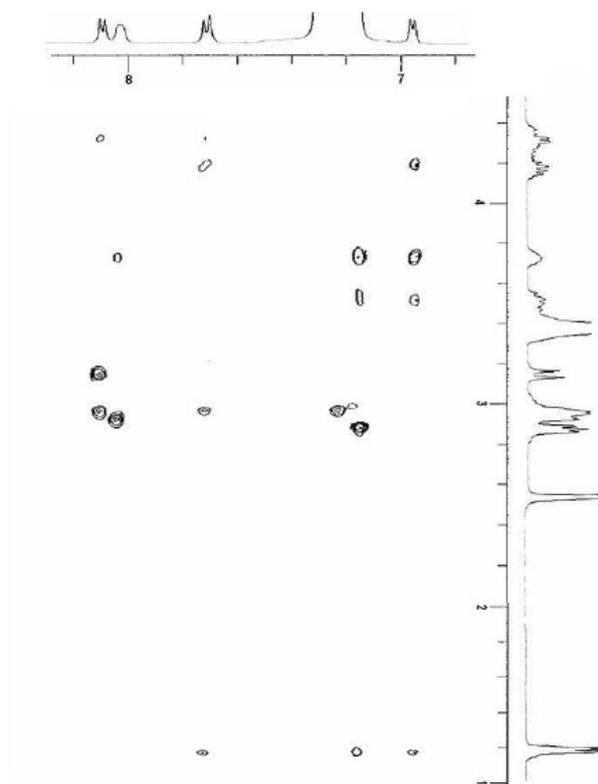


Fig. 15. Inset of 2D-ROESY of **9**, 400 MHz, DMSO-d₆, r.t.

Non si evidenziano cross-peak tra H α_i -H α_{i+1} , indicativi di un legame peptidico di tipo cis, quindi tutti i legami ω sono posizionati a 180°. Utilizzando le distanze ricavate dal ROESY come restrizioni negli esperimenti di MD è stato possibile visualizzare la struttura di **9** **Fig. 16**

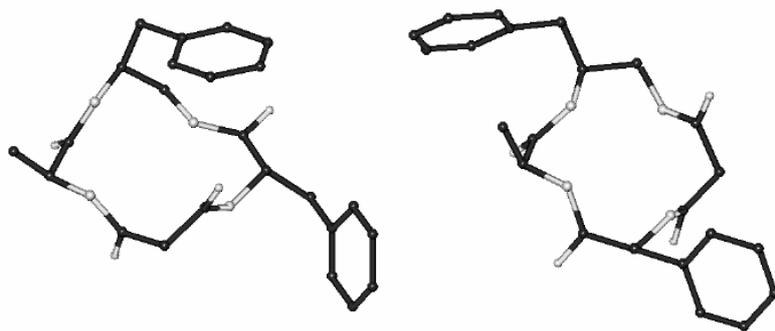


Fig. 16. Strutture a bassa energia rappresentative di **8** (sinistra) e **9** (destra) in accordo con l'analisi ROESY.

Mentre la struttura **8** è compatibile con la presenza di due β -turns di tipo I, la struttura **9** è compatibile con un γ -turn centrato sulla diammina e un β -turn inverso di tipo II avente nelle posizioni $i+1$, $i+2$ la diammina e l'Ala.

Tramite l'analisi MD senza restrizioni si conferma la presenza di un β -turn inverso di tipo II e di un γ -turn. Apparentemente il backbone oscilla tra due conformazioni leggermente diverse caratterizzate da due legami-H in equilibrio, coinvolgenti alternativamente AlaNH-malonil CO₍₂₎, e NH₍₁₎- malonil CO₍₂₎, **Fig. 17**.

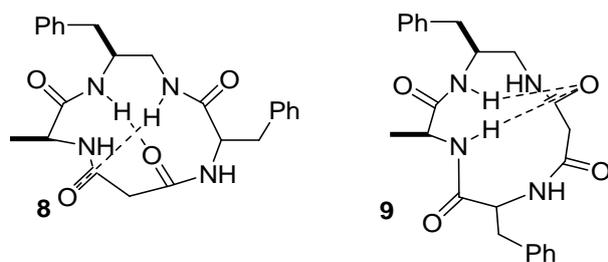


Fig. 17

3.2 PMRI-CTP COME ANTAGONISTI DI INTEGRINE $\alpha v\beta 3$ e $\alpha 5\beta 1$

Sulla base delle valutazioni fatte in precedenza riguardo alle caratteristiche strutturali dei PMRI-CTP, questi sono stati utilizzati come scaffolds per la costruzione di un'ampia library di composti

-RGD- mimetici. In particolare è stata utilizzata la sequenza di residui mostrata in **Fig.18**

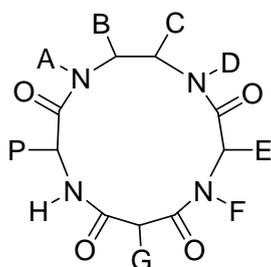


Fig.18

In cui il residuo diamminico e quello malonilico sono in posizioni opposte; completano il ciclo i due residui amminoacidici, Arg e Asp. I composti sono stati sintetizzati seguendo la procedura sintetica riportata nel paragrafo precedente. I primi due composti sintetizzati (**Fig.19**)

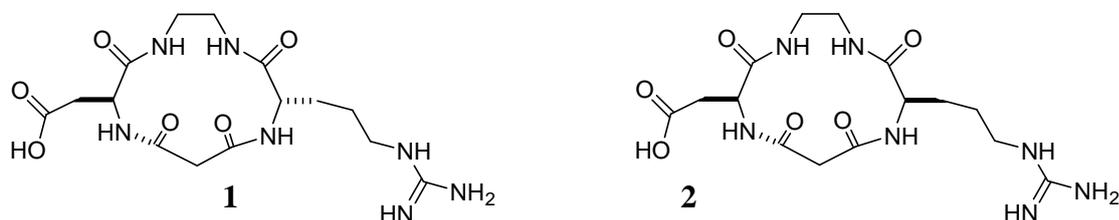


Fig.19

mantengono i residui carbossilico e guanidinico in posizioni definite, in particolare la distanza tra i carboni β è per **1** di 8.4 Å e per **2** di 7.6 Å; quest'ultimo valore è generalmente riconosciuto come requisito fondamentale per un'affinità significativa nei confronti dell'integrina $\alpha v\beta 3$. Sono noti già diversi esempi di peptidomimetici antagonisti di integrine basati su uno scaffold ciclico portante i gruppi farmacoforici in questione; inoltre questi composti si sono rivelati utili nell'identificare la correlazione tra la disposizione 3D delle catene laterali e l'attività biologica^{122,123}.

¹²² F. Schumann, A.486 Muller, M. Kokschi, G. Muller, N. Sewald, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12009–12010; b) M. P. Glenn, M. J. Kelso, J. D. A. Tyndall, D. P. Fairlie, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 640–641.

¹²³ a) C. Henry, N. Moitessier, Y. Chapleur, *Mini-Rev. Med. Chem.*, **2002**, *2*, 531–542; b) M. A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Matha, E. Lohof, G. Holzemann, A. Jonczyk, S. L. Goodman, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*,

In particolare, è stato dimostrato in maniera esaustiva che una distanza minore tra i carboni β (7-8 Å) favorisce un legame selettivo verso l'integrina $\alpha\beta3$ rispetto alle altre integrine affini a ligandi del tipo -RGD-. Inoltre la presenza di gruppi lipofili alle terminazioni -N e -C si è rivelata cruciale per l'affinità e selettività^{124,125}. Per evitare qualsiasi effetto di questi gruppi sono stati sintetizzati -RGD- mimetici contenenti una diammina non sostituita.

L'analisi strutturale di **1** e **2** ancora con i gruppi protettori sui residui guanidinico e carbossilico mostra risultati inaspettati. Comparando infatti le analisi ¹H NMR, VT-NMR, e ROESY di **6** e **1p**

si nota una disposizione del backbone differente. (Fig.20)

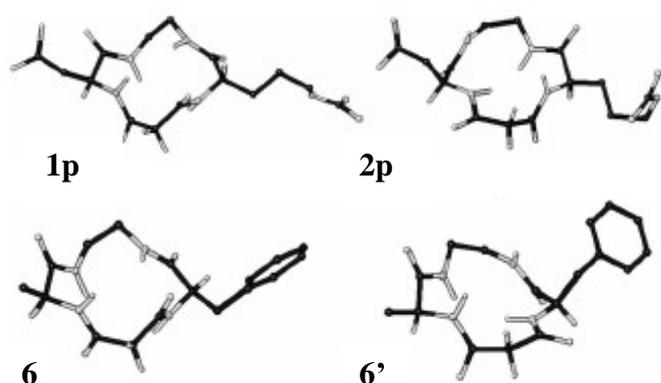


Fig.20 Confronto tra le strutture dei modelli e degli -RGD- mimetici sintetizzati (i gruppi protettori Mtr e t-But sono stati omessi per chiarezza)

In particolare **6'** ha un NH posizionato sul piano molecolare ed è riconducibile all'amminoacido della serie D, mentre in **2** l'NH che si trova sul piano è del residuo L.

A parte questa differenza le distanze tra i carboni β sono simili sia negli -RGD- mimetici, sia nei modelli. L'attività biologica di questi due composti verso le integrine $\alpha\beta3$ è stata valutata tramite test dell'inibizione dell'adesione di uno specifico ligando, fibronectina, ad una serie cellulare (SK-MEL 24) in grado di esprimere il recettore $\alpha\beta3$.¹²⁶

3033–3040; c) R. Haubner, R. Gratiyas, B. Diefenbach, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7461–7472; d) K. Burgess, D. Lim, S. A. Mousa, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4520–4526; e) G. Casiraghi, G. Rassu, L. Auzzas, P. Burreddu, E. Gaetani, L. Battistini, F. Zanardi, C. Curti, G. Nicastro, L. Belvisi, I. Motto, M. Castorina, G. Giannini, C. Pisano, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 7675–7687.

¹²⁴ M. Gurrath, G. Muller, H. Kessler, M. Aumailley, R. Timpl, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *210*, 911–921.

¹²⁵ B. Cacciari, G. Spalluto, *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 51–70.

¹²⁶ a) S. Caltabiano, W. T. Hum, G. J. Attwell, D. N. Gralnick, L. J. Budman, A. M. Cannistraci, F. J. Bex, *Biochem. Pharm.* **1999**, *546*, *58*, 1567–1578; b) H. Fujii, H. Komazawa, H. Mori, M. Kojima, I. Itoh, J. Murata, I. Azuma, I. Saiki, *Biol. Pharm. Bull.* **1995**, *18*, 1681–1688.

1 ha un valore di IC50 of $5 \cdot 10^{-4}$ nM mentre **2** $3.7 \cdot 10^{-7}$ nM: questi dati vanno a confermare che il composto con una distanza minore tra i farmacofori (**2**) risulta quello più affine all'integrina presa in esame. Sono state poi sintetizzati altri PMRI-CTP -RGD- mimetici e testati successivamente, oltre che su SK-MEL 24, anche su una linea cellulare (K-562) che esprime selettivamente il recettore $\alpha 5\beta 1$. Come già accennato nel capitolo precedente, le integrine $\alpha 5\beta 1$ costituiscono un target importante nello sviluppo di farmaci antitumorali, in quanto ne è dimostrata da anni la loro capacità antiangiogenesi. Attualmente non si è riusciti ad ottenere i raggi-X del sistema ligando-recettore e, quindi, non è possibile avere informazioni sul sito attivo del recettore utili per la costruzione di appropriati ligandi. Una possibile soluzione a questo problema è stata trovata conducendo studi di Docking in cui si utilizza un modello di recettore $\alpha 5\beta 1$, ricostruito grazie all'alta similarità ($\alpha v: \alpha 5$, 53% identity; $\beta 3: \beta 1$, 55%) con il recettore $\alpha v\beta 3$. Questo modello ipotetico è stato testato con successo sintetizzando una serie di molecole costruite sulla base delle indicazioni strutturali fornite dal modello stesso. E' quindi stato possibile risalire ad alcune caratteristiche fondamentali del sito recettoriale e, quindi, di conseguenza ad essere in grado di dare coordinate chiarificatrici nella sintesi di antagonisti per l'integrina $\alpha 5\beta 1$.^{127,128}

Riassumendo in breve un ligando attivo nell'inibizione di $\alpha 5\beta 1$ deve possedere un'estremità basica e un residuo carbossilico posizionati ad una distanza circa di 13Å; inoltre si deve considerare che la cavità recettoriale di $\alpha 5\beta 1$ rispetto a quella di $\alpha v\beta 3$ risulta più larga in particolare nella subunità β in cui due residui arginici sono sostituiti da amminoacidi meno ingombranti (il residuo Gly 217 sostituisce il residuo Arg-214, e il residuo Leu-219 sostituisce Arg-216). Questa espansione della cavità recettoriale permette l'introduzione di residui stericamente ingombrati e funziona da discriminante nella selettività di un ligando rispetto ai due tipi recettoriali presi in considerazione.

¹²⁷ L. Marinelli, A. Meyer, D. Heckmann, A. Lavecchia, E. Novellino, H. Kessler, J. Med. Chem. 2005, 48, 4166 – 4204.

¹²⁸ J. M. Smallheer, C. A. Weigelt, F. J. Woerner, J. S. Wells, W. F. Daneker, S. A. Mousa, R. R. Wexler, P. K. Jadhav, Bioorg. Med. Chem. Lett. 2004, 14, 383.

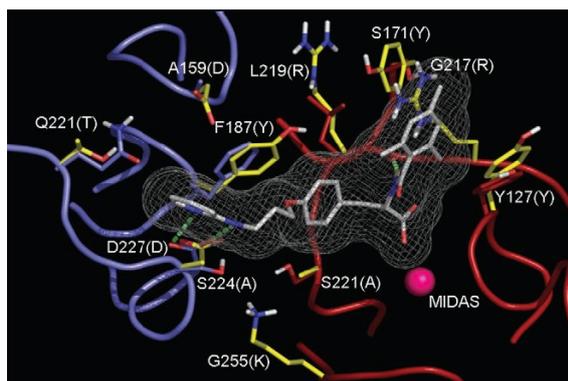


Fig.21 La tasca recettoriale di $\alpha 5\beta 1$ ($\alpha 5$ in blu e $\beta 1$ in rosso) con il ligando (in grigio). In giallo sono visualizzati i residui della tasca recettoriale di $\alpha v\beta 3$.

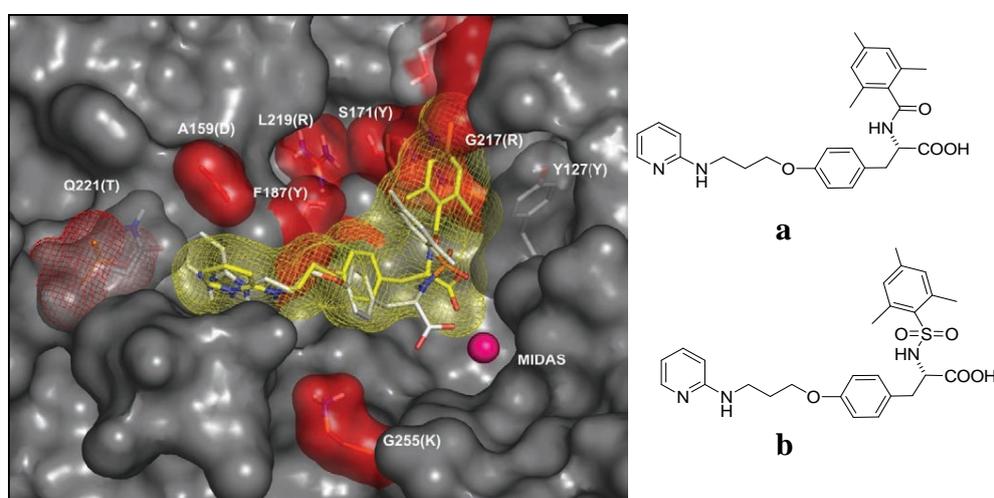


Fig.22

Sovrapposizione di $\alpha 5\beta 1$ (grigio) e $\alpha v\beta 3$ (rosso) e docking.

Analizzando un es. noto¹²⁹ in letteratura di inibitori di integrine progettati sulla base di questo modello, si nota che il gruppo carbossilico interagisce con il metallo (Mn^{2+} o Ca^{2+}) nella subunità β , mentre l'estremità basica interagisce con un residuo formando un legame-H con ($\alpha 5$)-Asp227.

Il docking dei composti **a** e **b** (**Fig.22**) mostra come la diversa orientazione del gruppo mesitilenico nei due composti determini una selettività a livello recettoriale: nel caso di **a** il residuo occupa uno spazio che solo l'integrina $\alpha 5\beta 1$ presenta, in quanto in $\alpha v\beta 3$ c'è la presenza di due residui Arg che impediscono un legame ligando-recettore efficiente. Inoltre la funzione mesitilenica interagisce idrofobicamente con il residuo Tyr127. Il composto **a** risulta quindi avere un $IC_{50}=2.5$ nM verso $\alpha 5\beta 1$ e $IC_{50}=703$ nM verso $\alpha v\beta 3$. Il composto **b** presenta

¹²⁹ Heckmann, D. Meyer, A. Marinelli, L. Zahn, G. Stragies, R. Kessler, H. 2007, **46**; 19, 3571-3574

un'orientazione del gruppo mesitilenico che non incide direttamente sulla selettività, infatti non va ad occupare la tasca recettoriale che differenzia l'integrina $\alpha 5\beta 1$ da $\alpha v\beta 3$, non ci sono interazioni idrofobiche e il risultato è una scarsa selettività, con preferenza per il recettore $\alpha v\beta 3$: IC₅₀=46 nM per $\alpha 5\beta 1$, IC₅₀= 4.6 nM per $\alpha v\beta 3$.

Sulla base di queste considerazioni abbiamo costruito una serie di CTP-PMRI, -RGD-mimetici, utilizzando come modello di partenza i composti **8** e **8'**, variando sia la stereochimica dei residui Asp e Arg, sia quella della diammina utilizzata (**Fig.21**) e utilizzando lo schema sintetico riportato in **Fig.22**.

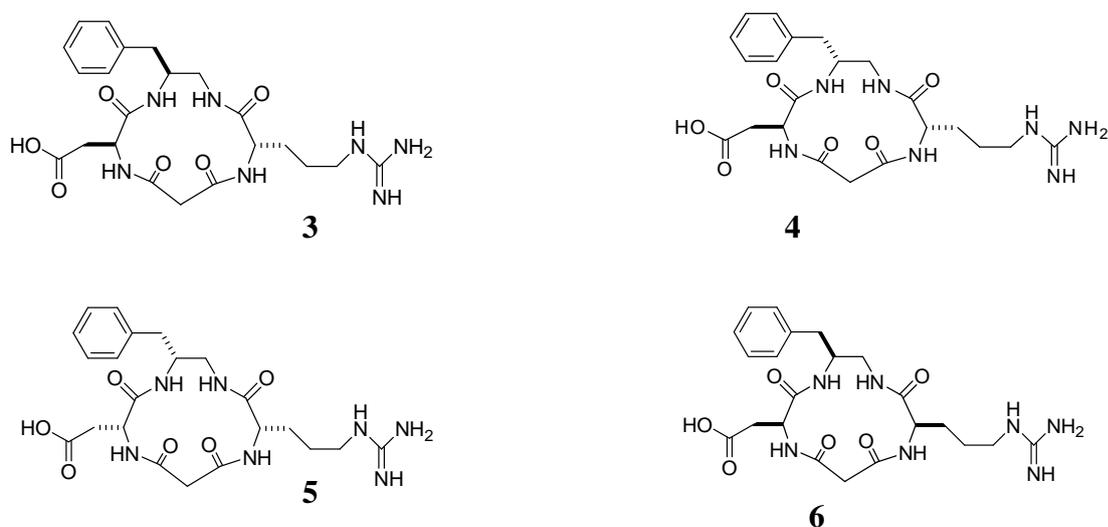


Fig.21

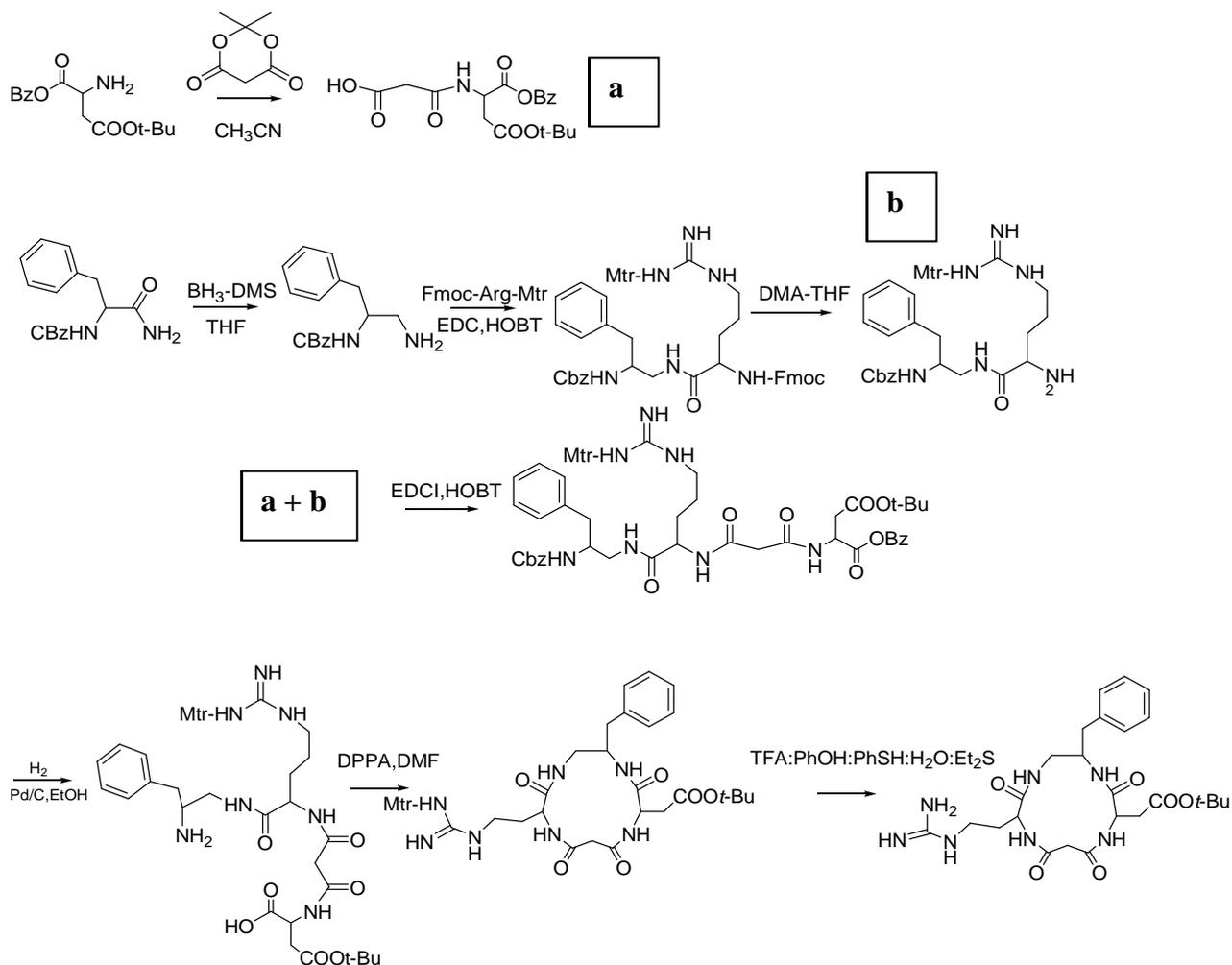


Fig.22

Successivamente i composti sono stati testati (Prof. Spampinato): L'attività biologica (**Fig.23**) è stata valutata tramite test di inibizione di adesione della fibronectina su cellule di melanoma (SK-MEL-24) e di eritroleucemia (K-562) che esprimono il recettore $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ e il recettore $\alpha\text{5}\beta\text{1}$

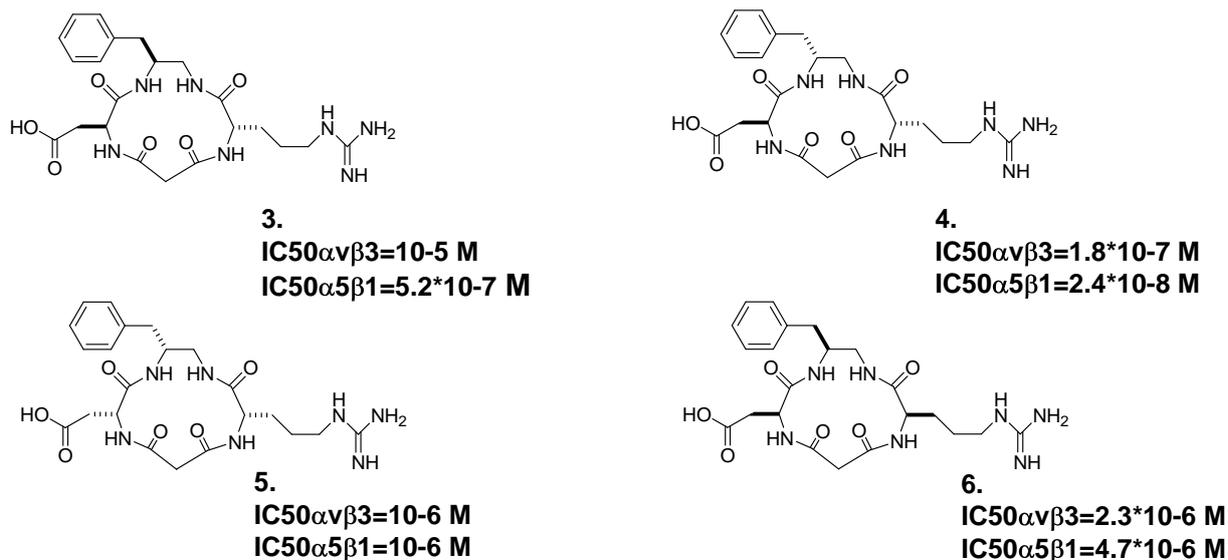


Fig.23

Da una prima analisi si nota come i composti 5 e 6 non siano certamente interessanti a livello di attività e selettività e ciò è dovuto alla disposizione spaziale non corretta dei farmacofori (residuo di Arg e Asp). Più interessanti risultano i composti 3 e 4, in particolare è da notare la selettività del composto 3 nei confronti dell'integrina $\alpha 5\beta 1$.

Analizzando la disposizione 3D di queste molecole (**Fig.24**) si può ipotizzare che la loro diversa selettività sia dovuta principalmente alla disposizione del residuo fenilico della diammina.

Nel caso di 3 la posizione dell'anello aromatico è in direzione opposta all'osservatore, in uno spazio in cui, all'interno del recettore $\alpha 5\beta 1$, è presente una tasca che può ospitare il residuo; tasca non presente invece nel caso dell'integrina $\alpha v\beta 3$ (vi sono due residui di Arg): questo andrebbe a giustificare lo scarso binding di 3 nei confronti del recettore $\alpha v\beta 3$ e la sua preferenza verso $\alpha 5\beta 1$.

Queste considerazioni sono in linea con i risultati di docking presenti in letteratura visti in precedenza.

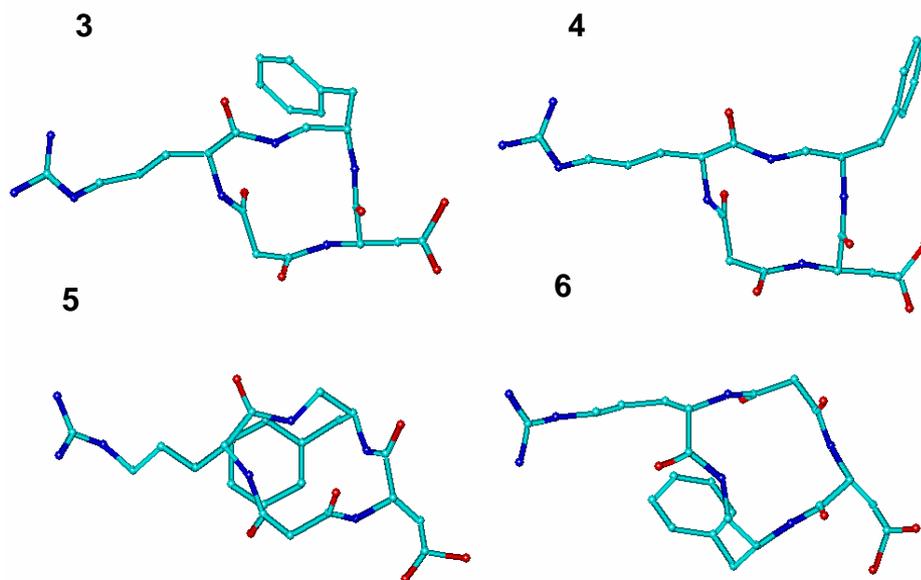


Fig.24

Per quanto riguarda il composto 4, la posizione del residuo fenilico non risulta determinante ai fini di una selettività recettoriale, in quanto la sua posizione (direzione verso l'osservatore) non favorisce un efficiente binding per $\alpha 5\beta 1$ rispetto ad $\alpha v\beta 3$.

Sia 3 sia 4 mostrano una disposizione 3D dei residui farmacoforici (Asp e Arg) per un binding ottimale rispetto ad entrambe le integrine, la discriminante risulta essere quindi la posizione del sostituente fenilico della diammina.

CAPITOLO 4

4.1 COMPOSTI OPIOIDI

Il ruolo e le proprietà dell'oppio, un lattice estratto dalla capsula matura del *Papaver Somniferum*, sono ormai noti da millenni, ma solo da 100 anni è stato possibile estrarre da questo composto una molecola essenziale per lo studio della terapia del dolore. La morfina (**Fig.1**) è una sostanza alcalina isolata più di un secolo fa, e da allora è considerata come lo standard di riferimento per tutti i farmaci con potenziale azione analgesica. Gli analgesici oppioidi (tra cui la morfina) sono dunque considerati tutti gli alcaloidi dell'oppio e derivati sintetici e semisintetici che inducono analgesia (cioè assenza del dolore) senza causare sonno o perdita di coscienza.

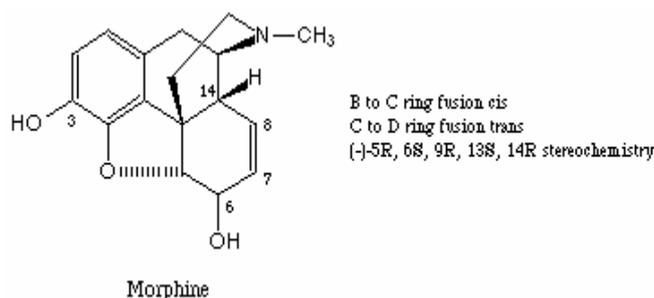


Fig 1 Struttura della morfina

Gli alcaloidi oppioidi, producono analgesia tramite un'azione a livello di regioni del cervello che contengono peptidi i quali hanno proprietà farmacologiche simili agli oppioidi stessi. Il termine generale usato per questi composti endogeni è "*peptidi oppioidi endogeni*"¹³⁰, in sostituzione del precedente termine di *endorfine*.

Lo studio dei peptidi oppioidi endogeni ha portato all'individuazione di specifici recettori con cui questi composti interagiscono, recettori localizzati nel cervello e in regioni del midollo spinale coinvolte nella trasmissione e nella modulazione del

dolore. Sono state identificate tre classi maggiori di recettori per gli oppioidi: recettori μ , δ e κ .

La morfina viene considerata come l'agonista oppioide prototipo per i recettori μ .

Gli effetti collaterali (dipendenza fisica e psichica, tolleranza, depressione respiratoria, costipazione, emesi), tuttavia ne limitano l'utilizzo clinico.

¹³⁰ G. Katzung "*Farmacologia generale e clinica*" V Ed. italiana PICCIN 2003

Per ovviare ad alcuni di questi effetti indesiderati, sono oggi di comune uso clinico altri agonisti dei recettori μ , come il *metadone* e il *fentanil* (alta selettività), *butorfanolo*, *etorfina*. Tuttavia anche l'utilizzo di questi farmaci presenta notevoli limitazioni, come la scarsa selettività recettoriale e stabilità metabolica, necessari per produrre gli effetti desiderati sull'organo bersaglio.

Nasce così l'esigenza di creare nuovi peptidi agonisti dei recettori μ da utilizzare come analgesici, che abbiano una stabilità biologica e una selettività recettoriale più alte, il minor numero possibile di effetti indesiderati e una ridotta tossicità a lungo termine.

4.2 RECETTORI DEI PEPTIDI OPIOIDI

I recettori degli oppioidi appartengono a una famiglia di recettori metabotropici detti recettori accoppiati alle proteine G: si tratta di recettori localizzati a livello della membrana cellulare e dotati di sette domini (o loop) che attraversano la membrana. Sono caratterizzati da un *dominio extracellulare* che riconosce uno specifico ligando, da una *regione intracellulare* caratterizzata da un motivo a 7 eliche transmembrana¹³¹ che attraversano il doppio strato fosfolipidico e, infine, da un *dominio intracellulare* responsabile della risposta al segnale e della sua amplificazione. L'interazione del ligando con la porzione amminoterminale nel dominio extracellulare induce una modifica conformazionale che permette al dominio citosolico del recettore di legarsi con una proteina G, associata alla faccia interna della membrana plasmatica. Le *proteine G* sono proteine eterotrimeriche ad attività GTPasica intrinseca composte da tre subunità distinte G_α , G_β e G_γ che allo stato inattivo sono unite tra loro. Esistono diverse isoforme delle subunità α , β e γ , e in particolare la proteina G accoppiata con i recettori oppioidi contiene la subunità $G_{\alpha i} / G_{\alpha o}$.

Sono stati identificati tre tipi di recettori oppioidi, μ , δ , κ . La loro clonazione avvenuta agli inizi del 1990, (δ del topo-DOR 1, μ -MOR 1 e κ -KOR 1), ha evidenziato che questi diversi recettori mostrano tra loro analogie per oltre il 60% della sequenza nucleotidica e un largo grado di omologie strutturali. Ci sono, infatti, sequenze altamente conservate, specialmente nelle eliche transmembrana e nel dominio intracellulare, che farebbero pensare ad una struttura secondaria comune.

Dopo osservazioni sulle diverse proprietà farmacologiche dei recettori dello stesso tipo, si è pensato all'esistenza di diversi sottotipi recettoriali (μ_1 , μ_2 , δ_1 , δ_2 , κ_1 , κ_2 , κ_3). Gli sforzi fatti per dimostrare l'esistenza di geni distinti sono falliti, ma recenti studi propongono l'ipotesi che i diversi sottotipi siano il risultato della dimerizzazione del recettore o della differente

¹³¹ Clementi, G. Fumagalli, "*Farmacologia generale e molecolare*", UTET

interazione con proteine accessorie. I segnali nocicettivi, vengono trasmessi attraverso il rilascio, dalle terminazioni della fibra sensitiva del dolore, della sostanza P, un neurotrasmettitore e neuromodulatore con attività eccitatoria. Mediante l'attivazione dei recettori NK, presenti sui neuroni della via spino-talamica, il segnale si propaga fino a risalire al tronco encefalico. I peptidi oppioidi al contrario determinano la regolazione della risposta analgesica allo stimolo nocicettivo.

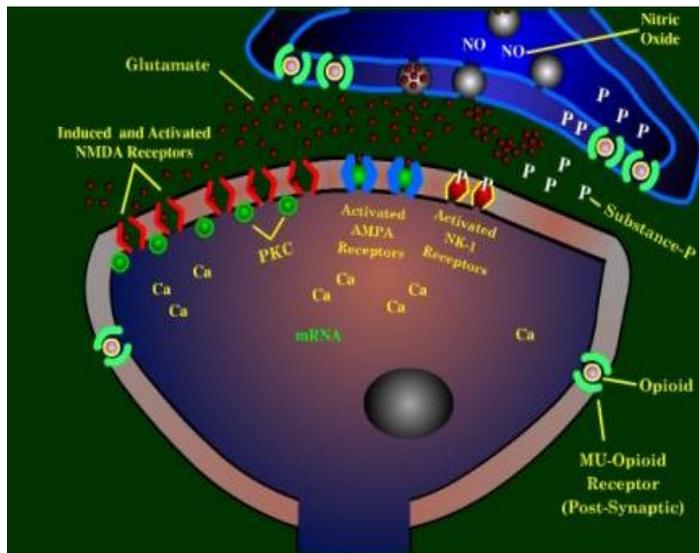


Fig .2 Attivazione del recettore oppioide

Il legame dell' agonista al recettore induce una modificazione conformazionale che favorisce lo scambio del nucleotide guanodifosfato (GDP), normalmente legato alla subunità α della proteina G allo stato di riposo, con il nucleotide guanotrifosfato (GTP). A questo punto la subunità α attiva, si dissocia dal complesso dimerico β - γ . Entrambe le subunità si dissociano dal recettore, diffondono e modulano le funzioni biologiche di diverse proteine effettrici. La subunità α inibisce l'adenilato ciclasi (AC), con conseguente diminuzione del livello di c-AMP facendo sì che la soglia dei canali voltaggio- dipendenti si sposti verso un potenziale più negativo e portando alla diminuzione dell'ampiezza della corrente entrante che controlla l'attività neuronale spontanea, diminuendone di conseguenza l'eccitabilità.

Inoltre la diminuzione della concentrazione di c-AMP, diminuisce la quantità del neurotrasmettitore sostanza P rilasciato agendo sulla proteina chinasi c-AMP-dipendente (PKA). La subunità β - γ attiva i canali del potassio, responsabili dell'uscita di ioni K^+ , e i canali del calcio, responsabili dell'entrata di ioni Ca^{2+} , creando iperpolarizzazione della membrana e conseguente riduzione dell'eccitabilità cellulare.

L'attivazione della subunità α termina con l'idrolisi del GTP a GDP e la riassociazione con il dimero β - γ per formare la proteina G eterotrimerica¹³²

L'unico membro della famiglia GPCR la cui struttura è stata determinata tramite raggi X è il recettore Rhodopsina¹³³. I modelli ricavati da questo recettore, da mutazioni puntiformi, da recettori clonati, dai recettori chimerici ecc. hanno permesso di ricavare informazioni strutturali su ORs, sia nello stato attivo e inattivo: ORs, come altri membri della famiglia GPCR si presenta sottoforma di complessi omo-oligomeric o etero-oligomeric e il responso farmacologico dei recettori è modulato e regolato da una serie di interazioni complesse.^{134,135,136} In generale il meccanismo di interazione di questi recettori è di difficile comprensione in quanto essi agiscono non isolati, ma interagendo con una miriade di altre proteine¹³⁷

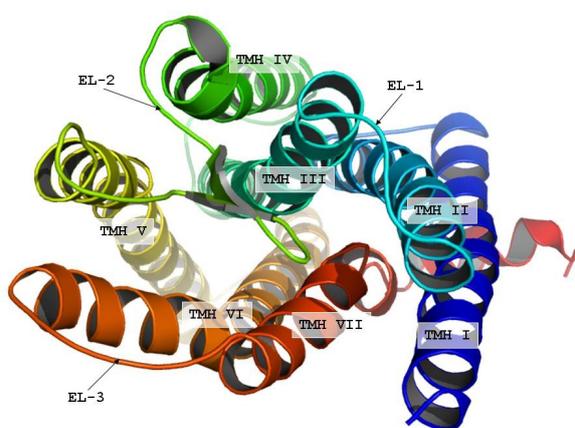


Fig 3 Rappresentazione tridimensionale del recettore oppioide μ .

¹³² Nelson e Cox "Principi di biochimica di Lehninger", III edizione, Zanichelli

¹³³ Palczewski, K.; Kumasaka, T.; Hori, T.; Behnke, C. A.; Motoshima, H.; Fox, B. A.; Le Trong, I.; Teller, D. C.; Okada, T.; Stenkamp, R. E.; Yamamoto, M.; Miyano, M. (2000) *Science*, **289**(5480), 739-745.

¹³⁴ Levac, B.A.R.; O'Dowd, B. F.; George, S. R. (2002) *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2**(1), 76-81

¹³⁵ Milligan, G.. (2004) *Mol. Pharmacol.*, **66**, 1-7.

¹³⁶ Devi, L. A. (2001) *Trends Pharmacol. Sci.*, **22**, 532-537.

¹³⁷ Presland, J. (2004) *Biochem. Soc. Trans.*, **32**(5), 888-891.

4.3 AGONISTI DEL RECETTORE OPIOIDE μ

La maggioranza dei composti analgesici normalmente utilizzati nella pratica ospedaliera sono agonisti derivati della morfina (Fig.1.4)

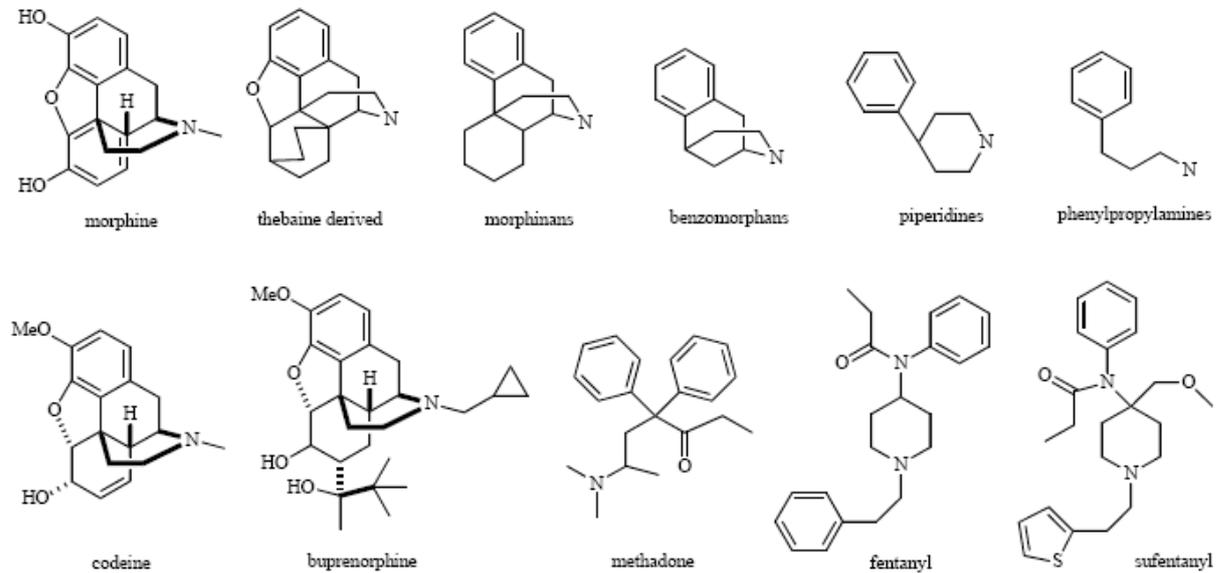


Fig.4

Inoltre vi sono diversi composti attivi verso il recettore oppioide δ e γ , ottenuti tramite la modificazione strutturale della morfina, che mostrano attività analgesica Fig.1.5

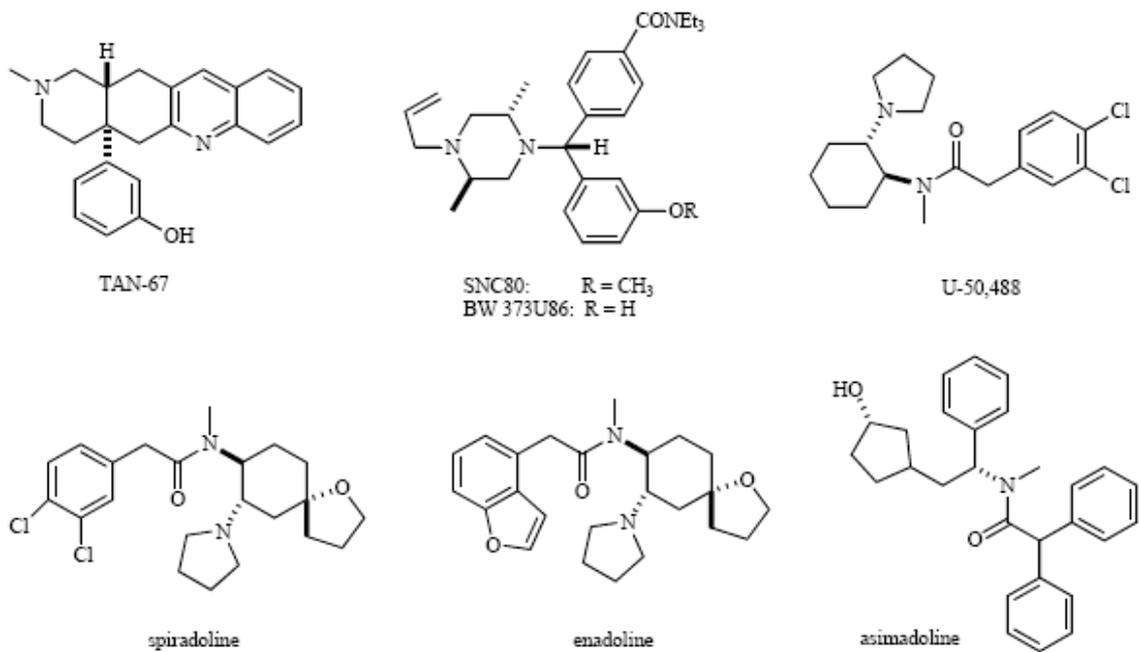


Fig.5

Tutti i composti mostrati sono comunque di origine non peptidica, esiste invece anche una larga schiera di composti di origine peptidica, in particolare, dopo le recenti scoperte di peptidi oppioidi endogeni. Questi ultimi non possono essere utilizzati nei trattamenti terapeutici per la loro nota incapacità di resistere alla degradazione enzimatica¹³⁸ La loro mancanza di effetti collaterali ha comunque portato a diversi studi su questi composti^{139,140}

I peptidi oppioidi dotati di attività analgesica meglio caratterizzati sono i pentapeptidi metionina-enkefalina (*met-enkefalina*) e leucina-enkefalina (*leu-enkefalina*), che sono stati i primi peptidi oppioidi endogeni ad essere stati isolati e purificati. Leu e met-enkefalina hanno un'affinità leggermente maggiore per il recettore oppioide δ che non per il μ . Due peptidi recentemente scoperti, la *endomorfina-1* e la *endomorfina-2*, hanno una selettività per i recettori μ estremamente elevata. Le proteine precursori principali sono la *preprooppiomelanocortina (POMC)*, la *preproenkefalina (proenkefalina A)*, e la *preprodinorfina (proenkefalina B)*.

La POMC contiene le sequenze di met-enkefalina, β endorfina, e di molti peptidi non oppioidi.

La preproenkefalina contiene sei copie di met-enkefalina e una copia di leu-enkefalina.

La preprodinorfina contiene molti peptidi oppioidi attivi che contengono la sequenza della leu-enkefalina. Tali molecole rappresentano i precursori dei peptidi oppioidi endogeni, e sono presenti in aree cerebrali coinvolte nella modulazione della percezione dolorosa (lamina I e II del midollo spinale, nucleo spinale del trigemino, sostanza grigia periacqueduttale).

Oltre all'effetto analgesico i peptidi oppioidi sono coinvolti in altre funzioni come il controllo di locomozione, fenomeni gastrointestinali, renali epatici, cardiovascolari, comportamentali.¹⁴¹

Lo studio e l'osservazione di queste molecole, ha portato all'identificazione iniziale di 3 principali classi di oppioidi endogeni, basata sulle analogie strutturali e funzionali: le enkefaline, le endorfine e le dinorfine. A queste tre classi iniziali è stata aggiunta quella più recente delle *endorfine* e quella della Nocicettina, peptide endogeno di recente scoperta (*noc/oFQ*)¹⁴² che mostra una buona selettività nei confronti di ORL1.

¹³⁸ Witt, K. A. Gillespie, T. J.; Huber, J. D.; Eggleton, R. D.; Davis, T.P.; *Peptides*, **2001**, 22, 2329-2343

¹³⁹ Przewlocki, R.; Przewlocka, B. *Eur. J. Pharmacol.*, **2001**, 429(1-3), 79-91.

¹⁴⁰ Fields, H. L. *Prog. Brain. Res.*, **2000**, 122, 245-253.

¹⁴¹ a) Wollemann, M.; Benyhe, S. *Life Sci.*, **2004**, 75(3), 257-270; b) Vaccarino, A. L.; Kastin, A. J. *Peptides*, **2001** 22(12), 2257-2328; c) McLay, R. N.; Pan, W.; Kastin, A. J. *Peptides*, **2001**, 22(12), 2181-2255; d) Drolet, G.; Dumont, E. C.; Gosselin, I.; Kinkead, R.; Laforest, S.; Trottier, J. F. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **2001**, 25(4), 729-741.

¹⁴² Barlocco, D.; Cignarella, G.; Giardina, G. A. M.; Toma, L. *Eur. J. Med. Chem.*, **2000**, 35(3), 275-282.

Tab. 1 Peptidi oppioidi endogeni

Endogenous peptide	Amino acid sequence	Precursor	Receptor affinity
β -Endorphin	YGGFMTSEKSQTPLVILFKNAIKNAYKKGE	Pro-opiomelanocortin	$\delta = \mu$
[Met]enkephalin [Leu]enkephalin Metorphinamide	YGGFM YGGFL (YGGFMRF, YGGFMRGL) YGGFMRRV-NH ₂	Pro-enkephalin	$\delta \gg \mu$
Dynorphin A Dynorphin A(1-8) Dynorphin B α -neoendorphin β -neoendorphin	YGGFLRRIRPKLKWDNQ YGGFLRRI YGGFLRRQFKVVT YGGFLRKYPK YGGFLRKYP	Pro-dynorphin	$\kappa \gg \mu = \delta$
Nociceptin	FGGFTGARKSARKLANQ	Pro-nociceptin / OFQ	ORL
Endomorphin-1 Endomorphin-2	YPWF-NH ₂ YPPF-NH ₂	(Awaiting discovery)	μ

Le endomorfine-1 e -2 sono uniche sia per la struttura che per l'alta affinità per i recettori μ e sono considerate reali analgesici endogeni nei mammiferi rilasciati in seguito a stimoli dolorifici.^{143,144}

Ci sono poi evidenze sperimentali che portano a dissociare la loro efficacia analgesica da effetti collaterali immunomodulatori, cardiovascolari e respiratori.^{145,146} I due peptidi giocano un ruolo diverso nell'antinocicezione: l'endomorfina-1 (Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂) è ampiamente distribuita a livello centrale, mentre l'endomorfina-2 (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂) è maggiormente presente nelle regioni terminali dei neuroni afferenti nel corno dorsale del midollo spinale e della medulla. Recentemente in letteratura sono comparsi numerosi lavori che appoggiano la teoria che i diversi effetti farmacologici delle endomorfine siano mediati dai diversi sottotipi recettoriali μ , in particolare l'interazione con il recettore μ_1 media l'effetto antinocicettivo, mentre quella con il recettore μ_2 è responsabile della diminuzione del transito intestinale. Dal punto di vista strutturale i peptidi oppioidi sono formati da due parti biologicamente importanti: un tri- o tetrapeptide all'estremità N-terminale, detto *sequenza messaggio* e un frammento all'estremità C-terminale, *sequenza indirizzo*.

¹⁴³ Zadina, J. E.; Hackler, L.; Ge, L. J.; Kastin, A. J. *Nature*, **1997**, 386, 499-502.

¹⁴⁴ Horvath, G. *Pharmacol. Ther.*, **2000**, 88, 437-463.

¹⁴⁵ Carrigan, K. A.; Nelson, C. J.; Lysle, D. T. *Psychopharmacology*, **2000**, 151(4), 299-305.

¹⁴⁶ Czapla, M. A.; Gozal, D.; Alea, O. A.; Beckerman, R. C.; Zadina, J. E. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, **2000**, 162(3-1), 994-999.

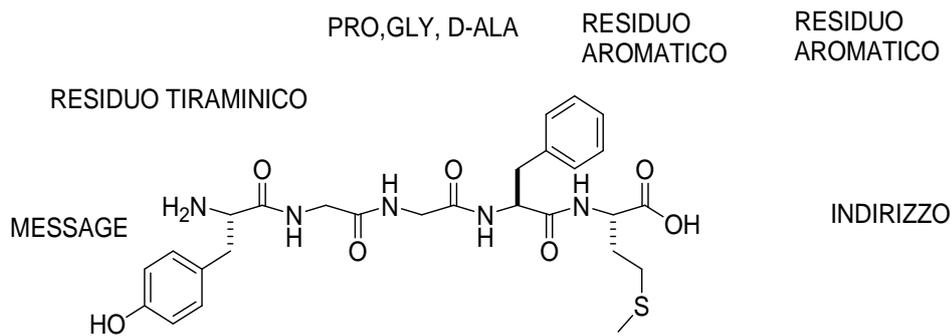


Fig. 6 Met – enkephalin: Modello farmacoforico

Il confronto tra diversi ligandi sia endogeni che sintetici, mostra che la sequenza messaggio necessita di specifici requisiti per una buona interazione con i recettori oppioidi.

In particolare:

- la presenza del gruppo amminico e fenolico della Tyr in posizione 1 gioca un ruolo chiave nel riconoscimento del recettore oppioide;
- appropriate spaziature in posizione 2 come ad es. la Gly, Pro e la D-Ala (di sintesi). In particolare, l'importanza della Pro è legata probabilmente alla sua capacità di determinare il ripiegamento della molecola, atto a garantire il corretto orientamento degli altri residui;
- residui lipofili e aromatici in posizione 3 e 4;

Inoltre l'amidazione all'estremità C-terminale è una caratteristica molto importante per determinare la stabilità peptidica.

4.4 PEPTIDOMIMETICI OPPIOIDI

Esiste un enorme numero di ligandi peptidomimetici^{147,148} e non-peptidomimetici^{149,150}, costruiti per ricercare un aumento di selettività e affinità recettoriale e biodisponibilità, alcuni esempi sono riportati in Fig.1.7. Altri peptidomimetici degni di nota sono degli analoghi dell'endomorfine come EM contenenti D amminoacidi¹⁵¹, EM2 in forma di dimero palindromico [Tyr-Pro-Phe-Phe-NH-CH₂-CH₂]-₂,¹⁵², peptidi contenenti la D-Pro e homo-Pro al posto di Pro₂, H-Tyr-D-(R)-Pro-Trp-PheNH₂,¹⁵³ e H-Tyr-D-(S)-homoPro-Trp-PheNH₂,¹⁵⁴ etc.

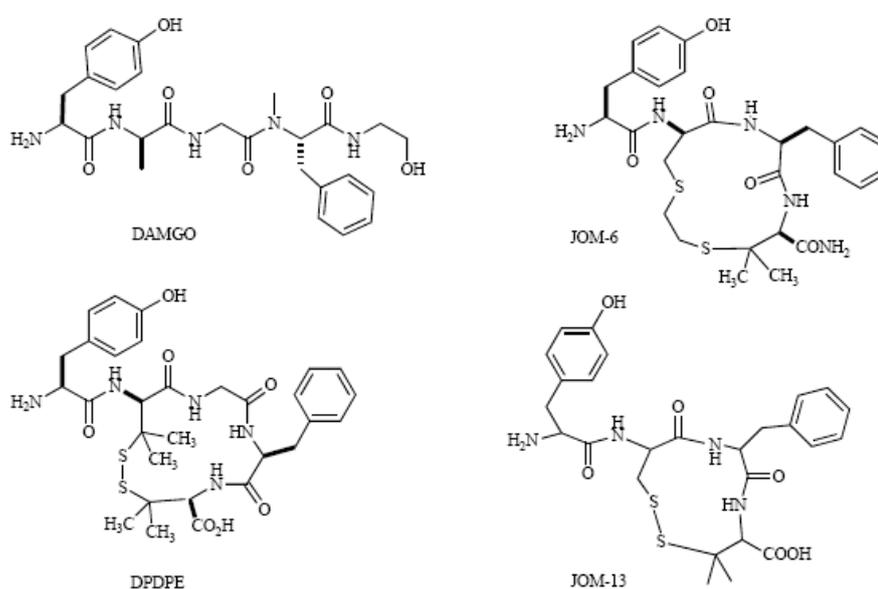


Fig.7

¹⁴⁷ Schiller, P. W. (1991) *NIDA Res. Monogr.*, **112**, 180-197.

¹⁴⁸ Janecka, A.; Kruszynski, R. *Curr. Med. Chem.*, **2005**, *12*, 471- 481.

¹⁴⁹ Kaczor, A.; Matosiuk, D. *Curr. Med. Chem.*, **2002**, *9*(17), 1567-1589.

¹⁵⁰ Lipkowski, A. W.; Misicka, A.; Carr, D. B.; Ronsisvalle, G.; Kosson, D.; Bonney, I. M. *Pure Appl. Chem.*, **2004**, *76*(5), 941-950.

¹⁵¹ Paterlini, M. G.; Avitabile, F.; Ostrowski, B. G.; Ferguson, D. M.; Portoghese, P. S. *Biophys. J.*, **2000**, *78*(2), 590-599.

¹⁵² Gao, Y. Liu, X.; Wei, J.; Zhu, B.; Chena, Q.; Wang, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 1847-1850

¹⁵³ Cardillo, G.; Gentilucci, L.; Melchiorre, P.; Spampinato, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, *10*, 2755-2758.

¹⁵⁴ Cardillo, G.; Gentilucci, L.; Qasem, A. R.; Sgarzi, F.; Spampinato, S. *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 2571-2578

4.5 INTERAZIONE AGONISTA-RECETTORE OPIOIDE

Il design razionale di nuovi analgesici richiede una comprensione dettagliata dei meccanismi di interazione ligando-recettore nel processo di attivazione. In generale il miglior approccio è quello di partire dalla determinazione della struttura ligando-recettore tramite i raggi X, ma, in questo specifico caso non è stato possibile sperimentalmente ricavare informazioni in tal senso. La maggioranza delle conoscenze è stata quindi ottenuta da studi di correlazione struttura attività (SAR). Per quanto riguarda i peptidomimetici si è iniziato ad inserire delle restrizioni a livello strutturale nei peptidi endogeni che hanno portato ad una migliore conoscenza dei requisiti conformazionali e topologici di un ligando attivo, soprattutto a livello di disposizione tridimensionale dei suoi farmacofori.^{155,156}

La conformazione di questi peptidi è stata principalmente determinata tramite spettroscopia NMR eseguita in solventi biomimetica ed esperimenti di Modellistica Molecolare. Altri metodi utilizzati sono il dicroismo circolare¹⁵⁷, l'IR e FRET.

Un altro metodo che ha fornito importanti informazioni è l'analisi dei peptidi oppioidi nell'ambiente di membrana¹⁵⁸: ad es. encefalite, dinorfine e β -endorfine assumono strutture ordinate.

Come già detto in precedenza, la tecnica che si è rivelata più efficace nel descrivere il legame recettore-ligando è il DOCKING: si parte da informazioni strutturali del recettore ricavate da mutagenesi selettive dei residui amminoacidici, da legami di ligandi fotosensibili o in grado di fissarsi irreversibilmente al recettore¹⁵⁹; si costruisce un modello del recettore basato sul recettore GPCR-Rodopsina¹⁶⁰ e si calcolano poi le orientazioni dei vari ligandi, determinando così i residui amminoacidici coinvolti¹⁶¹

¹⁵⁵ Hruby, V. J.; Agnes, R. S. *Biopolymers*, **1999**, *51*, 391-410.

¹⁵⁶ Filizola, M.; Villar, H. O.; Loew, G. H. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **2001**, *15*, 297-307.

¹⁵⁷ Lankiewicz, L.; Malicka, J.; Wiczak, W. *Acta Biochim. Pol.*, **1997**, *44*, 477-489.

¹⁵⁸ Naito, A.; Nishimura, K. *Curr. Topics Med. Chem.*, **2004**, *4*, 135-145

¹⁵⁹ Medzihradszky, K. *J. Peptide Sci.*, **2003**, *9*, 333-353.

¹⁶⁰ Strahs, D.; Weinstein, H. *Protein Eng.*, **1997**, *10*, 1019-1038. ; b) Sagara, T.; Egashira, H.; Okamura, M.; Fujii, I.; Shimohigashi, Y.; Kanematsu, K. *Bioorg. Med. Chem.*, **1996**, *4*, 2151-2166. c) Filizola, M.; Laakkonen, L.; Loew, G. H. *Protein Eng.*, **1999**, *12*, 927-942.

¹⁶¹ Mosberg, H. I.; Fowler, C. B. *J. Pept. Res.*, **2002**, *60*, 329-335. b) Subramanian, G.; Paterlini, M. G.; Portoghese, P. S.; Ferguson, D. M. *J. Med. Chem.*, **2000**, *43*, 381-391.

4.6 MECCANISMO DI INTERAZIONE DI AGONISTI DEL RECETTORE OPIOIDE

μ .

Sono stati condotti studi approfonditi sull'analisi conformazionale di peptidi come l'Endomorfina e la morficcina e i loro corrispettivi analoghi con restrizioni strutturali: è stato possibile stabilire che una certa distanza tra i residui aromatici (11-12 Å) rappresenta un requisito fondamentale per l'attività e la selettività¹⁶².

Per quanto riguarda l'orientazione dei farmacofori, i dati raccolti suggeriscono la presenza di un angolo trans χ -Tyr¹⁶³ e di un'orientazione g(-) per χ -Trp¹⁶⁴. La conformazione della Phe è stata recentemente discussa sulla base di EM analoghi contenenti (2S,3S)- β -MePhe4, che mostrano una conformazione (g-) di χ -Phe¹⁶⁵.

In Fig.1.6 si mostra il meccanismo di interazione del ciclopeptide JOM-6¹⁶⁶ ricavato da studi di Docking: l'ammina protonabile della Tyr (farmacoforo primario) interagisce con il residuo carbossilico di Asp-147 presente in TM-III sul fondo della tasca del recettore, mentre il gruppo OH fenolico forma interazioni ioniche o legami-H con una His-297 dell'elica TM-VI. La rimanente porzione del ligando occupa la regione periferica ed è responsabile della specificità verso il sottotipo recettoriale.

Per quanto riguarda la Morfina¹⁶⁷ il modello postulato prevede un'interazione ionica tra l'ammina terziaria e Asp147 dell'elica TM-III, un'interazione idrofobica tra il gruppo fenolicodella morfina e quello della Tyr299 in TM-VI, inoltre vi è un legame-H tra il gruppo -OH fenolico della morfina e di entrambi gli ammino gruppi della Lys303 di TM-VI e l'OH di Tyr 48 di TM-III.

Un modello alternativo¹⁶⁸ prevede l'interazione di OH fenolico dell'anello A con His297 di TM-VI (interazione simile del residuo OH fenolico dei peptidi oppioidi).

¹⁶² Podlogar, B. L.; Paterlini, M. G.; Ferguson, D. M.; Leo, G. C.; Demeter, D. A.; Brown, F. K.; Reitz, A. B. *FEBS Lett.*, **1998**, *439*, 13-20. b) Janecka, A.; Fichna, J.; Mirowski, M.; Janecki, T. *Mini Rev.Med. Chem.*, **2002**, *2*, 565-572.

¹⁶³ Grieco, P.; Giusti, L.; Carotenuto, A.; Campiglia, P.; Calderone, V.; Lama, T.; Gomez-Monterrey, I.; Tartaro, G.; Mazzoni, M. R.; Novellino, E. *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 3153-3163.

¹⁶⁴ Podlogar, B. L.; Paterlini, M. G.; Ferguson, D. M.; Leo, G. C.; Demeter, D. A.; Brown, F. K.; Reitz, A. B. *FEBS Lett.*,**1998**, *439*, 13-20. b) Fiori, S.; Renner, C.; Cramer, J.; Pegoraro, S.; Moroder, L. *J. Mol. Biol.*, **1999**, *291*, 163-175.

¹⁶⁵ Tomboly, C.; Kover, K. E.; Peter, A.; D.;Tourwe, Biyashev, D.; Benyhe, S.; Borsodi, A.; Al-Khrasani, M.; Ronai, A. Z.; Toth, G. (2004) *J. Med. Chem.*, **47**(3), 735-743.

¹⁶⁶ Mosberg, H. I.; Fowler, C. B. *J. Pept. Res.*, **2002**, *60*, 329-335.

¹⁶⁷ Sagara, T.; Egashira, H.; Okamura, M.; Fujii, I.; Shimohigashi, Y.; Kanematsu, K. *Bioorg. Med. Chem.*,**1996**, *4*, 2151-2166.

¹⁶⁸ Pogozheva, I. D.; Lomize, A. L.; Mosberg, H. I. *Biophys. J.*, **1998**, *75*, 612-634.

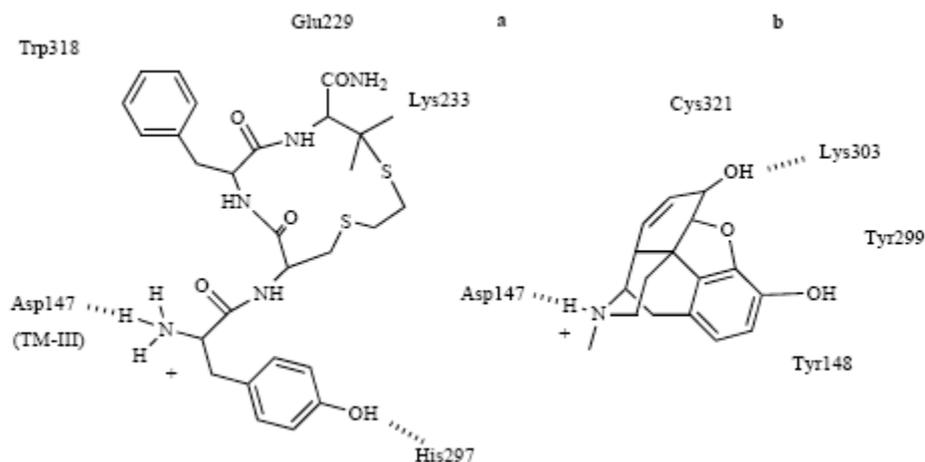


Fig.8

4.7 COMPOSTI OPIOIDI NON CONVENZIONALI

Sono stati recentemente riportati agonisti oppioidi attivi che non presentano i requisiti farmacoforici essenziali illustrati in precedenza: ad es. è stato dimostrato che l'OH fenolico della tiroxina non ha un ruolo critico nell'interazione con il recettore oppioide μ ; la trasposizione infatti di Tyr con Phe dà un analogo YkFA Tyr-c[D-Lys-Phe-Ala] avente la Phe in posizione 1. Il nuovo composto si mostra agonista verso μ e δ , con una minore affinità ma una più alta selettività di YkFA¹⁶⁹

Lo stesso residuo scambiato nel composto JOM-6 Tyr-c[D-Cys-Phe-D-Pen]NH₂ (Et) dà un'agonista μ OR con un' affinità¹⁷⁰ leggermente inferiore. In altri casi, la modificazione strutturale dell'OH fenolico può produrre un peptide con una buona affinità, confermando il fatto che questo farmacoforo non costituisce una causa primaria nell'interazione ligando-recettore¹⁷¹.

Una modificazione più drammatica riguarda la rimozione dell'ammino gruppo protonabile, considerato un farmacoforo primario. Esistono una serie di composti che privati di questo residuo mantengono una certa abilità nel legarsi al recettore : una serie cicloesapeptidi derivati dalla β -casomorfina **3** , in cui l'ammino gruppo è stato eliminato o formilato , risultano antagonisti

Il ciclopeptide **4** si comporta da antagonista¹⁷²

¹⁶⁹ Burden, J. E.; Davis, P.; Porreca, F.; Spatola, A. F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004** *9*, 3441-3446.

¹⁷⁰ Mosberg, H. I.; Ho, J. C.; Sobczyk-Kojiro, K. *Bioorg. Med.Chem. Lett.*, **1998**, *8*, 2681-2684.

¹⁷¹ Dolle, R. E.; Machaut, M.; Martinez-Teipel, B.; Belanger, S.; Cassel, J. A.; Stabley, G. J.; Graczykb, T. M.; DeHaven, R. N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, *14*(13), 3545-3548.

¹⁷² Schiller, P. W.; Berezowska, I.; Nguyen, T. M.-D.; Schmidt, R.; Lemieux, C.; Chung, N. N.; Falcone-Hindley, M. L.; Yao, W.; Liu, J.; Iwama, S.; Smith, A. B., III; Hirschmann, R. J. *Med. Chem.*, **2001**, *43*(4), 551-559.

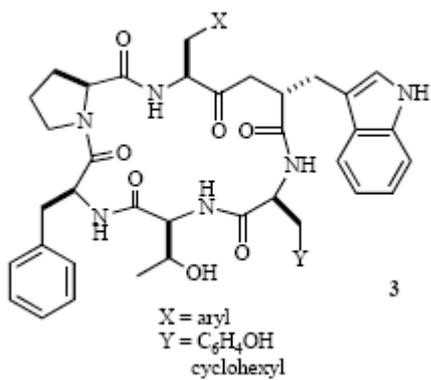


Fig.9

La sostituzione di Tyr con il gruppo PhCH_2OCOO dà il peptide $\text{PhCH}_2\text{OC(O)-Pro-Trp-PheNH}_2$ (5), che mostra attività nanomolare per μ^{173} .

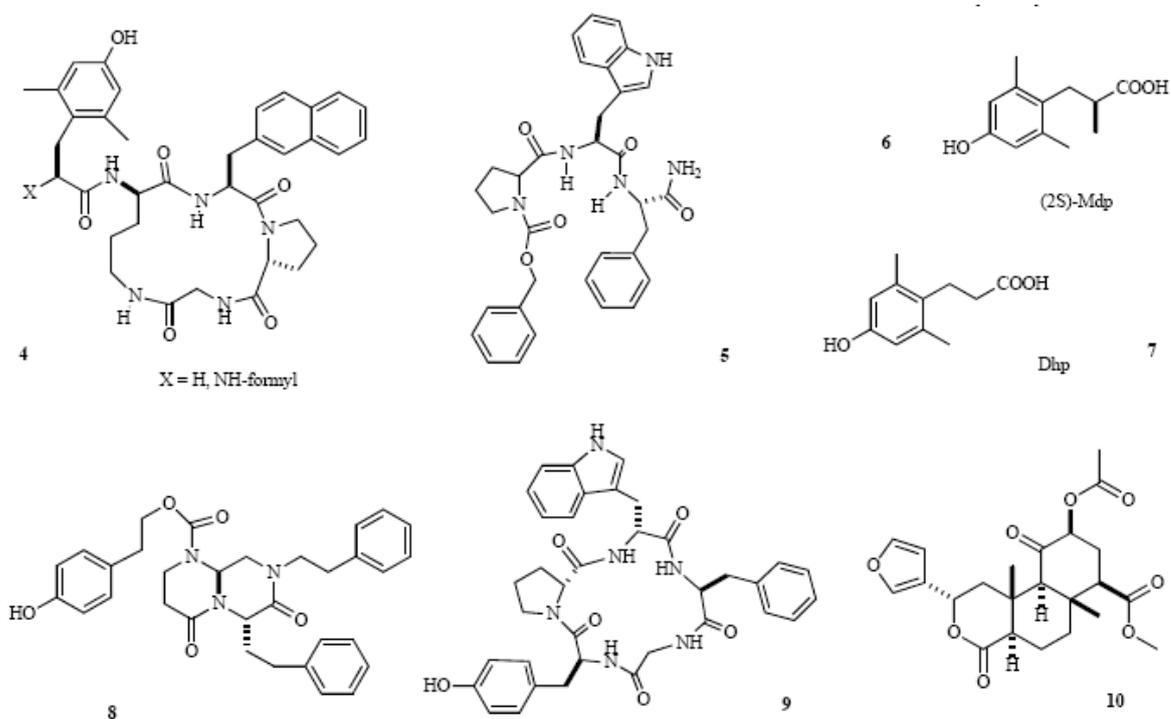


Fig.10

¹⁷³ Cardillo, G.; Gentilucci, L. Tolomelli, A.; Qasem, A. R.; Spampinato, S.; Calienni, M. *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, *1*, 3010- 3014.

In questi ultimi esempi si dimostra come i composti privati del gruppo NH passino da un'attività di agonisti ad antagonisti, tuttavia negli ultimi anni sono stati scoperti composti che pur privi di un N protonabile si mostrano agonisti:

Il composto biciclico (**8**) è selettivo nei confronti di μ -OR, l'analogo ciclico di c[YpwFG] (**9**), e il diterpene neoclerodano salvinorina è κ -selettivo (**10**).

Sulla base delle analisi 2D-NMR e computazionali di Meccanica Molecolare si nota una certa sovrapposizione della struttura di **1** con un β -turn di tipo III della trans EM-1. In accordo con questa parziale sovrapposizione e la selettività verso MOR si pensa che l'interazione di **8** con il recettore possa mimare quello che farebbero EM-1 o le encefaline, sebbene non vi sia un'interazione ionica.

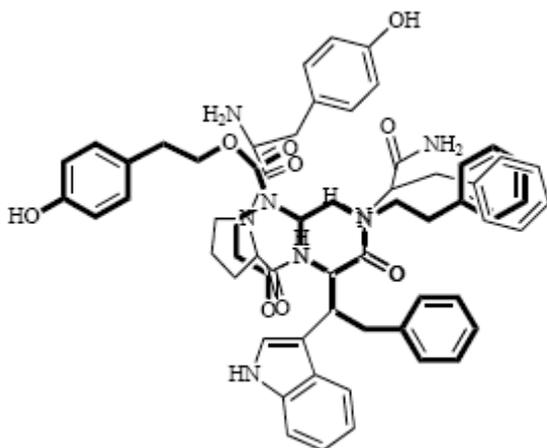


Fig.11

La Salvinorina A (**9**) un allucinogeno naturale isolato dalla *Salvia Divinorum*¹⁷⁴ è l'unico agonista KOR completamente privo di un N protonabile. Sono stati ipotizzati diversi modelli di interazione con il recettore, anche utilizzando degli analoghi della salvinorina.¹⁷⁵

Per quanto riguarda **10**, c[YpwFG], mostra una buona affinità verso MOR ed un comportamento agonista (forskolin-stimulated cAMP production inhibition test)¹⁷⁶. I peptidi ciclici sono stati largamente usati come strutture conformazionalmente limitate, per orientare il

¹⁷⁴ Yan F, Roth BL. *Life Sci.*, **2003**, *75*, 2615–2619.

¹⁷⁵ Yan F, Mosier PD, Westkaemper RB, Stewart J, Zjawiony JK, Vortherms TA, Sheffler DJ & Roth BL, *Biochem.*, **2005**, *44*, 8643–8651. b) Beguin C, Richards MR, Wang Y, Chen T, Liu-Chen LY, Ma Z, Lee DYW, Carlezon WA Jr & Cohen BM. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, *15*, 2761–2765. c) Harding WW, Tidgewell K, Byrd N, Cobb H, Dersch CM, Butelman ER, Rothman RB & Prisinzano TE *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 4765–4771. d) Kane BE, Nieto MJ, McCurdy CR, & Ferguson DM. *FEBS J*, **2006**, *273*, 1966–1974

¹⁷⁶ Cardillo G, Gentilucci L, Tolomelli A, Spinosa R, Calienni M, Qasem AR, Spampinato S. *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 5198-5203.

gruppo farmacoforico in posizioni diverse, e in particolare pentapeptidi ciclici contenenti uno o due aminoacidi della serie D sono stati utilizzati con successo nella produzione di modelli β - o γ -turn. L'ipotesi che i derivati dell'EM-1 possano adottare al recettore una struttura ripiegata stabilizzata da vari tipi di γ - o β -turns, è stata oggetto di studio¹⁷⁷.

¹⁷⁷ Leitgeb B, Szekeres A, Toth G. *J. Pept. Res.*, **2003**, 62, 145-157.

CAPITOLO 5

5.1 PENTAPEPTIDI CICLICI COME AGONISTI ATIPICI DEL RECETTORE OPIOIDE μ

Ciclopeptidi sono stati ampiamente utilizzati come strutture conformazionalmente rigide utili¹⁷⁸ per direzionare in maniera definita i farmacofori nello spazio, in particolare pentapeptidi ciclici contenenti uno o due amminoacidi sono stati utilizzati con successo come modelli di β - or γ - turn.¹⁷⁹

L'ipotesi che i derivati dell' EM-1 possono adottare strutture ripiegate stabilizzate da γ - or β -turns sono state riportate in studi recenti.¹⁸⁰

Negli anni passati abbiamo sintetizzato una library di pentapeptidi ciclici stereoisomerici basati sulla sequenza di EM-1 (**Fig.1**), contenenti amminoacidi della serie D e L¹⁸¹. (**Tab.1**); questi analoghi di EM-1, essendo peptide ciclici, mostrano una maggiore stabilità all'idrolisi enzimatica e una maggiore capacità di attraversare le barriere biologiche¹⁸².

Il composto *c*[YpwFG], illustrato già in precedenza, ha mostrato buona attività e carattere agonista pur essendo privo del residuo N protonabile.

¹⁷⁸ Kessler H *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 512-523.

¹⁷⁹ Dechantsreiter MA, Planker E, Matha B, Lohof E, Holzemann G, Jonczyk A, Goodman SL, & Kessler H. *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 3033-3040 b) Tamamura H, Mizumoto M, Hiramatsu K, Kusano S, Terakubo S, Yamamoto N, Trent J-O, Wang Z, Peiper S C, Nakashima H, Otaka H, Fujii N. *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, *2*, 1255-

1257. c) Weisshoff, H.; Prasang, C.; Henklein, P.; Frommel, C.; Zschunke, A.; Mugge, C. *Eur.*

J. Biochem. **1999**, *259*, 776-788, and references therein. d) Wermuth J, Goodman L, Jonczyk A, Kessler H. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1328-1335, and references therein.

¹⁸⁰ Gentilucci L, Tolomelli A *Curr. Topics Med. Chem.* **2004**, *4*, 105-121.

Leitgeb B, Szekeres A, Toth G, *J. Pept. Res.* **2003**, *62*, 145-157.

¹⁸¹ Beguin C, Richards MR, Wang Y, Chen T, Liu-Chen LY, Ma Z, Lee DYW, Carlezon WA Jr & Cohen BM. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, *15*, 2761-2765.

¹⁸² Harding WW, Tidgewell K, Byrd N, Cobb H, Dersch CM, Butelman ER, Rothman RB & Prinszano TE. *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 4765-4771. a) Kane BE, Nieto MJ, McCurdy CR, & Ferguson DM. *FEBS J*, **2006**, *273*, 1966-1974 b) Cardillo G, Gentilucci L, Tolomelli A, Spinosa R, Calienni M, Qasem AR, Spampinato S

J. Med. Chem., **2006**, *47*, 5198-5203.

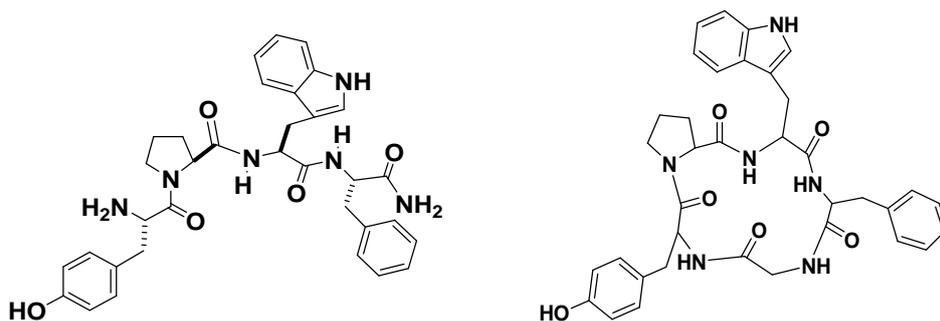


Fig.1

Tab.1

a.a.	KI	IC50 (mM)	a.a.	KI	IC50 (mM)
Config.	(mM)		Config.	(mM)	
LLLL	27	29	DDDD	18	240
DLLL	15	19	LDDD	2.7	3.2
LDLL	2.9	3.8	DLDD	11	14
LLDL	36	45	DDLD	230	102
LLLD	30	32	DDDL	3.8	5.2
DDLL	nd	nd	LLDD	nd	nd
DLDL 1	23	29	LDLD	32	39
DLLD 3	6.6	8.1	<u>LDDL 3</u>	<u>0.034</u>	<u>0.044</u>

Per la struttura atipica e il comportamento lipofilo sono stati condotti studi per provare come **c[YpwFG]** possa interagire con il recettore. E' stata sintetizzata e testata una nuova mini-library di ciclopeptidi derivati da **3** e successivamente è stato condotto uno studio computazionale (NMR,MD, Docking) volto ad investigare la possibile orientazione biologicamente attiva del peptide nella tasca recettoriale. Utilizzando un modello riconosciuto di MOR si sono esplorate inizialmente le possibili posizioni di binding del ligando nell'ambiente recettoriale rigido; successivamente le soluzioni ottenute da questo docking sono state ottimizzate attraverso un approccio combinato QM/MM, usando un ambiente recettoriale flessibile che permette di simulare l'adattamento recettoriale una volta avvenuto il binding con il ligando (induced fit). La conformazione adottata in DMSO dal composto esaminato, ricavata

tramite studi H¹-NMR (ROESY, VT-NMR) è stata utilizzata come struttura iniziale per il processo di docking (Autodock)¹⁸³, senza una specificazione prioritaria del sito di binding (blind-docking). Questa tecnica permette di rilevare i siti e i modi possibili di binding del peptide attraverso la ricerca dell'intera superficie della proteina target considerata¹⁸⁴.

Le orientazioni potenziali sono state valutate usando l'ottimizzazione del complesso con QM/MM fornendo una più dettagliata descrizione del processo di binding e delle proprietà elettroniche e steriche del ligando c[YpwFG].¹⁸⁵

5.2 SINTESI E CARATTERIZZAZIONE FARMACOLOGICA DEI CICLOPEPTIDI c[YpwFXaa].

Il ciclopeptide **3** è stato sintetizzato, come illustrato in precedenza, come membro di una serie di EM-1 analoghi conformazionalmente rigidi, aventi il primo e quarto residuo connessi tramite un semplice amminoacido Gly¹⁸⁶

Queste strutture mostrano spesso un certo grado di flessibilità, in particolare per la presenza della Gly¹⁸⁷, questa flessibilità porta ad un equilibrio conformazionale tra differenti strutture che non influisce nel processo di interazione con il recettore, permettendo al peptide di adattarsi alla cavità recettoriale. Questa libertà conformazionale è responsabile della possibilità che il ciclopeptide possa adottare diverse conformazioni biologicamente attive.

Nell'ottica di ottenere maggiori informazioni riguardo la conformazione biologicamente attiva è stato sintetizzato un altro set di ciclopeptidi aventi la stessa sequenza YpwF come **3** e differenti amminoacidi come Xaa nella posizione 5 al posto di Gly (**Fig. 2**).

¹⁸³ Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK & Olson AJ. *J. Comp. Chem.* **1998**, *19*, 1639-1662.

¹⁸⁴ Hetenyi C, van der Spoel D. *Protein Sci.*, **2002**, *11*, 1729-1737. b) Hetenyi C, van der Spoel D *FEBS Lett.*, **2006**, *580*, 1447-1450.

¹⁸⁵ Gao J, 1992, Volume 7, (Lipkowitz KB & Boyd DB, eds) 119, VCH, New York. b) Zhang Y, Lee T, Yang. J. *Chem. Phys.* 1999, *110*, 46-54.

¹⁸⁶ Cardillo G, Gentilucci L, Tolomelli A, Spinosa R, Calienni M, Qasem AR, Spampinato S., *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 5198-5203.

¹⁸⁷ Kessler H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1982**, *21*, 512-523. b) Stradley SJ, Rizo J, Bruch MD, Stroup AN, Gierasch LM, **1990**, *29*, 263-287, and references therein.

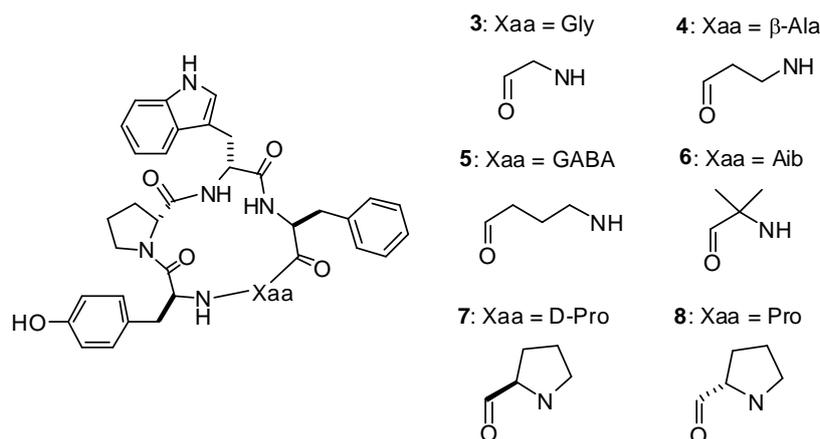


Fig.2

Sono stati introdotti connettori lunghi e flessibili tra Tyr1 e Phe4, Xaa5 = β -Ala (4) and Xaa5 = γ -acido aminobutirric (5), che conferiscono al peptide risultante un'alta libertà conformazionale, in alternativa si sono scelti residui che possano fissare la conformazione del composto Xaa5 = acido α -aminoisobutirrico, Aib (6), Xaa5 = D-Pro (7), Xaa5 = L-Pro (8). In particolare l'acido α -aminoisobutirrico (Aib) in un oligopeptide induce la formazione di α -eliche mentre la presenza di L o D-prolina generalmente favorisce la formazione di turns o turns inversi.¹⁸⁸

I composti illustrati sono stati sintetizzati dal corrispondente pentapeptide lineare, ottenuto su fase solida (SPPS), attraverso l'utilizzo della resina Wang, amminoacidi N- Fmoc protetti, DCC/HOBt come reagenti di coupling¹⁸⁹. Il cleavage dalla resina è stato condotto tramite TFA in presenza di vari scavengers, e il risultante peptide lineare è stato ciclizzato in DMF in condizioni di alta diluizione con DPPA. Il CPP (ciclopentapeptide) è stato purificato tramite flash cromatografia su silice e RP-HPLC semipreparativa, caratterizzato tramite HPLC, ES-MS e ¹H-NMR. Le rese, dopo la purificazione e le caratterizzazioni sono riportate in **Tab.2**

¹⁸⁸ Kessler H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1982**, 21, 512-523. b) Stradley SJ, Rizo J, Bruch MD, Stroup AN, Gierasch LM, *Biopolymers*, **1990**, 29, 263-287, and references therein. c) Schweitzer-Stenner R, Gonzales W, Bourne GT, Feng JA, Marshall GR. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 13095-13109.

¹⁸⁹ *Solid-Phase Synthesis*. Kates, S. A.; Albericio, F., Eds. Dekker: New York, 2001; pp 1-826.

Tab.2 Sintesi, caratterizzazione analitica e affinità recettoriale di CPP **3-8**.

Compd	Sequence	Yield (%) ^a	Purity (%)	MS/calcd [M+1]	K _I (M)	IC ₅₀ (M)
DAMGO	YaG-NMeF-Glyol	-	-	-	1.6±0.310 ⁻⁹	9.9±0.6 10 ⁻⁹
3	c[YpwFG]	62	96	651.2/651.1	3.4±0.7 10 ⁻⁸	4.4±0.6 10 ⁻⁸
4	c[YpwF-βAla]	58	93	665.3/665.3	6.1±0.5 10 ⁻⁶	1.6±0.2 10 ⁻⁵
5	c[YpwF-GABA]	64	93	679.5/679.3	3.2±0.4 10 ⁻⁶	8.4±0.8 10 ⁻⁶
6	c[YpwF-Aib]	55	95	679.2/679.3	2.9±0.3 10 ⁻⁶	7.6±0.7 10 ⁻⁶
7	c[YpwFp]	53	96	691.6/691.3	3.2±0.2 10 ⁻⁵	8.3±0.9 10 ⁻⁵
8	c[YpwFP]	59	95	691.5/691.3	7.2±0.5 10 ⁻⁷	9.0±0.4 10 ⁻⁷

Per determinare le affinità verso il recettore oppioide μ , sono stati condotti saggi di binding per i composti in questione e per il potente agonista di MOR DAMGO (H-Tyr-DAla-Gly-NMePhe-Glyol) utilizzato come composto di riferimento. I peptidi sono stati incubati con omogeneizzato di cervello di ratto, usando [3H]-DAMGO come μ -radioligando specifico. nIn tab.1 sono riportati i valori di KI e IC50. La maggioranza dei composti riportati mostra una scarsa affinità recettoriale. In particolare, l'introduzione di uno "spacer" lungo e flessibile (4 e 5) porta ad una forte decrescita dei valori di KI e IC50 rispetto a 3. Apparentemente, una ampia distanza tra i farmacofori strategici, Tyr1 e Phe4, non risulta ottimale per il binding recettoriale.

D'altra parte, l'introduzione di uno "spacer" in grado di ridurre la flessibilità del ciclopeptide può influenzare in maniera positiva o negativa l'affinità verso OR in base alla conformazione adottata dalla molecola: l'introduzione di Aib and D-Pro, peptide 6 e 7, porta ad una scarsa

affinità recettoriale, mentre l'introduzione di L-Pro, peptide 8, porta ad una moderata attività, con valori di KI e IC50 attorno a 10^{-7} (**Tab. 1**).

5.3 ANALISI CONFORMAZIONALE IN SOLUZIONE DI 3,7 E 8

Al CPP 3 c[YpwFG] può essere attribuita una chiralità del tipo LDDLL o LDDLD, in quanto Gly5 può comportarsi sia da residuo L o D. Pertanto abbiamo deciso di analizzare e confrontare in soluzione il comportamento di 3, 7, c[YpwFp], che hanno una chiralità LDDLD e di 8, c[YpwFP], con chiralità LDDLL, tramite analisi spettroscopiche e di Dinamica Molecolare.

Il confronto delle strutture di 3 e di 7, composto biologicamente poco attivo, in soluzione e 8, il quale mantiene una certa attività, hanno fornito utili indizi per l'identificazione della conformazione bioattiva di questa classe di agonisti atipici. Inoltre, l'introduzione di restrizioni conformazionali nei composti 7 e 8 tramite la sostituzione di Gly con L o D Pro porta ad una riduzione del rischio di pervenire a strutture non definite.

Non è stato possibile condurre gli esperimenti in acqua, in quanto i peptidi erano praticamente insolubili. Diversi peptidi e peptidomimetici descritti in letteratura di ampio interesse biologico risultano insolubili in ambiente acquoso e sono stati studiati in ambiente organico polare, in particolare in DMSO.¹⁹⁰ Gli esperimenti NMR sono stati così condotti usando tecniche di acquisizione standard al 400 MHz in DMSO-d₆. Per il composto 3, si evidenzia tramite ¹H-NMR un singolo set di segnali, che porta a considerare uno stato di omogeneità conformazionale o di rapido equilibrio tra conformeri^{11,13}. L'assegnamento dei segnali è stato condotto tramite gCOSY e HMBC (heteronuclear multiple bond correlation). Quando è stato possibile si sono utilizzati valori delle costanti di accoppiamento ³J_{NH-H α e ³J_{H α -H β per stimare gli angoli di torsione.¹⁹¹ Esperimenti di VT-1H-NMR (temperature variabile) (**Tab.2**) in DMSO-d₆ hanno dato i seguenti risultati: $\delta/\Delta t$ (ppb/°K): TyrNH: -4.8; PheNH: -5.3; GlyNH: -1.4; D-TrpNH: -1.5. Da i valori ottenuti è possibile ipotizzare una conformazione preferenziale in cui GlyNH e D-TrpNH sono coinvolti in legami-H ($\delta/\Delta t$ di GlyNH e D-TrpNH sono <2 ppb/°K).¹⁹²}}

¹⁹⁰ Temussi PA, Picone D, Saviano G, Amodeo P, Motta A, Tancredi T, Salvadori S, Tomatis R. *Biopolymers*, **1992**, 32, 367-372.

¹⁹² Toniolo C *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **1980**, 9, 1-44.

Tab. 3 Valori di $\delta/\Delta t$ (ppb/°K) dei protoni ammidici di 3, 7, 8 determinati tramite Vt-NMR in DMSO-d₆ al 400 MHz (298-348 °K)

Compd	$\Delta\delta/\Delta t$ TyrNH	$\Delta\delta/\Delta t$ D-TrpNH	$\Delta\delta/\Delta t$ PheNH	$\Delta\delta/\Delta t$ GlyNH
3	-4.8	-1.5	-5.3	-1.4
7	-2.7	-2.5	-6.3	-
8	-8.3	-1.5	-0.2	-

Sono stati poi condotti esperimenti 2D-ROESY in DMSO-d₆ che hanno fornito cross-peaks diagnostici :l'assenza di segnali tra H α i-H α i+1 ha portato ad escludere la presenza di legami peptidici di tipo cis; i forti cross-peaks tra Tyr1H α e entrambi i 2H δ di D-Pro sono stati inoltre utilizzati per dedurre un legame ammidico trans di Tyr1-D-Pro2. Inoltre, la non significativa differenza tra ¹³C-NMR chemical shifts di C β a 26.7 e C γ a 24.3 ppm di D-Pro2 confermano la configurazione trans del legame peptidico in esame (un $\Delta\delta$ C β -C γ di 4-6 ppm indica un legame di tipo trans, mentre un $\Delta\delta$ C β -C γ di 8-10 ppm è indicativo per legami di tipo cis)¹⁹³. I dati ricavati dall'analisi NMR sono stati utilizzati come in Dinamica Molecolare, usando distanze interprotoniche non geminali come restrizioni; le strutture ottenute sono state ottimizzate con il programma AMBER¹⁹⁴. La conformazione a più bassa energia con il più basso numero di violazioni dei dati NMR è mostrata in **Fig.3**

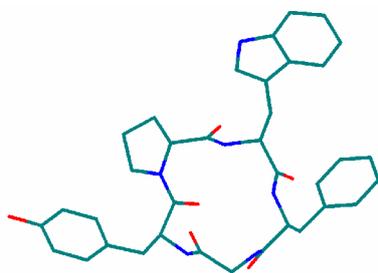


Fig.3

¹⁹³ Konat R K, Mierke D F, Kessler H, Kutscher B, Bernd M, Voegeli R . *Helv. Chim. Acta*, **1999**, 76, 1649-1666.

¹⁹⁴ Cornell WD, Cieplak P, Bayly CI, Gould IR, Merz KM, Ferguson DM, Spellmeyer DC, Fox T, Caldwell JW, Kollman PA . *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 5179-5197.

Questa struttura non conferma la presenza di espliciti H-bonds, probabilmente per l'instaurarsi di un veloce equilibrio tra differenti geometrie, di cui la media considerando la scala dei tempi NMR dà la struttura determinata tramite il ROESY^{10,195}.

Per quanto riguarda le informazioni relative all'orientazione delle catene laterali del composto, dai dati ROESY si constata una disposizione trans di Tyr, D-Trp, e Phe. (**Fig. 3**).

Nell'ottica di indagare la flessibilità del backbone del ciclopeptide è stato condotta una simulazione di MD senza restrizioni per 5.0ns in acqua esplicita. Durante la simulazione il ciclopeptide è oscillato da una conformazione preferenziale, A, abbinandosi con i coefficienti trovati per gli esperimenti VT-NMR (Fig. 4, Tab.2), caratterizzata da un β -turn di tipo II centrato su Tyr1-D-Pro2 e un γ -turn inverso centrato su Phe4, ad una conformazione secondaria, B, che vede un β -turn

Inverso di tipo I centrato su I residui di D-Pro2-D-Trp3 e un γ -turn su Gly5 (**Fig. 4**). Durante le simulazioni i rotameri più frequentemente osservati per Tyr, D-Trp, e Phe sono in accordo con i dati ROESY .



Fig.4. Conformazioni A (sinistra) e B (destra) di 3.

L'analisi conformazionale di 7 c[YpwFp], è stata condotta in un modo similare a 3. I dati strutturali ottenuti dalle analisi NMR riproducono molte delle caratteristiche di 3. L'analisi ¹H-NMR

Rivela inoltre la presenza di un extra set di segnali minori nella regione NH region, indicando una popolazione minoritaria (<5%) di conformeri in lento equilibrio con le specie maggioritarie. Questa popolazione secondaria corrisponde a dei conformeri contenenti almeno un legame peptidico di tipo cis precedente il residuo Pro, in accordo con gli altri esempi di CPP

¹⁹⁵ Dechantsreiter MA, Planker E, Matha B, Lohof E, Holzemann G, Jonczyk A, Goodman SL, & Kessler H. *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 3033-3040.

contenenti due proline riportati in letteratura ¹⁹⁶. Per la scarsa intensità di questo secondo set di segnali, l'analisi conformazionale è stata condotta solo sul conformero predominante. I dati derivati da 2D-ROESY, indicano una disposizione trans di tutti i legami ω , e sono stati utilizzati come restrizioni in Dinamica Molecolare; le strutture sono state ottimizzate tramite AMBER. In **Fig.5** si mostra la conformazione ad energia minore e con il numero minore di violazioni.

Si nota in questa struttura un legame-H esplicito tra Tyr1CO e Phe4NH, e una conformazione in cui i residui D-Pro2-D-Trp3 occupano le posizioni i+1 e i+2 di un β -turn inverso di tipo I, mentre la Gly5 occupa la posizione i+1 di un γ -turn.

Il coinvolgimento di PheNH in un legame-H può non essere dedotto solo sulla base delle analisi di VT-NMR. La struttura di **7** assomiglia alla struttura 3B (**Fig. 4**). L'immagine speculare della conformazione di **7**, c[YpwFp], che è caratterizzata da una chiralità LDDLD, è perfettamente compatibile con quella riportata in letteratura per c[GPfAP] e altri CPP^{19,197} in soluzione, caratterizzati da un β -turn di tipo I su Pro2-Ser3, e un γ -turn inverso su Pro5.

L'ultimo peptide ha una chiralità DLLDL, opposta a quella di **7** e contiene due residui Pro nelle stesse posizioni, 2 e 5 come in **7**, e Gly1 si comporta come un residuo D.

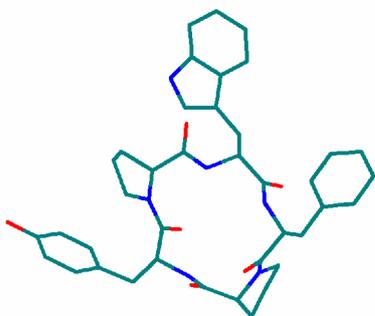


Fig. 5. Conformazione rappresentativa di **7**.

La simulazione senza restrizioni in MD in acqua esplicita conferma la forte stabilità della conformazione. In certi intervalli la simulazione sottolinea la presenza di un γ -turn centrato su D-Pro5. Il basso valore osservato per $\Delta\delta/\Delta T$ per D-TrpNH può essere originato da una popolazione di conformeri che mostrano una struttura alternativa basata su un legame-H. Il modello di CPP

¹⁹⁶ Stradley SJ, Rizo J, Bruch MD, Stroup AN, Gierasch LM *Biopolymers*, **1990**, 29, 263-287, and references therein.

¹⁹⁷ Cardillo G, Gentilucci L, Tolomelli A, Spinosa R, Calienni M, Qasem AR, Spampinato S *J. Med. Chem.*, **2004**, 47, 5198-5203.

c[GPfAP] riportato in precedenza adotta un β -turn inverso di tipo II centrato su Gly1-Pro2 e un γ -turn centrato su Ala4 nello stato cristallino. Tuttavia, per il ciclopeptide 7, durante la simulazione non emergono tracce di un turn centrato su Gly1-Pro2. Infine abbiamo analizzato la conformazione di 8 c[YpwFP]. Come per 7, l'analisi $^1\text{H-NMR}$ in DMSO- d_6 rivela un set minoritario di segnali abbondante. Dall'analisi 2D-ROESY in DMSO- d_6 , la presenza di un cross peak $\text{H}_{\alpha i}-\text{H}_{\alpha i+1}$ tra Phe4 H_{α} e Pro5 H_{α} è stata considerata indicativa di un legame peptidico di tipo cis tra Phe4-Pro5. L'altro legame peptidico riguardante il secondo residuo Pro è stato assegnato come trans, per la presenza di forti cross peaks tra Tyr1 H_{α} ed entrambi i 2 H_{δ} di D-Pro. Le distanze interprotoniche dedotte dal ROESY sono state utilizzate come restrizioni in esperimenti di MD.

La larga maggioranza di strutture calcolate di 8 risulta ordinata e non mostra una considerevole violazione delle restrizioni applicate. La struttura rappresentata in Fig.6 è indicativa della presenza di un β -turn di tipo I centrato sui residui di D-Pro2-D-Trp3. Le analisi VT- $^1\text{H-NMR}$ confermano il coinvolgimento di PheNH in un legame-H molto forte. (Tab. 3). Infine, esperimenti di MD senza restrizioni in acqua esplicita confermano la grande stabilità della conformazione in questione.

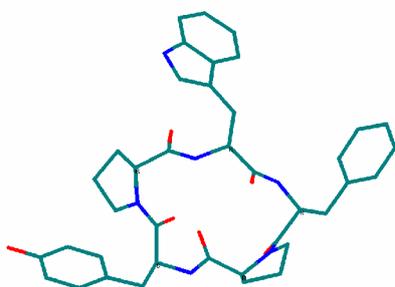


Figura 6. Conformazione rappresentativa di 8.

5.4 MOLECULAR DOCKING

Attraverso Molecular Docking sono stati analizzati i potenziali modi di binding dei CPP presi in considerazione. Come è riportato in letteratura, molti ligandi oppioidi interagiscono elettrostaticamente con Asp 147 in TMH III tramite il residuo amminico protonabile (Fig.7).^{198,199} In diversi casi i ligandi sono stati manualmente posizionati all'interno della tasca recettoriale in maniera da fissare questa interazione aspartato-ammina. Il CPP 3 non contiene

¹⁹⁸ Gentilucci L, Tolomelli. Curr. Topics Med. Chem., 2004, 4, 105-121.

¹⁹⁹ Eguchi M. Med. Res. Rev. 2004, 24, 182-212.

funzionalità ioniche ed è quindi necessario ricercare un altro modo di interagire. Le interazioni rilevanti con il recettore sono di tipo idrofobico e per legame-H

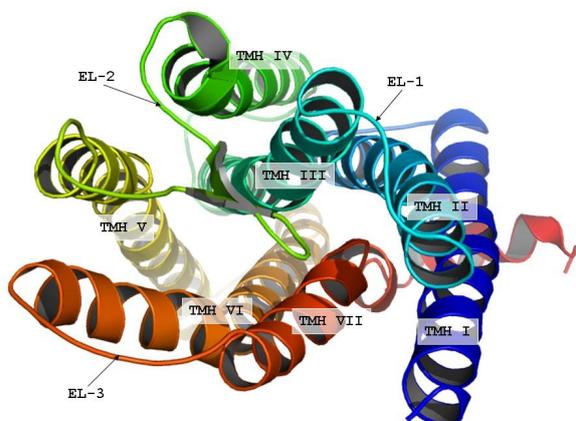


Fig. 7. Rappresentazione delle eliche transmembrana e dei loops extracellulari (EL) del recettore oppioide μ (PyMol.)²⁰⁰

A causa dell'assenza di una interazione cardine, il processo di docking è stato condotto tramite AutoDock²⁰¹, in quanto è un programma di docking esaustivo che esplora in maniera molto precisa l'intero spazio conformazionale del complesso proteina-ligando. È stato quindi creato un appropriato modello di interazione per 3 (il composto più attivo) usando un approccio di blind-docking²⁰² e successivamente sia 3 sia gli altri CPP 3 sono stati sottoposti a docking nel sito di binding precedentemente trovato tramite "refined docking" e le risultanti orientazioni sono state equilibrate tramite Dinamica Molecolare.

Le conformazioni risultanti dal "blind docking" sono state raggruppate e, molte di loro (più del 91%) sono state localizzate nel canale tra le eliche transmembrana TMH III, TMH V, TMH VI, TMH VII, e il loop extracellulare EL-2. I residui relativi al sito di binding ad una distanza di 3 Å dal ligando sono Tyr148, Met151 e Phe152 (TMH III), Lys233 e Phe237 (TMH V), Ile296, Val300, Lys303 e Thr307 (TMH VI), Trp318 e Ile322 (TMH VII) e Thr218, Leu219 e Phe221 (EL-2) di MOR. Il collocamento di questo sito di binding è stato usato come punto iniziale per il secondo processo di docking. In questo caso l'utilizzo di una risoluzione più fine ha

²⁰⁰ DeLano WL PyMol Molecular Graphics System, DeLano Scientific, San Carlos, CA, 2002 USA.

<http://www.pymol.org>.

²⁰¹ Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK & Olson AJ, *J. Comp. Chem.* **1998**, *19*, 1639-1662.

²⁰² Hetenyi C, van der Spoel D, *Protein Sci.* **2002**, *11*, 1729-1737. b) Hetenyi C, van der Spoel D. *FEBS Lett.*, **2006**, *580*, 1447-1450.

permesso una valutazione migliore dell'interazione ligando-recettore, ottenendo energia di docking più basse rispetto al primo step. Le conformazioni risultanti da questo "refined docking" sono state raggruppate e suddivise in due orientazioni principali., *Orientazione 1* e *Orientazione 2*, basate sostanzialmente sulla posizione del ligando nella tasca e sui residui che si trovano a 5Å dal ligando.

Orientazione 1. Il collocamento di 3 in questa orientazione mostra il residuo Tyr1 puntare verso una tasca idrofobica composta in prevalenza da residui aromatici Tyr148, Phe237, Phe241 and Trp293,

Fig. 8 (a). Da un confronto con la **Fig. 4**, sembra che questa disposizione nella cavità recettoriale sia simile alla conformazione preferenziale adottata in soluzione. Il complesso recettore-ligando è stabilizzato da 4 legami-H: due tra l'ossigeno di Gly5 e Oδ1 e Oδ2 di Asp147 (2.90 e 2.78Å), l'unico residuo di THM III a meno di 5Å da 3, un altro legame-H tra Oγ1 di Thr218 (EL-2) e l'ossigeno di Phe4 (2.94Å), e un legame-H tra l'ossigeno idrossilico di Tyr1 e OAla240 (TMH V) di 2.66Å. La vicinanza di Tyr1 a THM VI potrebbe permettere la formazione di legami-H con i carbonili del backbone, che porterebbe ad una stabilizzazione della posizione di questo gruppo. Inoltre, questa orientazione è stabilizzata da diverse interazioni π-π tra i residui aromatici di Tyr1 e Phe4 e quelli di Phe237, Phe241 e Trp293 (Trp1), Trp218 e Phe221 (Phe4).

Trp3 è coinvolto in una interazione cationica-π con la Lys303 (TMH VI), mentre l'altro residuo positivo a meno di 5Å dal ligando (Lys233, appartenente a TMH V) non mostra interazioni evidenti con 3.

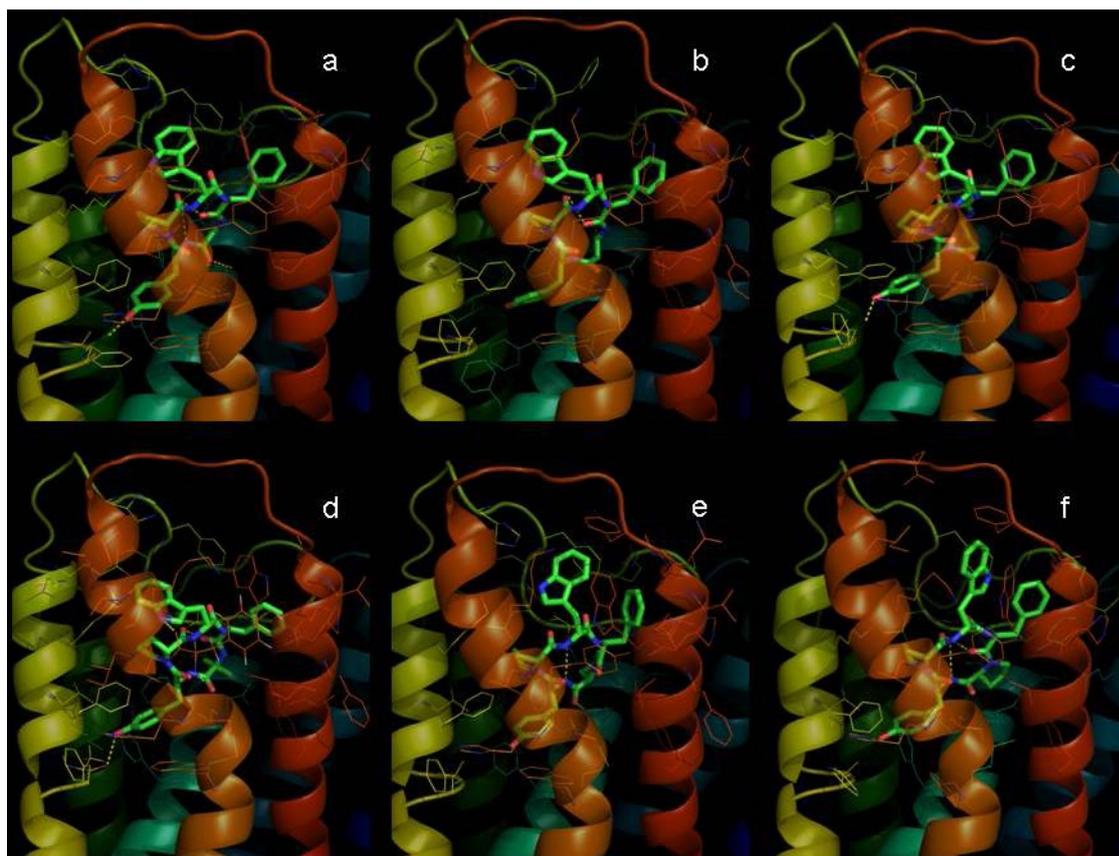


Fig. 8. CPP 3-8 nell'*Orientazione 1* all'interno del recettore μ . In evidenza anche i residui del recettore che distano non più di 5Å dal ciclopeptide e i legami-H (in tratteggiato).

I risultati del docking per gli altri ciclopeptidi (con eccezione di 8) danno una conformazione di binding molto simile a quella trovata per 3(**Fig. 8**).

I composti 4 e 6 hanno i valori di binding più scarsi e ciò è in relazione con una loro interazione inadeguata con la tasca recettoriale: ciclopeptide 4 è caratterizzato da una rotazione di Tyr1 lontano da TMH V e TMH VI, che porta alla rottura dei legami-H con Ala240 e Asp147, è presente solo un legame-H debole tra OPhe4 e O γ 1Thr218 (EL-2) di 3.52Å. Tyr1 è sempre inserita nel cluster aromatico e Phe4 è stabilizzata tramite un'interazione π - π con il Trp318, ma il Trp3 non mostra nessuna interazione cationica- π con Lys303. In 5 e 6 HOTyr1 è in grado di interagire con OAla240 (2.52 e 2.81Å rispettivamente). Queste strutture sono stabilizzate anche da legami-H tra NGABA5 e OCys217 (per 5, 2.20Å) e tra OPhe4 di 6 e O γ 1Thr218 di 2.42Å, ma l'incremento delle dimensioni del residuo Xaa5 porta alla non interazione con Asp147. Nel composto 7, in cui Xaa5 è una D-Pro, si ritorna all'interazione

con Asp147, per mezzo dell'ossigeno carbonilico di D-Pro5 (2.20Å) e supportato da un legamen-H tra NTyr1 e O γ 1Thr218 (3.30Å). Trp3 è ancora coinvolto in una interazione cationica- π con Lys303 (TMH VI), e Tyr1 è adesso stabilizzata da due interazioni π - π con i residui aromatici di Phe237 e Trp293. Per il composto 8, l'unico a mostrare un'affinità interessante dopo 3, nessuna delle soluzioni di docking in questa orientazione può essere presa in considerazione. Questo può essere spiegato per la presenza del residuo Pro5, stericamente ingombrato, che ne limita la libertà conformazionale. Nei composti 3 e 7 le strutture nell'orientazione 1 (Fig.8a e 8e) grossomodo corrispondono alle conformazioni preferenziali in soluzione, mentre 8 in soluzione mostra una struttura rigida, molto diversa dalle strutture degli altri composti. Per quanto riguarda i ciclopeptidi 4 e 5, l'introduzione di uno spacer flessibile in Xaa5 porta ad una maggiore libertà conformazionale e di conseguenza ad una maggiore adattabilità al recettore. Si è così deciso di procedere con un docking manuale nella cavità recettoriale di MOR usando l'orientazione di 3 come modello. La conformazione ottenuta è caratterizzata dalla presenza di 3 legami-H tra O γ 1Thr218 e NTyr1, OPhe4 e OPro5 (di 2.77, 2.96 e 3.26Å, rispettivamente) e da due interazioni π - π tra Tyr1- Phe237 e Trp3-Phe221. Il residuo Tyr1 è sempre inserito in un cluster aromatico ma non mostra il legamen-H con Ala240 e Asp147 (**Fig. 8f**). Il sito di binding è completato da Asp216, Val300, His319 e Ile322 che sono collocate a circa 3.5Å da 3, benché non vi siano particolari interazioni tra i residui e il ligando.

Orientazione 2. In questa orientazione 3 è collocata in una cavità all'interno della tasca recettoriale in posizione rovesciata rispetto all'orientazione precedente (**Fig.9a**) e spostato di circa 3.3Å da TMH VI; i residui di Ala240 (TMH V) e His297 (TMH VI) si trovano in questo modo lontani dal ligando. Questo riposizionamento vede anche la collocazione di EL3 a 5Å dal ligando.

Paragonando la struttura di 3 in questa orientazione di binding e quella calcolata in soluzione si notano parecchie differenze (Fig. 4), in particolare in termini di conformazione del backbone. Il ciclopeptide 3 si trova diretto verso il fondo del sito di binding tramite il residuo D-Trp3 e stabilizzato dalla formazione di sei legami-H: un legame-H bidentato tra O δ 1 e O δ 2 di Asp147 (TMH III) e l'atomo di azoto dell'anello in dolico di D-Trp3 (3.15 and 3.06Å, rispettivamente),

due contatti tra l'ossigeno carbonilico di Tyr1 e O ϵ 2Glu229 (TMH V, 3.22Å) e OThr220 di 3.30Å, e l'ultimo legame-H bidentato tra O ϵ 1 e O ϵ 2Glu310 (EL-3) e OHTyr1 del ciclopeptide 3 (3.04 e 3.38Å). In questa orientazione la Tyr1 e Phe4 sono circondati da Phe221 e Trp318, mentre il D-Trp3 viene localizzato in una tasca idrofobica che nell'orientazione 1 era occupata da Tyr e composta fondamentalmente da residui aromatici : Tyr148, Phe152 e Phe237.

I residui Thr218, Leu219, Lys233 Lys303, Thr307 e His319 sono posizionati a 3.5Å dai CPP, non sono coinvolti in interazioni rilevanti con il ligando e completano la parete recettoriale. I risultati del docking per gli altri ciclopeptidi portano ad una orientazione di binding molto simile a quella ottenuto per 3 (**Fig. 9**).

Per quanto riguarda il ciclopeptide 4 si nota l'assenza di contatti con Asp147 e Glu310, e la presenza di solo un legame-H tra l'ossigeno carbonilico di D-Pro2 e O γ 1Thr218 di 2.69Å, una situazione simile la si trova anche per 5, in cui c'è la formazione di due legami-H tra O γ 1Thr218 e OPro2 e NPhe4 di 3.26 e 3.45Å. Questo comportamento è parzialmente verificabile in 6 e 7 dove il legame-H con Asp147 è ancora assente ma si trova la ri-formazione del contatto tra HOTyr1 e O ϵ 2Glu310 con le distanze di 2.63 e 2.69Å (per 6 e 7 rispettivamente). In 7 la conformazione è stabilizzata anche da un'interazione cationica- π tra Tyr1 e Lys303.

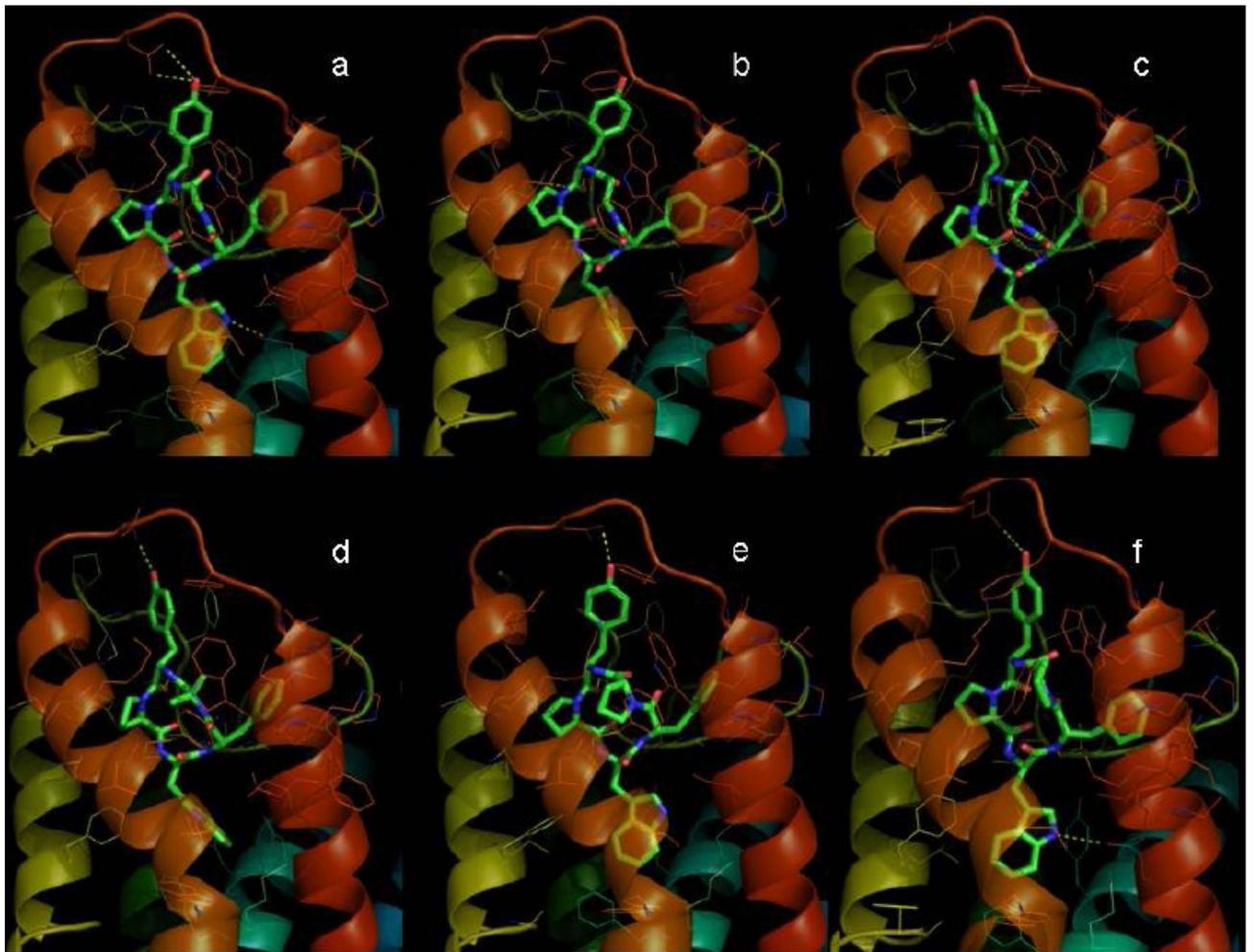


Figura 9. CPP 3-8 nell'*Orientazione 2* all'interno del recettore μ . In evidenza anche i residui del recettore che distano non più di 5\AA dal ciclopeptide e i legami-H (in tratteggiato).

La conformazione di binding osservata per 3 nell'*orientazione 2* è mantenuta in 8, con la formazione di : un legame-H tra $O\delta 2\text{Asp}147$ e l'azoto di D-Trp3 (3.34\AA), un legame tra $N\text{Phe}4$ e $O\gamma 1\text{Thr}218$ di 3.23\AA , e un ultimo legame-H tra $O\epsilon 2\text{Glu}310$ e $O\text{HTyr}1$ di 8 (3.23\AA).In questa orientazione il residuo di D-Trp3 è circondato da Phe237 e Trp293, mentre Tyr1 è coinvolta in un'interazione cationica- π con Lys303.

5.5 OTTIMIZZAZIONE ATTRAVERSO IL METODO IBRIDO QM/MM .

Le due principale orientazioni dei peptidi sono state analizzate attraverso il metodo ibrido di ottimizzazione geometrica QM/MM²⁰³ usando il programma Gaussian 03²⁰⁴

Questo metodo è in grado di fornire un'ottima descrizione di sistemi molecolari complessi come quello preso in esame.

Per prima cosa, le coformazioni di binding ottenute sono state equilibrate tramite Dinamica Molecolare per 1.2 ns a T e P costanti in un box cubico periodico, usando come modello per le molecole d'acqua TIP3P . I sistemi sono stati successivamente ottimizzati usando un approccio combinato QM/MM, con un ambiente recettoriale flessibile che simula l'adattamento del recettore dopo il binding con il ligando. Questa operazione ha portato ad un riarrangiamento dei residui della tasca attorno al ligando (“induced fit”) **Fig. 10** per 3, 7 e 8 in entrambe le orientazioni.

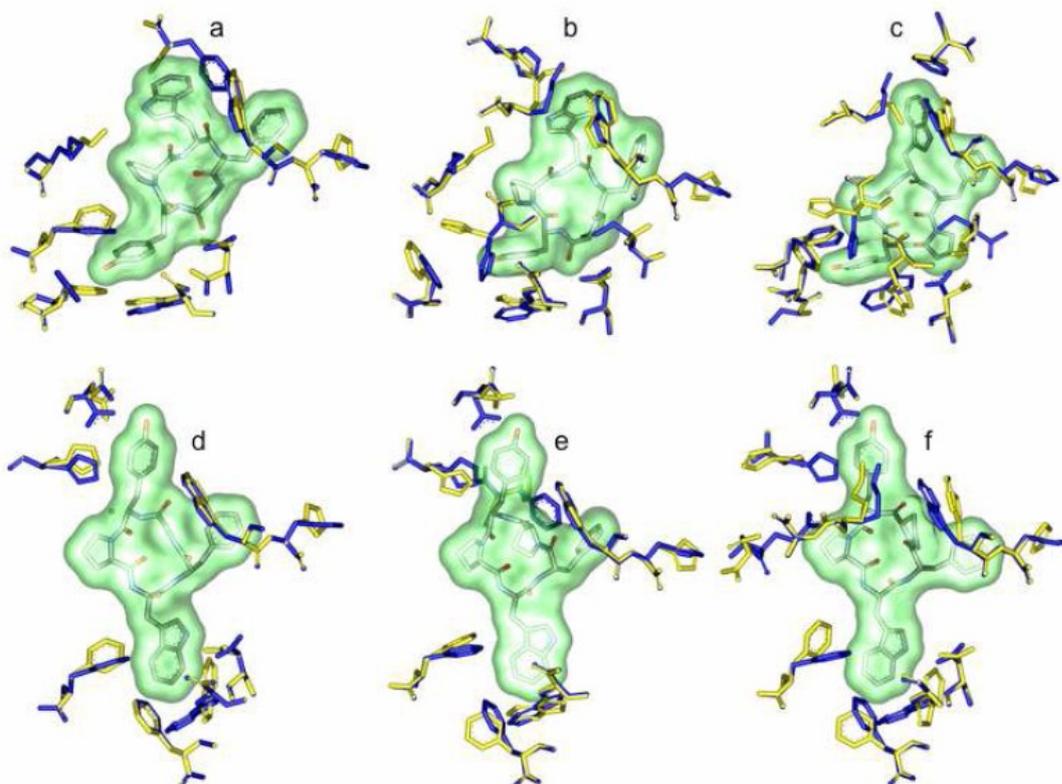


Fig. 10. Orientazione 1 (a-c) e Orientazione 2 (d-f). In giallo i residui di MOR dopo l'ottimizzazione QM/MM. In blu i residui di MOR inclusi nella parte QM nella loro conformazione iniziale.

²⁰³ Gao J 1992,119, VCH, New York. b) Zhang Y, Lee T, Yang W. *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 46-54.

²⁰⁴ Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Montgomery JA, Vreven T, Kudin KN, Burant JC, et al. (2003) Gaussian 03. Revision A.1, Gaussian, Pittsburgh, PA.

Per il ciclopeptide 3 non si ottengono grosse differenze di geometria di binding dopo il processo di ottimizzazione per entrambe le orientazioni. Il numero dei legami -H e dei residui che vengono in contatto con 3 rimane quasi inalterato: nell'orientazione 2 il ligando si sposta verso TMH III e EL-2, dando vita a nuovi contatti con i residui di TMH VI.

I residui di Phe221, Trp318 e His319 restano nelle stesse posizioni nel binding, mentre Asp147 e Glu310 si spostano verso il D-Trp3 e Tyr1, rafforzando la geometria del legame-H.

La variazione più significativa riguarda il residuo di Trp293 di TMH VI che nell'orientazione 2, ri-orienta l'anello indolico per diventare parallelo con l'anello di D-Trp3, trovando in questo modo una migliore interazione π - π . Lo stesso effetto può essere osservato per Phe237 e Phe241, ma in questi casi il "flip" degli anelli aromatici non è evidente come per Trp293.

L'ottimizzazione QM/MM per 7 mostra un pattern di movimenti dei residui sovrapponibile a quello osservato per 3 e, rispetto alle condizioni iniziali, non si rilevano cambiamenti drastici per entrambe le orientazioni.

Nell'orientazione 1 i movimenti dei residui nel sito recettoriale dovuti al binding recettoriale sono modesti e riguardano rotazioni degli anelli aromatici di Tyr148, Phe237, Phe241 e Trp293, attorno a Tyr1. Asp147 rimane invariato e i residui carichi positivamente, Lys233 e Lys303, puntano verso D-Trp3, mentre Ile322 e His297 si spostano lontano dal ligando diminuendo l'ingombro sterico con D-Pro5 e Tyr1, rispettivamente. Nell'orientazione 2, il sito di binding compie una serie di piccoli spostamenti per adattarsi al ciclopeptide 7. In questo caso i residui di Lys, Trp293 e Asp147 non mutano la loro posizione iniziale, mentre Glu310 si sposta verso Tyr1 incrementando positivamente la geometria del legame-H.

Come dichiarato in precedenza, l'analisi di 8 nell'orientazione 1 parte da un docking manuale della struttura. Rispetto alle condizioni iniziali dell'orientazione 1, si ha una grossa variazione nella struttura 3D del sito di binding, in particolare nelle vicinanze di Pro5, con un movimento rilevante di Asp147, Tyr148, Trp293 e Ala323. Nell'orientazione 2 invece il ciclopeptide 8 mostra lo stesso comportamento di 3, ma con più variazioni nella zona vicino a Trp293, da parte di Phe237 e Phe241 e, una leggera ri-orientazione dell'anello indolico di Trp293, suggerendo una minore attivazione del recettore rispetto a 3.

Si può in generale osservare che per tutti i casi presi in considerazione, vi è una leggera deformazione del sito di binding e una forte stabilità del complesso recettore-ligando.

5.6 DISCUSSIONE

Si pensava che i CPP costituissero strutture conformazionalmente rigide, nonostante ciò si è visto come determinate strutture mantengano un certo gradi di flessibilità. Nella parte precedente le simulazioni di Dinamica molecolare hanno dimostrato per 3 la presenza in soluzione di due strutture preferenziali caratterizzate da β/γ turns, stabilizzati da legami-H; per i composti 7 e 8 invece si sono ottenute strutture più rigide, caratterizzate da una conformazione principale. Mentre poi LDDLD (7) adotta una conformazione con tutti i legami ω in trans, in accordo con composti simili riportati in letteratura, il composto 8, LDDLL, adotta una conformazione uno cis-quattro trans, in cui il legame cis precede il residuo Pro5. E' generalmente accettato che le conformazioni dei CPP dipendono principalmente dall'arrangiamento stereochimico dei loro residui. La struttura di 3 (LDDLL o LDDLD), 7 (LDDLD), e 8 (LDDLL) possono essere avvicinate a quelle di LDDLL o LDDLD dei modelli ciclopentalanina.²⁰⁵

Quindi 3, 7 e 8 possono essere confrontati con il modello c[AaaAA], che ha una chiralità LDDLL, o l'immagine speculare c[aAAaA] (9), e alle strutture relative degli inibitori di integrine $\alpha\beta3$ -

c[fVRGD] (generalmente riportate come c[RGDfV]),²⁷ che mostra una chiralità DLLDL, l'opposto di LDDLD.

La struttura del modello LDDLL c[AaaAA] mostra un β -turn definito di tipo II su Ala1-D-Ala2. Tuttavia il modello diastereoisomerico LDDLD c[aAAaA] (9) mantiene un inverso di tipo II su D-Ala1-Ala2, e anche un γ -turn su D-Ala4. Come conseguenza, la conformazione Adi 3 può essere facilmente razionalizzata. In ogni caso è da tenere presente che i ciclopeptidi contenenti il residuo Pro hanno un comportamento strutturale anomalo: aumenta infatti la probabilità di trovare nella struttura una conformazione di tipo cis del legame ω che precede Pro, e, inoltre hanno la forte tendenza a stabilizzare strutture con turn.

²⁰⁵ Wermuth J, Goodman L, Jonczyk A, Kessler H J. Am. Chem. Soc., 1997, 119, 1328-1335, and references therein.

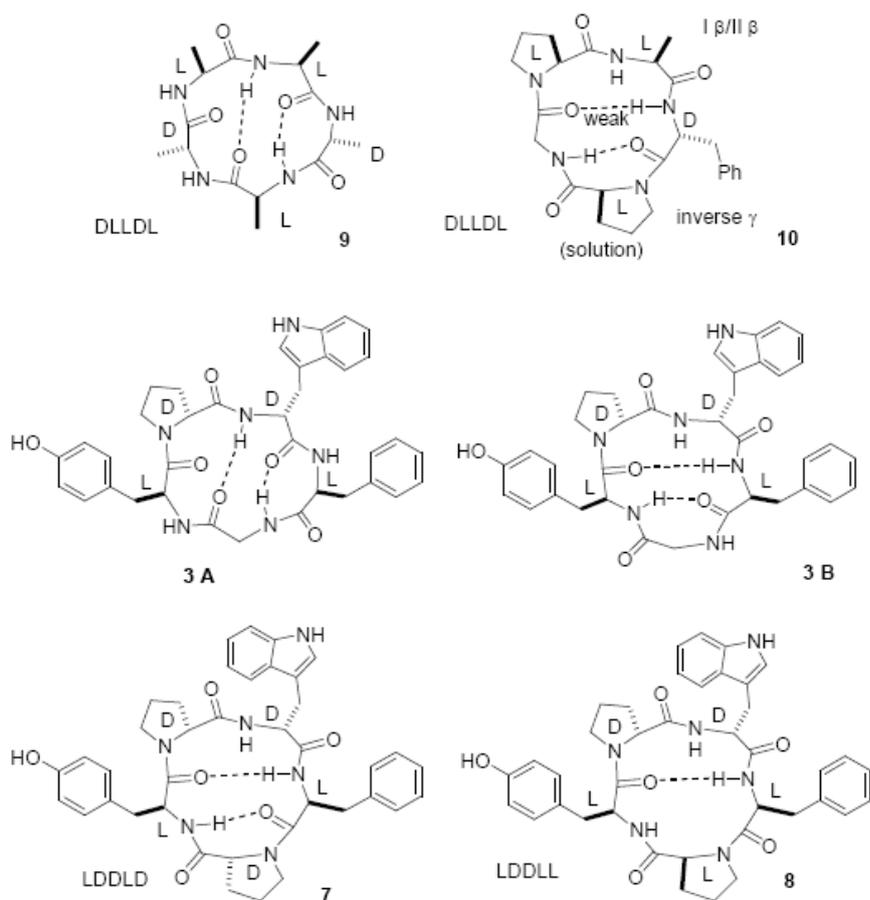


Fig. 11. Confronto tra gli elementi di strutture secondarie determinati per 3, 7, 8 e per i modelli CPP 9 e 10.

In particolare Pro tende ad occupare la posizione $i+1$ di un β -turn o di un γ -turn. In effetti ciclopentapeptidi DLLDL contenenti Pro come $c[\text{GPAfP}]^{206}$ (10), $[\text{D-Gly}(\text{Set})\text{-PFaV}]^{207}$, $c[\text{GPSaP}]$, $c[\text{GPAaP}]$ o $c[\text{fPGaP}]$, etc. mostrano tutti legami peptidici di tipo trans e sono caratterizzati da una conformazione preferenziale con un β -turn di tipo I o II centrato sui residui 2 e 3 e con γ -turn inverso sul residuo 5. Apparentemente la presenza di Pro in posizione 2 e 3 sembra responsabile della seconda conformazione B.

Di conseguenza l'immagine speculare di 7, ciclopeptide contenente due Pro, ha una conformazione perfettamente in linea con quella del ciclopentapeptide con due residui Pro sopra descritto DLLDL.

Al contrario la conformazione di 8 non è accostabile con i risultati conformazionali ottenuti per ciclopentapeptidi riportati in letteratura.

²⁰⁶ Stradley SJ, Rizo J, Bruch MD, Stroup AN, Gierasch LM, *Biopolymers*, **1990**, 29, 263-287, and references therein.

²⁰⁷ Steglich W, Paulitz C. *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 8474-8478.

In generale la competizione tra strutture aventi un legame peptidico di tipo cis-Xaa-Pro e tra strutture aventi β o γ -turn in cui il legamen peptidico Xaa-Pro adotta una conformazione di tipo trans, dipende principalmente dalla chiralità degli altri residui, piuttosto che dalla loro natura. Ad esempio è stato riportato che l'introduzione di una L-Ala in posizione 1 di c[GPGaP] destabilizza la conformazione originale che dava sia strutture in forma trans e cis per il legame ω Ala-Pro²⁹. In modo simile l'introduzione di L-Ala4 in c[GPfaP] al posto del residuo D porta alla coesistenza in soluzioni di 4 diverse strutture contenenti tutte le possibili combinazioni di legami ω trans/cis precedenti sia Pro2 sia Pro5 (cis/cis, trans/trans, cis/trans, trans/cis)²⁹. Il composto 8 mostra invece una conformazione singola uno-cis-quattro-trans e non più strutture con diverse combinazioni cis/trans.

Nonostante la presenza di elementi di struttura secondaria, entrambe le conformazioni 3A e 3B mostrano un arrangiamento sinile dei gruppi farmacoforici aromatici, Fig.4, la differenza più rilevante, sta invece nella diversa distanza tra i residui delle catene laterali di Tyr1 e Phe4. In particolare la conformazione A osservata in soluzione per 3 è in accordo con i requisiti strutturali riportati in letteratura per una buona attività e selettività nei confronti di MOR. L'analisi conformazionale dell' Endomorfina-1²⁰⁸, della Morficettina e Encefalina²⁰⁹ e i loro derivati, incluso il JOM-6²¹⁰, ha stabilito che una angolo χ trans del residuo Tyr1 e una relativa separazione di 11-13 Å tra l' anello aromatico di Tyr e il secondo farmacoforo aromatico, sono necessari per un'interazione ottimale con MOR²¹¹.

Inoltre un'orientazione g- è richiesta per χ Trp3²¹², mentre una conformazione g- è stata ipotizzata per Phe4 sulla base della buona affinità recettoriale di analoghi dell'endomorfina contenenti una (2S,3S)- β -MePhe in posizione 4²¹³.

Per quanto riguarda 3, nella conformazione A, i residui aromatici di Tyr1 e Phe4 sono ad una distanza di 12 Å e i loro angoli χ sono trans e g-, mentre il D-Trp3 ha un'orientazione g+, compatibile con la configurazione inversa presente in EM-1. In sostanza la struttura 3A sembra

²⁰⁸ Podlogar BL, Paterlini MG, Ferguson DM, Leo GC, Demeter DA, Brown FK, Reitz AB *FEBS Lett.*, **1998**, 439, 13-20.

²⁰⁹ Janecka A, Fichna J, Mirowski M, Janecki T. *Mini Rev. Med. Chem.*, **2002**, 2, 565-572. b) Malicka J, Czaplowski C, Groth M, Wiczak W, Oldziej S, Lankiewicz L, Ciarkowski J, Liwo A, *Curr Topics Med Chem.*, **2004**, 4, 123-133.

²¹⁰ Grieco P, Giusti L, Carotenuto A, Campiglia P, Calderon V, Lama T, Gomez-Monterrey I, Tartaro G, Mazzoni M R, Novellino E. *J. Med. Chem.*, **2005**, 48, 3153-3163. b) Hruby VJ, Agnes RS *Biopolymers*, 2004 51, 391-410. c) Mosberg HI, Fowler CB. *J. Pept. Res.*, **2002**, 60, 329-335. d) Fowler CB, Pogozeva ID, Lomize AL, LeVine H & Mosberg HI. *Biochemistry*, **2004**, 43, 15796 -15810.

²¹¹ Hruby VJ, Gehrig, CA. *Peptides. Med. Res. Rev.*, **1989**, 9, 343-401.

²¹³ Tomboly C, Kover KE, Peter A, Tourwe D, Biyashev, D, Benyhe S, Borsodi A, Al-Khrasani M, Ronai AZ, Toth G., *J. Med. Chem.*, **2004**, 47, 735-743.

essere abbastanza sovrapponibile con quella di JOM-6, potente agonista verso MOR. Fig. 12. Sul ligando JOM-6 sono stati condotti vari studi tramite Molecular Docking determinando l'interazioni chiave con il recettore: interazione ionica tra TyrNH e Asp147 di TMH III, (così come per altri agonisti oppioidi).

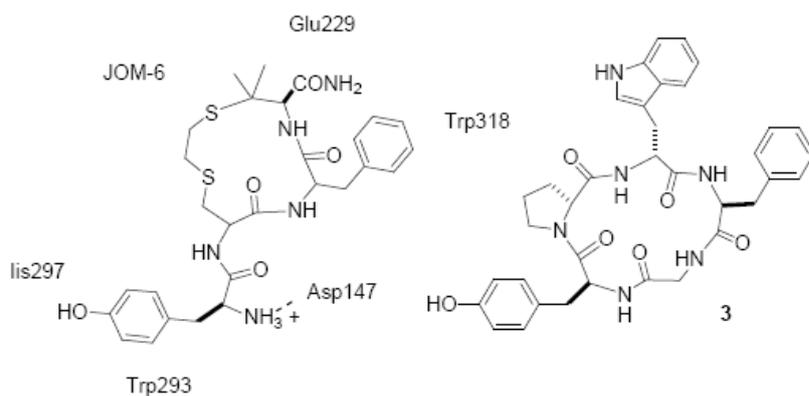


Fig. 12. Confronto tra JOM-6 (struttura di binding recettoriale) e quella calcolata in soluzione per 3.

La somiglianza strutturale tra 3 e JOM-6 sembra suggerire un analogo modo di interazione con il recettore,; la più bassa attività di 3 rispetto a JOM-6 è imputabile alla mancanza di un'interazione ionica con Asp-147. Questa osservazione viene meno se si considera però la correlazione tra diverse attività biologiche di 3,7,8 e le loro strutture in soluzione. E' evidente, infatti, che mentre i farmacofori dei due composti sono abbastanza sovrapponibili, il backbone del CPP non lo è.

La flessibilità di 3 può dare luogo alla possibilità che vada a legarsi al recettore in una conformazione distorta, in ogni caso la moderata affinità di 8, composto meno flessibile, che adotta una differente struttura 3D in soluzione rispetto a 3, porta ad una riformulazione del modello di interazione di questi composti con il recettore considerato. I dati raccolti dagli esperimenti di Docking, condotti per fare luce sull'interazione recettoriale di questi composti, indicano due orientazioni preferenziali : il primo modello di orientazione (Orientazione 1) è simile a quello descritto per JOM-6 e mostra una conformazione simile a quella calcolata in soluzione (Fig. 8 e Fig. 12), mentre il secondo modello (Orientazione 2) il CPP è collocato in maniera opposta all'interno della cavità recettoriale (Fig.9). Un confronto tra l'Orientazione 1 e l'Orientazione 2 di 3 rivela una diversa sovrapposizione rispetto alla conformazione di binding di JOM-6 (**Fig. 12**). L'anello aromatico di Phe4 di 3 è completamente sovrapponibile con Phe3 di JOM-6, specialmente quello dell'Orientazione 2. L'Orientazione 1 ha una eccellente

sovrapposizione del residuo di Tyr1, mentre l'Orientazione 2 è invertita e presenta il D-Trp3 al posto di Tyr1. La differenza più considerevole riguarda la sovrapposizione tra gli atomi del backbone : nell'Orientazione 2 è collocato in maniera simile a JOM-6 eccellente, mentre nell'Orientazione 1 si ha uno spostamento verso il fondo della cavità recettoriale di circa 5Å che porta ad un notevole ingombro sterico. Per tutti i peptidi studiati questo spostamento del backbone comporta in maniera inequivocabile che l'Orientazione 2 sia più favorita rispetto all'Orientazione 1.

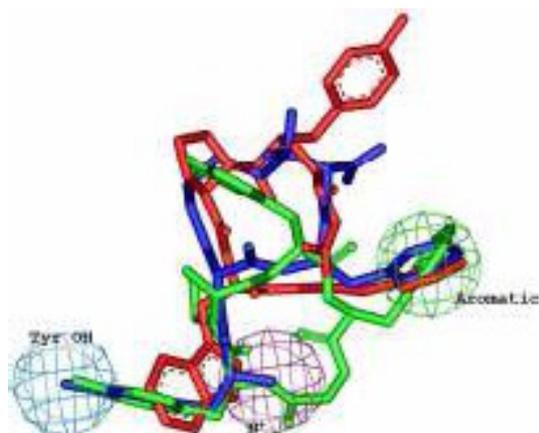


Fig. 13. La sovrapposizione tra il ciclopeptide 3 nell'Orientazione 1 (verde), e nell'Orientazione 2 (rosso), e JOM-6 (in blu), (docking in MOR). Sono evidenziati i centri farmacoforici importanti.

Queste differenze tra le due orientazioni deve essere analizzata considerando che : a) la grande maggioranza dei conformeri trovata è nell'Orientazione 2 e b) l'energia di binding delle conformazioni trovate per la prima orientazione sono vicine a quelle della seconda anche se quest'ultima mostra uno score di docking migliore.

Visto che la mancanza di flessibilità in una proteina può influenzare i modi di binding dei ligandi e l'affinità e le orientazioni possono variare in maniera significativa, questi risultati sono da considerare con cautela. In particolare la piccola differenza nello score di docking tra le due orientazioni dei CPP crea delle difficoltà nella predizione della migliore orientazione.

Mentre 3 e gli analoghi 4-7 possono legarsi al recettore in entrambe le orientazioni, il ciclopeptide 8 mostra una esclusiva preferenza per l'Orientazione 2. Sono poi da osservare le differenze strutturali nella regione Pro5 rispetto alle strutture calcolate in soluzione.

In maniera similare la conformazione in soluzione di 3 si modifica nel processo di legame con il recettore. Il ciclopeptide 8 ha senza dubbio una maggiore rigidità conformazionale rispetto a

3 e la modificazione strutturale che accade al momento del binding porta conseguenze in termini di attività biologica: 8 è meno attivo rispetto a 3.

L'analisi dei coefficienti di correlazione ottenuti tra le energie di docking calcolate e i valori di K_i or IC_{50} dimostra una chiara preferenza dell'Orientazione 2 rispetto all'Orientazione 1. Tutto ciò trova conferma anche negli eccellenti parametri statistici ottenuti per regressione lineare di 6Gdock vs 6Gexp per l'Orientazione 2 (Fig. 13). Questi risultati sottolineano il fatto che l'Orientazione 2 è un modello più plausibile rispetto all'Orientazione 1.

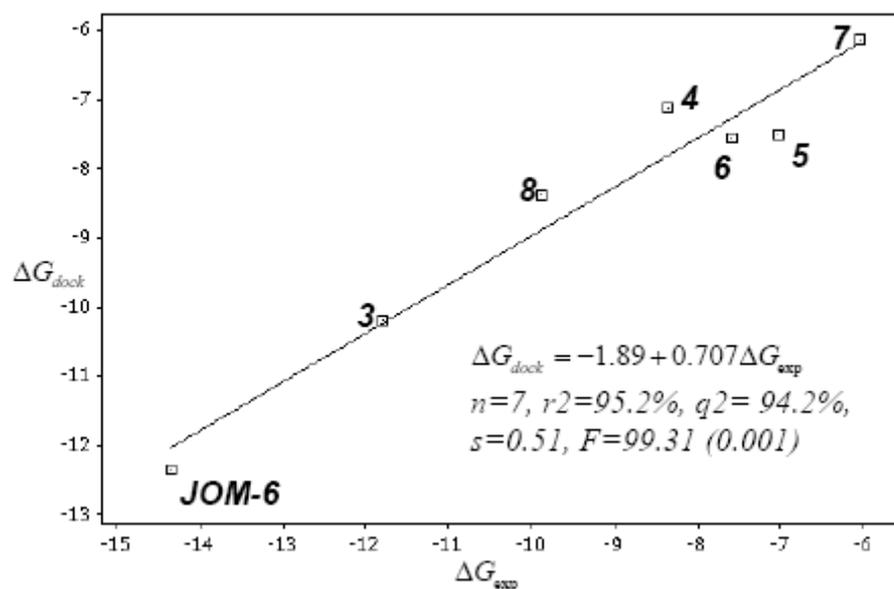


Fig. 14. Correlazione tra le energie libere sperimentali e di docking (ΔG_{exp} e ΔG_{dock}) calcolate nel binding dei ligandi con il modello di MOR .

E' importante sottolineare che l'Orientazione 2 è caratterizzata da molte interazioni , con Asp147, Glu310 e Trp318, che sembrano essere fondamentali per l'incremento dell'attività (sono presenti solo per il prodotto 3 e 8, i ciclopeptidi più attivi). Il sito di binding proposto non si trova lontano dalla zona identificata in studi precedenti riguardanti ad esempio l'agonista JOM-6. L'importanza dei residui chiavi del recettore definiti nel binding di JOM-6 , confermata poi da esperimenti di mutagenesi diretta, viene messa in risalto anche per 3 e 8. Malgrado l'assenza di un azoto carico positivamente, tutti i ciclopentapeptidi studiati mostrano un' interazione con il residuo Asp147, in entrambe le orientazioni. Inoltre nell'Orientazione 2 il ruolo di Glu229 proposto nel modello di binding per EM-2²¹⁴ sembra essere rimpiazzato da Glu310 , in quanto entrambi i residui sono localizzati all'ingresso della tasca recettoriale, in

²¹⁴ In Y, Minora K, Tomoo K, Sasaki Y, Lazarus LH, Okada Y & Ispida, *FEBS J.* **2005**, 272, 5079-5097.

una struttura a loop flessibile, e in grado, quindi, di interagire con i ligandi. Le due orientazioni principali dei peptidi sono state ottimizzate tramite il sistema ibrido QM/MM. Questa procedura ha portato alla luce un'interazione strategica tra D-Trp3 e Trp293 nell'Orientazione 2. Ovviamente questa orientazione risulta assente nell'Orientazione 1 (la molecola è ribaltata). Questo contatto D-Trp3 - Trp293 è di interesse, infatti è stato osservato che dopo il binding di un agonista, il Trp293 di TMHVI viene portato ad una rotazione per formare un'interazione efficiente di stacking con Tyr1 del ligando²¹⁵. Il riarrangiamento di Trp293 è accompagnato da una rotazione di 20° di TMHVI, portando alla formazione di una tasca polare delimitata da TMH III, VI, e VII. In particolare questo meccanismo induce TMH VI a muoversi verso TMH V. Il movimento complessivo dell'elica è responsabile del riarrangiamento dei residui polari nella regione del citoplasma in maniera tale da determinare l'attivazione della proteina G. In accordo con queste considerazioni, la forte interazione di stacking tra D-Trp3 e Trp293 può essere implicata nella modulazione dei movimenti dell'elica essenziali per l'attivazione del recettore dopo il binding di 3. Infine, per valutare il contributo di polarizzazione di QM/MM nei confronti del ligando è stata calcolata l'energia di interazione tra ligando e ambiente circostante. Malgrado il limitato movimento dei residui del sito di binding, il metodo QM/MM conferma l'incremento nel binding dell'Orientazione 2 rispetto all'Orientazione 1, misurabile in una differenza nell'energia di binding di ~21 kcal/mol (-9180 and -9201 kcal/mol per l'Orientazione 1 e 2 rispettivamente), una differenza di energia che non era prevedibile considerando le differenze di composizione nel sito di binding o per l'ingombro sterico. Quando i ligandi raggiungono il sito di binding, essi possono essere polarizzati da una distribuzione di carica asimmetrica dei residui con un momento dipolare permanente (Ser, Thr, Asn, Tyr, Trp, Cys e His) localizzati sulla superficie del sito di binding, e questi effetti di polarizzazione possono essere ottenuti usando una descrizione del ligando di tipo QM. Guardando alla struttura elettronica dei ligandi nella loro conformazione legata, possiamo osservare che entrambe le orientazioni tendono alla sovrapposizione dei loro momenti dipolari con quello del sito di binding. (**Fig.15**).

²¹⁵ Fowler CB, Pogozheva ID, Lomize AL, LeVine H & Mosberg H.I. *Biochemistry*, **2004**, *43*, 15796 -15810.

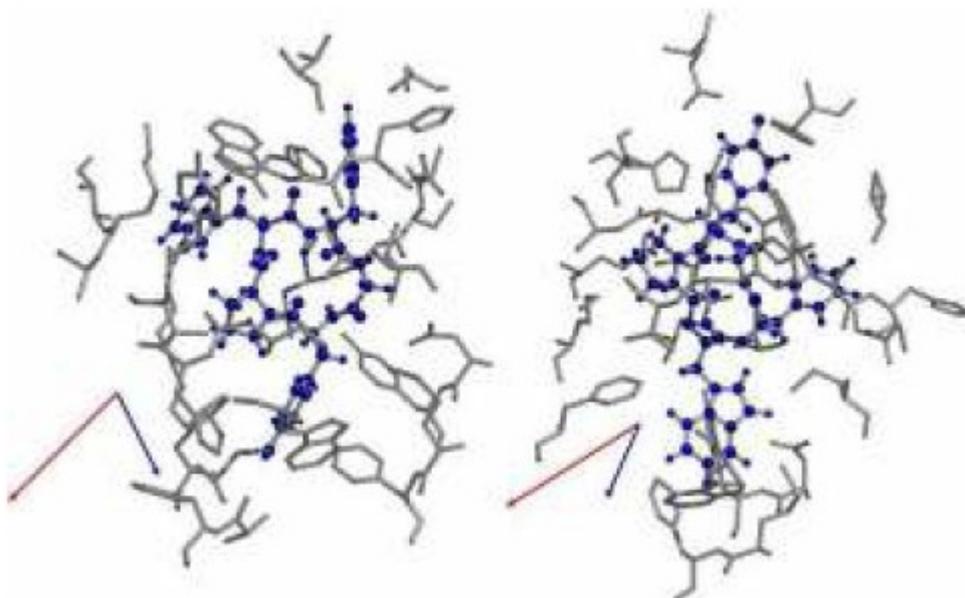


Fig. 15. Rappresentazione della parte QM part del complesso ligando-MOR nell'Orientazione 1 (sinistra) e 2 (destra). In entrambi i casi il ligando è rappresentato in “ball and stick” e la porzione amminoacidica è mostrata in “stick”. I momenti dipolari sono rappresentati da :freccia viola, per il sito di binding e freccia blu per il ligando.

Questa conformazione è in grado di promuovere il binding in quanto il momento di dipolo addizionale indotto nel ligando porta ad una forte interazione di Coulomb tra 3 e il sito di binding, assicurando così un'interazione migliore dipolo/dipolo con l'ambiente recettoriale.

Per entrambe le Orientazioni 1 e 2, se le conformazioni adottate dal ligando sono coerenti con queste considerazioni, il contributo del momento di dipolo addizionale indotto all'ambiente del sito di binding porta alla creazione di altri momenti di dipolo, con un contributo netto in termini di energia di interazione ligando-recettore che varia da -1 to -5 kcal/mole. Questo effetto è particolarmente importante per l'Orientazione 2, dove l'interazione dipolo/dipolo con l'ambiente recettoriale porta ad un momento di dipolo risultante di 133 Debye, per l'Orientazione 1 invece il valore è di 70 Debye. Infine, dalle analisi dei risultati delle ottimizzazioni QM/MM, si deduce anche in questo caso che l'effetto principale sia quello elettronico; questo, insieme all'ingombro sterico porta a direzionare il binding verso l'Orientazione 2.

CAPITOLO 6

6.1 SINTESI DI AGONISTI DEL RECETTORE H₃²¹⁶: IMMETHRIDINE E IMMEPIP.

L'istamina (o 2-(4-imidazolil)etilammina, formula C₅H₉N₃) è uno dei mediatori chimici dell'infiammazione e deriva dalla decarbossilazione dell'istidina ad opera della istidina decarbossilasi; condivide in questa sede numerosi effetti con la serotonina.

L'istamina ha anche azioni come neurotrasmettitore.

Sono conosciuti quattro recettori dell'istamina, H₁, H₂, H₃ e H₄, sono tutti recettori correlati con la proteina G (analogia con i recettori oppioidi) ed ognuno correlato con una specifico effettore biologico²¹⁷ (**Fig.1**)

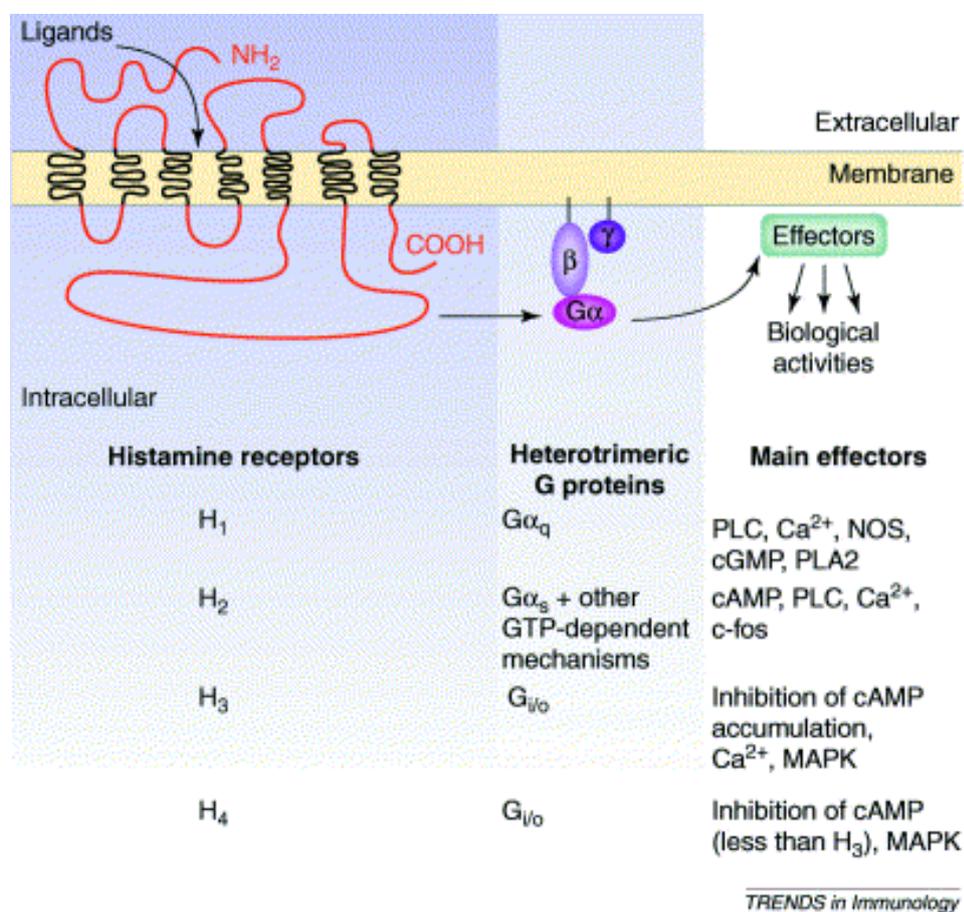


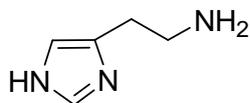
Fig.1

²¹⁶ R.Leurs e al., *TiPS*, 1998

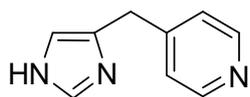
²¹⁷ Schneider E. et al., *Trends in Immunology*, 23, 255-263, 2002

Il recettore **H3**, localizzata prevalentemente negli autorecettori presinaptici nel SNC, controlla la sintesi neuronale dell'istamina e svolge un ruolo fondamentale nella modulazione del rilascio di altri neurotrasmettitori: serotonina, noradrenalina, colina, dopamina e neuropeptidi. Studi farmacologici hanno provveduto a fare chiarezza sul possibile utilizzo clinico di ligandi H3 selettivi, in particolare agonisti di H3 sono considerati potenziali agenti terapeutici nel trattamento di disordini neurologici come l'obesità, l'epilessia, disordini del sonno e deficit cognitivi e di memoria. Durante il periodo di ricerca presso il gruppo di ricerca del prof.R.Leurs, Vrije Univeriteit di Amsterdam, sono stati sintetizzati due analoghi dell'istamina, in cui viene mantenuto il residuo imidazolico, mentre la funziona amminica primaria viene modificata : le due molecole , immethridine e immepip, presentano rispettivamente un residuo amminico aromatico e uno alifatico ciclico; queste strutture risultano di gran lunga più lipofile rispetto al composto nativo (parametri migliori nella Lipinski's Rule of Five) , presentano una minore flessibilità. Inoltre la basicità del residuo, così modificata²¹⁸, risulta favorevole all'attività biologica dei composti considerati.

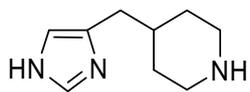
Istamina



Immethridine

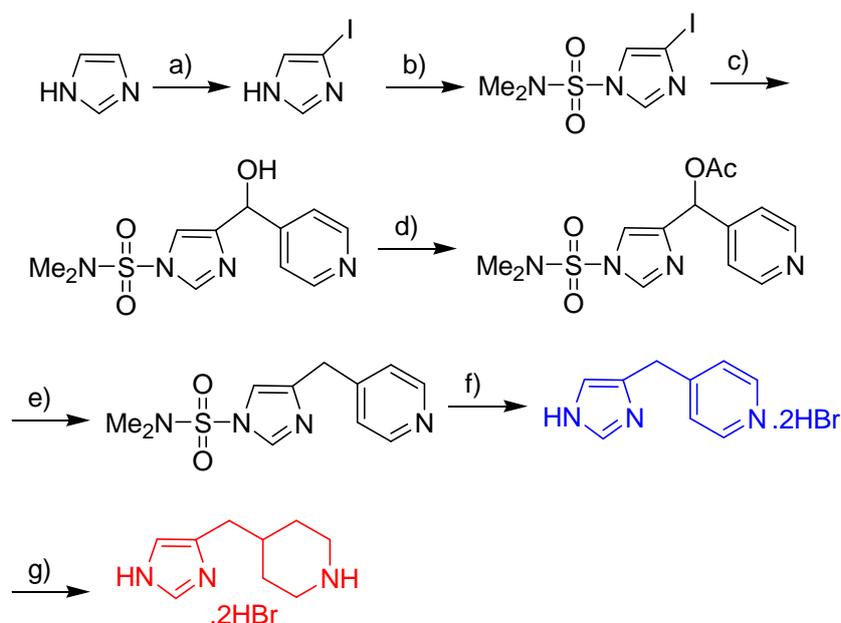


Immepip



²¹⁸ 2 Kitbunnadaj, R. et al, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5445.

La via sintetica seguita prevede la contemporanea sintesi dei due composti sopraccitati: Imnepip infatti viene ottenuta direttamente dal sale di bromo di Immethridine, per riduzione dell'anello aromatico piridinico. Da sottolineare come la procedura di sintesi dei due composti non presenti nessuna purificazione per via cromatografia, ma soltanto processi di triturazione o ricristallizzazione.



(a) (i) I₂, KI, H₂O, RT. (ii) Na₂SO₃, 30 % EtOH/H₂O, reflux T, 1d, 43 %. (b) Me₂NSO₂Cl, NaOH, THF, RT, 20 h, 88 %. (c) (i) EtMgBr, DCM/THF, RT, 45 min. (ii) 4-pyridine-carboxaldehyde, RT, 20 h, 75 %. (d) Ac₂O, DMAP, Et₃N, DCM, RT, 20 h, 100 %. (e) Pd/C 10 %, MeOH, 50 bar H₂, 24h, 76 %. (f) (i) 48 % HBr, riflusso 24 h. (ii) H₂O/EtOH, riflusso, 68 %. (g) PtO₂, H₂O/AcOH, 1 bar H₂, 24 h, 98 %.

I due prodotti ottenuti sottoposti a test biologici (spiazzamento di [3H]-N α -metilistamina dalla membrana di cellule SK-N-MC , che esprimono il recettore H3) hanno dimostrato di essere potenti agonisti verso il recettore H3: **immethridine, pKi=9.1, pEC50=9.7; Imnepip, pki=9.32, pEC50=9.88**. Da questo risultato sono derivati poi studi di selettività tra il recettore H3 e H1, H2, H4, mostrando come i composti dati abbiano un binding preferenziale nei confronti di H3.

I composti sintetizzati costituiscono quindi dei potenziali farmaci e , in generale, degli ottimi “lead” per la ricerca di nuovi composti attivi nei confronti di H3.

CAPITOLO 7-PARTE SPERIMENTALE

STRUMENTAZIONE E MATERIALI

Sono stati utilizzati starting material commerciali (Sigma-Aldrich o Invitrogen) senza purificazioni ulteriori. La linea cellulare SK-MEL-24 (melanoma umano) è stata ottenuta da American Tissue Type Collection (ATCC); BSS da Invitrogen; il siero fetale bovino da Cambrex; PBS da Cambrex; Fibronectina (FN) da Sigma-Aldrich. Flash chromatography è stata condotta su Merck silica gel 60 (230-400 mesh) usando MeOH e EtOAc come solventi . ES-MS sono state condotte con HP 1100MSD. RP-HPLC analitica è stata fatta su HP Series 1100, HP Series 1100, con una colonna HP Hypersil ODS, 4.6 μm (particle size), 100 Å (pore diameter), 250 mm, DAD 210 nm, da 9:1 H₂O/CH₃CN a 2:8 H₂O/CH₃CN in 20 min, con flusso di 1.0 mL/min , seguito da 10 min con la stessa composizione. La purificazione semi-preparativa RP-HPLC è stata condotta su HP Series 1100 usando una colonna Zorbax Eclipse XDB C18 , 7 μm (particle size), 21.2 x 150 mm, da 9:1 H₂O/CH₃CN a 3:7 H₂O/CH₃CN in 15 min, flusso di 12 mL/min . Gli esperimenti di fluorimetria per la valutazione del numero di cellule adese sono stati condotti con Victor²-Wallac-1420 multilabel counter. Gli spettri di Risonanza Magnetica Nucleare sono stati registrati utilizzando campioni da mm in cui il peptide veniva sciolto ad una concentrazione di 0.01M a 400Mhz a RT. I chemical shifts sono riportati in ppm relativamente al picco del solvente deuterato: CDCl₃ definito a 7.27 ppm e a 77.0 per ¹³CNMR , DMSO definito a 2.50 ppm, D₂O definito a 4.63 ppm e CD₃OD definito a 3.31 ppm. Gli esperimenti di VT-¹H-NMR sono stati condotti in un range di 298-348 °K.

Gli spettri 2D spectra sono stati acquisiti “in the phase sensitive mode” e processati usando un’apodizzazione “squared sine-bell” spostata di 90° . I segnali ¹H-NMR sono stati assegnati dagli spettri COSY e ROESY . Gli esperimenti gCOSY sono stati registrati con un intervallo di larghezza al protone di 9595.8 Hz. Gli esperimenti ROESY sono stati condotti utilizzando un mixing-time variabile da struttura a struttura di 350-500 ms con un intervallo di 3087.8 Hz.

Le analisi combinate di Cromatografia-spettrometria di massa (GC-MS) sono state eseguite con un gas cromatografo HP-5890 accoppiato ad un analizzatore di massa a quadrupolo HP-5970, con colonna capillare metil silicone crosslinked (lunghezza 12 m, diametro interno 0.2 mm, spessore del film 0.33 μm , gas di trasporto elio con flusso 30mL/min).

Le masse dei peptidi sono state ottenute con uno spettrometro di massa a singolo quadrupolo HP 1100 series, interfacciata con ionizzazione electrospray.

Le flash-cromatografie sono state effettuate con silice Merk 60 (230-400 mesh).

La cromatografia su strato sottile (TLC) è stata eseguita su piastre Merk Kiesegel 60.

RP-HPLC analitica è stata eseguita su un HP Series 1100.

SINTESI DEGLI ANTAGONISTI DI INTEGRINE -RPD-

I peptidi sono stati ottenuti per sintesi su fase solida (SPPS) utilizzando la chimica dello Fmoc . La resina Wang resin (0.25 g, 0.5 mmol/g) sospesa in 9:1 DCM/DMF (4 mL) è stata trattata con una soluzione di Fmoc-Asp(OtBu)-OH (0.21 g, 0.5 mmol) e HOBt (0.07 g, 0.5 mmol) in DMF (2 mL), seguita da DCC (0.11 g, 0.5 mmol) e una quantità catalitica di DMAP. La miscela è stata agitata meccanicamente per 5 h, e poi è stata filtrata. La resina è stata successivamente lavata con DMF (5 mL), CH₃OH (5 mL), e DCM (5 mL). Il capping della resina (bloccare i gruppi OH che non hanno reagito con l'amminoacido) è stato fatto in DCM (5 mL), Ac₂O (0.3 mL) e piridina (0.3 mL), agitando meccanicamente. Dopo 0.5 h, il tutto è stato filtrato e la resina lavata due volte con DMF (5 mL), CH₃OH (5 mL), e DCM (5 mL).

Il gruppo Fmoc è stato rimosso con 4:1 DMF/piperidine (4 mL) sotto agitazione meccanica. Dopo 15 min la miscela è stata filtrata e la resina è stata lavata con DCM (5 mL) e trattata con una seconda porzione di 4:1 DMF/piperidine. Dopo 20 min, la miscela è stata filtrata e la resina lavata due volte con DMF (5 mL), CH₃OH (5 mL), DCM (5 mL).

I residui successive sono stati introdotti seguendo la stessa procedura riportata in precedenza, senza l'ausilio di DMAP cat e con l'esclusione del passaggio di Capping. Per verificare l'avvenuto coupling tra i residui sono stati utilizzati due test qualitative: test di Kaiser e il chloranil test.^{i,ii}

Peptidi 3-10: introduzione del gruppo guanidino.

Il peptide N-deprotetto legato alla resina è stato sospeso in DMF (3 mL) e trattato con *N,N'*-di-Boc-1*H*-pyrazole-1-carboxamide (0.5 mmol, 0.16 g) e tenuto in agitazione per 24 h. Successivamente è stato filtrato e lavato due volte con DMF (5 mL), CH₃OH (5 mL), DCM (5 mL). La reazione è stata monitorata tramite il test di Kaiser.

Cleavage del peptide.

Si è aggiunta Benzilammina (1mL) (per **9** propylamine) alla resina con legato il peptide sospesa in DCM (2 mL). Dopo 24 h di agitazione la miscela è stata filtrata e lavata due volte con MeOH (4 mL). Il filtrato raccolto è stato distillato e si è ottenuto un olio giallo.

Questo residuo è stato purificato tramite flash-cromatografia su gel di silice (eluant EtOAc:MeOH 98:2), ottenendo il peptide protetto (70-80%).

Deprotezione delle catene laterali.

I peptide protetti sono stati trattati con una miscela 88:3:3:3:3 TFA/PhOH/PhSCH₃/TIPS/H₂O a RT, sotto agitazione meccanica. Dopo 6 h i volatili sono stati evaporate sotto flusso di azoto e il residuo è stato tritato con Et₂O. Il precipitato è stato centrifugato (5 min at 4000 rpm) e il surnatante eliminato (contiene scavenger). Il peptide deprotetto è stato purificato con RP-HPLC, da 9:1 H₂O/CH₃CN a 100% CH₃CN in 10 min, ottenendo così i peptidi **1-10** (70-80%), 93-97% (RP-HPLC analisi).

¹H-NMR di **3** (300 MHz, DMSO-d₆, J in Hz) d: 11.45 (s, 1H), 8.55 (d, J = 8.7, 1H), 8.34 (t, J = 5.0, 1H), 8.23 (t, J = 4.2, 1H), 7.10–7.30 (m, 5H), 4.50–4.65 (m, 1H), 4.19–4.25 (m, 2H), 4.12–4.19 (m, 1H), 3.42–3.51 (m, 2H), 3.12–3.23 (m, 2H), 2.80 (dd, J = 5.0, 15.1, 1H), 2.41 (dd, J = 8.5, 15.1, 1H), 2.19–2.25 (m, 2H), 1.91–2.02 (m, 2H), 1.65–1.90 (m, 2H), 1.45–1.60 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.35 (s, 18H).

SINTESI DEI PMRI-CTPs

I PMRI-CTPs sono stati sintetizzati tramite ciclizzazione in soluzione dei corrispondenti tetrapeptidi PMRI lineari. Questi precursori sono stati ottenuti tramite procedure standard di sintesi di oligopeptidi in soluzione.

L'acido tert-butil estere 2-amminoetil-carbamico è stato preparato a partire da 1,2-etandiammina e tert-butil fenilcarbonato.²¹⁹ Il fenilmetil idrogeno propandioato è stato sintetizzato dall'acido di Meldrum e alcol benzilico.²²⁰ L'acido (2-ammino-1-benziletil) carbamico benzilestere è stato ottenuto riducendo Cbz-Phe-NH₂²²¹ con BH₃²²². L'acido (2-ammino-etil) carbamico 9H-fluoren-9-ilmetil estere è stato preparato come in letteratura.²²³

Il dipeptide **b** è stato preparato a partire dall'acido di Meldrum e NH₂-Ala-OBz. Una soluzione di acido di Meldrum (0.85g, 6 mmol) e NH₂-Ala-OBz (0.90g, 5 mmol) in CH₃CN (10 mL) è stata riscaldata a 70°C in atmosfera inerte. Dopo 5 ore è stata aggiunta una

²¹⁹ Pittelkow, M.; Lewinsky, R.; Christensen, J. B. *Synthesis* 2002, 15, 2195.

²²⁰ Felder, D.; Gutiérrez Nava, M.; del Pilar Carreón, M.; Eckert, J.-F.; Luccisano, M.; Schall, C.; Masson, P.; Gallani, J.-L.; Heinrich, B.; Guillon, D.; Nierengarten, J.-F. *Helv. Chim. Acta* 2002, 85, 288.

²²¹ Nakabayashi, S.; Warren, C. D.; Jeanloz, R. W. *Carbohydrate Res.* 1988, 174, 279

²²² Morie, T.; Kato, S.; Harada, H.; Fujiwara, I.; Watanabe, K.; Matsumoto, J.-I. *J. Chem Soc. Perkin Trans. 1* 1994, 2565.

²²³ Boeijen, A.; van Amajide, J.; Liskamp, R. M. J. *J. Org. Chem.* 2001, 66, 8454.

miscela di cicloesano/etere nelle proporzioni 4:1 (40mL); il residuo oleoso ricavato per precipitazione è stato separato. Questo residuo è stato lavato per due volte con una miscela di cicloesano/etere nelle proporzioni 4:1 (20mL), l'olio denso ricavato è stato diluito con acetato (40mL) e lavato due volte con una soluzione di acido cloridrico 0.1M (5mL). La fase organica è stata anidrificata con solfato di sodio, il solvente è stato evaporato a pressione ridotta fornendoci il composto **b** nella forma di un solido ceroso (0.91g, 69), che è stato usato per gli ulteriori passaggi, senza ulteriori purificazioni

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): 1.40 (d, J=7.2 Hz, 3H, CH₃), 3.40 (s, 2H, COCH₂CO), 4.59-4.66 (m, 1H, AlaH α), 5.20 (s, 2H, CH₂Ph), 7.25-7.41 (m, 5H, Ph), 7.80 (br.d, 1H, NH), 9.40-10.1 (br.s, 1H, COOH).

I legami peptidici tra i vari residui sono stati ottenuti mediante metodi standard di sintesi in soluzione. Come procedura generale, HOBt (1.2 equiv) è stato aggiunto ad una miscela con l'amminoacido N-protetto in DCM/DMF 9/1 a temperatura ambiente in atmosfera inerte. Dopo 10 min sono stati aggiunti: la diammina N-monoprotetta (1 equiv), il sale EDCI-HCl (1.2 equiv) e TEA (2.2 equiv) il tutto a temperatura ambiente e in atmosfera inerte. Dopo 6 ore, la miscela è stata diluita con DCM e la soluzione è stata lavata con acido cloridrico 0.5M, con una soluzione satura di bicarbonato di sodio e brine. La fase organica è stata anidrificata con solfato di sodio ed il solvente è stato rimosso per evaporazione a pressione ridotta. I peptidi sono stati isolati mediante precipitazione da Etere (vd.capitolo 3). La purezza dei peptidi (93-97%) è stata determinata mediante analisi RP-HPLC/ES-MS.

Deprotezione del gruppo Boc

Questa deprotezione è stata effettuata con un trattamento di TFA/DCM 1:2 a temperatura ambiente. Dopo 20 minuti la miscela è stata fatta evaporare a pressione ridotta ed il residuo rimanente è stato trattato nuovamente per 20 minuti con la stessa soluzione TFA/DCM 1:2. Dopo l'ultima evaporazione del solvente della miscela, il residuo è stato triturato con etere ed il precipitato è stato filtrato. L'ammina deprotetta è stata usata per accoppiamenti successivi senza ulteriori purificazioni.

Deprotezione del gruppo Fmoc

Questa deprotezione è stata effettuata con un trattamento di DMA in THF (2M) a temperatura ambiente. Dopo 20 minuti, il solvente della soluzione è stato fatto evaporare a

pressione ridotta; il trattamento è stato ripetuto. Dopo l'evaporazione finale del solvente, il residuo è stato utilizzato senza ulteriori purificazioni.

Deprotezione del gruppo CBz

Questa deprotezione è stata effettuata con un trattamento di idrogeno gassoso in presenza del catalizzatore: carbonio palladiato (Pd/C) in metanolo a temperatura ambiente. Dopo 6 ore la miscela è stata filtrata su di uno strato di celite; il solvente è stato fatto evaporare a pressione ridotta. Il residuo è stato utilizzato senza ulteriori purificazioni.

Sintesi dei tetrapeptidi ciclici

I tetrapeptidi linari deprotetti vengono messi in soluzione con DMF (1mL/mg di peptide) in presenza di DPPA (2 equiv) e bicarbonato di sodio (15 equiv) a temperatura ambiente in atmosfera inerte. Dopo 48 ore il solvente è stato distillato a pressione ridotta; il residuo viene diluito con acqua e la soluzione viene estratta tre volte con acetato. L'acetato viene fatto evaporare a pressione ridotta. I PMRI-CTPs, prodotti con una resa del 60-70%, sono stati purificati con una RP-HPLC semipreparativa.

La purezza, tra 93-97%, è stata determinata mediante analisi RP-HPLC/ES-MS.

Dati tecnici delle analisi sui composti

6. ES-MS m/z: 347.3 (M+1); calcd: 347.2; ¹H-NMR (DMSO-d₆): 1.28 (d, J=6.9 Hz, 3H, CH₃), 2.80-3.00 (m, 2H, CH₂CH₂), 2.89 (dd, J=11.0, 14.1 Hz, 1H, PheHβ), 3.09 (dd, J=4.5, 14.0 Hz, 1H, PheHβ), 3.16 (d, J=10.3, 1H, COCH₂CO), 3.20 (d, J=10.3, 1H, COCH₂CO), 3.20-3.35 (m, 2H, CH₂CH₂), 3.90-4.10 (m, 1H, AlaHα), 4.12-4.22 (m, 1H, PheHα), 6.67 (br.t, J= 4.8 Hz, 1H, NHb), 6.94 (br.t, J=5.7 Hz, 1H, NHa), 7.00-7.20 (m, 5H, Phe), 9.03 (d, J=5.7 Hz, 1H, AlaNH), 9.06 (d, J=7.2, 1H, PheNH).

6'. ES-MS m/z: 347.1 (M+1); calcd: 347.2; ¹H-NMR (DMSO-d₆): 1.21 (d, J= 6.8 Hz, 3H, CH₃), 2.79 (d, J=11.4, 1H, COCH₂CO), 2.82 (dd, J=10.8, 14.3 Hz, 1H, D-PheHβ), 2.91-3.07 (m, 1H, NHbCH₂), 3.07-3.10 (m, 2H, NHaCH₂), 3.12 (dd, J=4.6, 14.3 Hz, 1H, D-PheHβ), 3.15-3.24 (m, 1H, NHbCH₂), 3.28 (d, J=11.4, COCH₂CO), 4.00-4.10 (m, 1H, AlaHα), 4.32-4.40 (m, 1H, D-PheHα), 7.09 (br.t, J=5.4 Hz, 1H, NHa), 7.10-7.18 (m, 6H, NHb+ArH), 9.00 (d, J=7.2 Hz, AlaNH), 9.08 (d, J=8.0 Hz, D-PheNH).

8. ES-MS m/z: 437.1 (M+1); calcd: 437.2; ¹H-NMR (DMSO-d₆): 1.03 (d, J=7.2 Hz, 3H, CH₃), 2.57 (dd, J=10.0, 14.0 Hz, 1H, PhCH₂CHNHa), 2.75 (dd, J=5.6, 14.0 Hz, 1H, PhCH₂CHNHa), 2.89 (dd, J=8.7, 15.0 Hz, 1H, PheHβ), 2.94-3.11 (m, 2H, NHbCH₂), 3.09 (dd, J=3.6, 15.0 Hz, 1H, PheHβ), 3.13 (d, J=10.3, 1H, COCH₂CO), 3.17 (d, J=10.3, 1H,

COCH₂CO), 3.86 (dq, J=5.7, 7.3 Hz, 1H, AlaH α), 3.88-3.98 (m, 1H, NHaCH), 4.30-4.39 (m, 1H, PheH α), 6.16 (d, J=8.4 Hz, 1H, NHa), 6.82 (br.t, 1H, NHb); 7.03-7.16 (m, 10H, ArH), 9.00 (d, J=6.0 Hz, 2H, PheNH+AlaNH).

SINTESI DI INIBITORI DI INTEGRINE PMRI-CTP

I composti PMRI-CTPs protetti **1p** e **2p** sono stati trattati con una miscela di TFA/PhOH/PhSCH₃/TIPS/H₂O nelle proporzioni 88:3:3:3:3, a temperatura ambiente e sotto costante agitazione meccanica. Dopo 6 ore è stato fatto evaporare il solvente sotto flusso d'azoto costante; il residuo è stato triturato con etere. Il precipitato risultante è stato centrifugato per 5 min a 4000rpm; il sovranatante è stato eliminato.

I peptidi deprotetti sono stati purificati tramite RP-HPLC semipreparativa con una resa di circa il 75%; l'indice di purezza di circa il 96% è stato rilevato tramite analisi RP-HPLC.

Dati tecnici sull'analisi dei composti

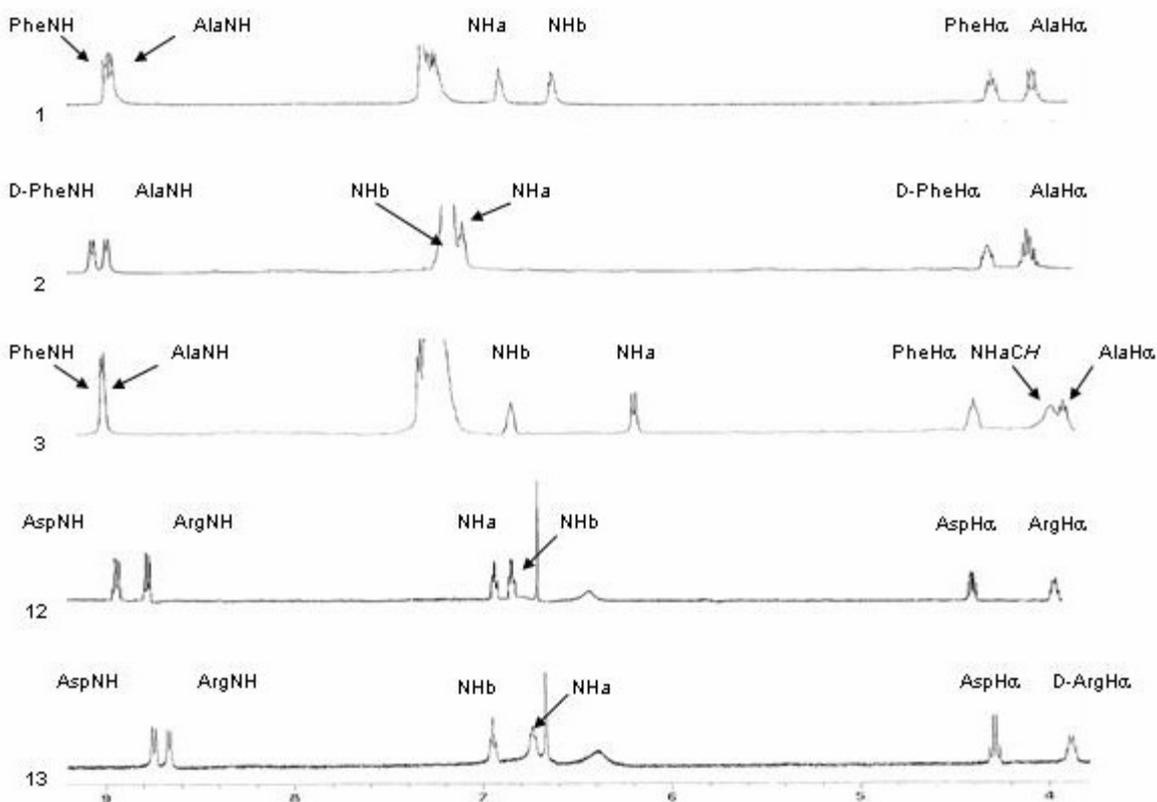
1p. ES-MS m/z: 668.2 (M+1); calcd: 668.3; ¹H-NMR (DMSO-d₆): 1.36-1.42 (m, 1H ArgH γ), 1.40 (s, 9H, t-Bu), 1.45-1.55 (m, 2H, ArgH γ +ArgH β), 1.62-1.68 (m, 1H, ArgH β), 1.99 (s, 3H, 3'-CH₃), 2.49 (dd, J= 6.0, 16.2 Hz, 1H, AspH β), 2.50 (s, 3H, 2'-CH₃), 2.60 (s, 3H, 6'-CH₃), 2.68 (dd, J=5.1, 16.2 Hz, 1H, AspH β), 2.92-3.00 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.00-3.10 (m, 2H, ArgH δ), 3.13 (d, J=10.8 Hz, 1H, COCH₂CO), 3.13-3.21 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.19 (d, J=10.8 Hz, 1H, COCH₂CO), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 3.91 (br.q, 1H, ArgH α), 4.36 (br.q, 1H, AspH α), 6.41 (br.s, 2H, ArgNH η), 6.69 (s, 1H, 5'-ArH), 6.79 (t, J=5.4 Hz, 1H, NHb), 6.89 (t, J=5.4 Hz, 1H, NHa), 6.90 (br.s, 1H, ArgNH ϵ), 8.77 (d, J=6.6 Hz, 1H, ArgNH), 8.89 (d, J=7.2 Hz, 1H, AspNH).

2p. ES-MS m/z: 668.2 (M+1); calcd: 668.3; ¹H-NMR (DMSO-d₆): 1.37 (s, 9H, t-Bu), 1.30-1.40 (m, 1H, D-ArgH γ), 1.42-1.55 (m, 2H, D-ArgH γ +D-ArgH β), 1.58-1.65 (m, 1H, D-ArgH β), 2.03 (s, 3H, 3'-CH₃), 2.42 (dd, J=7.2, 16.0 Hz, 1H, AspH β), 2.47 (s, 3H, 2'-CH₃), 2.57 (s, 3H, 6'-CH₃), 2.81 (dd, J=6.4, 16.0 Hz, 1H, AspH β), 2.96 (d, J=10.5 Hz, 1H, COCH₂CO), 2.97-3.12 (m, 4H, NHbCH₂+D-ArgH δ), 3.22 (d, J=10.5 Hz, 1H, COCH₂CO), 3.30-3.40 (m, 2H, NHaCH₂), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 3.88 (br.q, J=8.0 Hz, 1H, D-ArgH α), 4.28 (q, J=7.3 Hz, 1H, AspH α), 6.40 (br.s, 2H, D-ArgNH η), 6.66 (s, 1H, 5'-ArH), 6.74 (t, 1H, NHa), 6.94 (t, J=5.8 Hz, 1H, NHb), 6.90 (br.s, 1H, D-ArgNH ϵ), 8.66 (d, J=6.8 Hz, 1H, D-ArgNH), 8.74 (d, J=8.0 Hz, 1H, AspNH).

1. ES-MS m/z : 399.4 (M+1); calcd: 399.2; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): 1.43-1.61 (m, 2H, ArgH γ), 1.63-1.79 (m, 2H, ArgH β), 2.40-2.48 (m, 1H, AspH β), 2.82-2.99 (m, 3H, AspH β +NCHCH), 3.01-3.17 (m, 4H, ArgH δ +NCHCH), 3.20 (br.s, 2H, COCH $_2$ CO), 4.05-4.19 (m, 1H, ArgH α), 4.21-4.32 (m, 1H, AspH α), 6.79 (br.t, 1H, NHb), 6.94 (br.t, 1H, NHa), 7.41 (br.s, 4H, ArgNH η +ArgNH ϵ), 9.01 (d, $J=5.4$ Hz, 1H, ArgNH), 9.06 (d, $J=6.9$ Hz, 1H, AspNH).

2. ES-MS m/z : 399.3 (M+1); calcd: 399.2; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): 1.40-1.60 (m, 2H, ArgH γ), 1.60-1.80 (m, 2H, ArgH β), 2.45-2.55 (m, 1H, ArgH β), 2.85-2.98 (m, 2H, AspH β +COCH $_2$ CO), 2.99-3.13 (m, 4H, NHbCH $_2$ +ArgH δ), 3.22-3.39 (m, 3H, COCH $_2$ CO+NHaCH $_2$), 4.00-4.10 (m, 1H, ArgH α), 4.21-4.32 (m, 1H, AspH α), 6.74 (br.t, 1H, NHa), 6.94 (br.t, 1H, NHb), 7.30 (br.s, 4H, ArgNH η +ArgNH ϵ), 8.99 (d, $J=6.0$ Hz, 1H, ArgNH), 9.11 (d, $J=7.0$ Hz, 1H, AspNH).

SPETTRI $^1\text{H-NMR}$ (400MHz) DEI PMRI-CTPs IN DMSO- d_6 MODELLI 6, 6', 8, 1p e 2p



ANALISI CONFORMAZIONALI

Le simulazioni conformazionali Restrained MD dei modelli **1-3**, sono state condotte utilizzando il software di simulazione dei campi di forza AMBER (valore di distance dependent $\epsilon = 4.0 \times r$). Le simulazioni sono state calcolate a 1200 °K per generare le prime 100 strutture random, usate poi come basi per aggiungere progressive restrizioni (restrained MD) ed ottenere nuovi modelli conformazionali fino al punto in cui sono state inserite tutte le restrizioni (full restraints distance force constant: 7 kcal/mol Å²). A causa dell'assenza di segnali ROESY incrociati tra H α -COCH₂CO o H α -NHCH (*i, i+1*), i legami ω sono stati settati a 180° (force constant: 16 kcal/molÅ²).

Soltanto i parametri restrittivi forniti dall'analisi ROESY sono stati inseriti nel software di simulazione Molecular Dynamics. Le intensità dei segnali ROESY sono state classificate e calibrate sull'intensità dei segnali dei protoni geminali. I valori e le classificazioni sono rispettivamente: very strong, strong, medium, e weak signals assegnati alle rispettive distanze 2.3±0.2, 2.6±0.2, 3.0±0.3, and 4.0±0.4 Å.

Le strutture risultanti sono state minimizzate con 3000 cicli “*steepest descent*” e con 3000 cicli di “*conjugated gradient*” (convergence: 0.01kcal/Å mol). Le strutture che hanno mostrato la più bassa energia interna ed il minor numero di violazioni dei dati sperimentali sono state selezionate ed analizzate.

Sono state effettuate anche simulazioni dei modelli con Molecular Dynamics, in acqua esplicita a 298°K, usando i parametri AMBER per i campi di forza, in box 30x30x30 Å con il parametro “*minimum solvent-solute distance*” a 2.3 Å; temperatura e pressione costanti.

Tab 2. ROESY cross-peaks non usuali, osservati per il modello **6** in DMSO-d₆ a 400 MHz (r.t.).

Cross peak	Intensità	Cross peak	Intensità
PheNH-NHb	S	AlaNH-NHa	s
PheNH-PheH α	M	AlaNH-AlaH α	m
PheNH-COCH ₂ CO _(3,2)	W	PheNH-COCH ₂ CO _(3,1)	vs
AlaNH-COCH ₂ CO _(3,2)	Vs	AlaNH-COCH ₂ CO _(3,1)	w
NHb-PheH α	S	NHa-AlaH α	s
NHb-NCH ₂ CH _{2(2,9)}	Vs	NHb-NCH ₂ CH _{2(3,3)}	m
NHa-NCH ₂ CH _{2(2,9)}	M	NHa-NCH ₂ CH _{2(3,3)}	vs
PheH α -PheH $\beta(2,9)$	M	PheH α -PheH $\beta(3,1)$	m
AlaH α -CH ₃	Vs	NHa-NHb	M

vs = very strong; s = strong; m = medium; w = weak.

Tab 3. ROESY cross-peaks non usuali, osservati per il modello **6'** in DMSO-d₆ a 400 MHz (r.t.).

Cross peak	Intensità	Cross peak	Intensità
PheNH-PheH α	S	AlaNH-AlaH α	M
AlaNH-PheNH	M	AlaNH-Me	Vs
PheNH-COCH ₂ CO _(2.79)	M	PheNH-COCH ₂ CO _(3.28)	S
AlaNH-COCH ₂ CO _(3.28)	Vs	NHa-AlaNH	M
NHb-PheNH	M	NHa-NHb	M
PheH α -PheH β _(2.82)	M	PheH α -PheH β _(3.1)	M
NHb-PheH α	S	NHa-AlaH α	S
NHa-CH ₂ _(3.1)	S	NHb-NHbCH ₂ _(3.2)	S
NHb-PheH β _(3.1)	S	NHb-NHbCH ₂ _(3.0)	M

vs = very strong; s = strong; m = medium; w = weak.

Tab 4. ROESY cross-peaks non usuali, osservati per il modello **8** in DMSO-d₆ a 400 MHz (r.t.).

Cross peak	Intensità	Cross peak	Intensità
AlaNH-NHa	S	AlaNH-COCH ₂ CO _(3.2)	Vs
AlaNH-AlaH α	M	AlaNH-COCH ₂ CO _(3.3)	W
PheNH-COCH ₂ CO _(3.2)	W	AlaNH-CH ₃	S
PheNH-COCH ₂ CO _(3.3)	Vs	PheNH-NHb	S
NHb-PheH α	M	PheNH-PheH α	M
NHa-NHb	M	NHb-NHbCH ₂	M
PhCH ₂ CHNHa-NHaCH	M	PhCH ₂ CHNHa-NHa	M
PhCH ₂ CHNHa-NHb	M	PhCH ₂ CHNHa _(2.75) -Ph	S
NHa-PhCH ₂ CHNHa _(2.57)	M	NHa-AlaH α	M
NHaCH-NHbCH ₂	S	NHa-NHaCH	M
NHaCH-PhCH ₂ CHNHa	M	PheH α -PheH β _(3.09)	M
PheH α -PheH β _(2.89)	M		

vs = very strong; s = strong; m = medium; w = weak.

Tab 5. ROESY cross-peaks non usuali, osservati per il modello **1p** in DMSO-d₆ a 400 MHz (r.t.).

Cross peak	Intensità	Cross peak	Intensità
AspNH-NHa	S	ArgNH-NHb	S
AspNH-AspH α	M	ArgNH-ArgH α	M
AspNH-COCH ₂ CO _(3.2)	W	AspNH-COCH ₂ CO _(3.1)	Vs
ArgNH-COCH ₂ CO _(3.2)	Vs	ArgNH-COCH ₂ CO _(3.1)	W

NHa-AspH α	S	NHb-ArgH α	S
NHa-NCH $_2$ CH $_2$ (2.9)	Vs	NHa-NCH $_2$ CH $_2$ (3.2)	M
NHb-NCH $_2$ CH $_2$ (2.9)	M	NHb-NCH $_2$ CH $_2$ (3.2)	Vs
AspH α -AspH β (2.5)	S	AspH α -AspH β (2.6)	S
ArgH α -ArgH β (1.4)	S	ArgH α -ArgH β (1.6)	M
AspNH-AspH β (2.5)	W	ArgH α -ArgH δ	W
ArgH α -ArgH γ	W	ArgH δ -2'-CH $_3$	M
NHa-NHb	M		

vs = very strong; s = strong; m = medium; w = weak.

Tab 6. ROESY cross-peaks non usuali, osservati per il modello **2p** in DMSO-d $_6$ a 400 MHz (r.t.).

Cross peak	Intensità	Cross peak	Intensità
AspNH-COCH $_2$ CO(3.2)	S	AspNH-COCH $_2$ CO(2.9)	M
ArgNH-COCH $_2$ CO(3.2)	Vs	ArgNH-COCH $_2$ CO(2.9)	W
ArgNH-ArgH α	M	AspNH-AspH α	Vs
NHa-AspH α	S	NHb-ArgH α	S
AspNH-AspH β (2.4)	W	NHa-AspH β (2.8)	Vs
ArgNH-NHb	M	AspNH-NHa	M
NHb-NHbCH $_2$	Vs	NHa-NHaCH $_2$	M
ArgNH-ArgH β (1.5)	M	ArgNH-ArgH β (1.6)	M
AspNH-ArgNH	M	NHa-NHb	M
AspH α -AspH β (2.8)	M	AspH α -AspH β (2.4)	M
ArgH α -ArgH β (1.6)	M	ArgH α -ArgH β (1.4)	M
ArgH α -ArgH δ	W		

vs = very strong; s = strong; m = medium; w = weak.

SAGGI DI ADESIONE CELLULARE

Ognuno dei 96 pozzetti delle piastre è stato ricoperto di fibronectina. Le cellule utilizzate del tipo SK-MEL-24, sono state preincubate con varie concentrazioni dei peptidi (30min a temperatura ambiente); aliquote di questa sospensione sono state aggiunte, in quadruplicato, ai pozzetti rivestiti di fibronectina. Il numero di cellule adese è stato quantificato mediante fluorometria. L'attività dei potenziali antagonisti è stata determinata comparando il numero di cellule adese con il numero di cellule nel controllo. Come composto di riferimento, antagonista delle integrine $\alpha_v\beta_3$, abbiamo considerato il modello AcDRGDS, il quale

mostra un valore di IC_{50} dell'ordine $0.2 \cdot 10^{-7}$ M.²²⁴ . Cellule SK-MEL-24 sono state coltivate come consueto, come un monostrato in un mezzo minimo essenziale Earle's BSS, addizionato con: 10% di siero fetale di bovino, amminoacidi non essenziali e 1mM di piruvato di sodio; atmosfera umidificata (5% CO_2) a 37°C. Le analisi sono state svolte come da letteratura,²¹ con le seguenti modifiche.

Le cellule sono state raccolte con 0.05% tripsina/0.53 mM EDTA e lavate per tre volte con 0.5mg/ml di inibitore della tripsina in PBS. Il pellet cellulare finale è stato risospeso alla concentrazione di 10^6 cellule/mL in PBS. FN è stato diluito in PBS (10 μ g/ml); 100 μ l di questa soluzione è stata aggiunta ad ognuno dei 96 pozzetti; incubazione per 2 ore a 37°C.

I pozzetti sono stati aspirati e lavati una volta con PBS; successivamente i pozzetti sono stati fissati con 100 μ l di una soluzione 1% BSA in MEM per 1 ora a 37°C e lavati una volta con PBS. Le cellule sono state preincubate con varie concentrazioni dei peptidi **4**, **5** per 30 min a temperatura ambiente, in agitazione; 50 μ l di questa sospensione è stata aggiunta in quadruplicato ai pozzetti rivestiti di fibronectina-FN. La piastra è stata incubata per 90 minuti a temperatura ambiente.

Dopo il periodo di incubazione, i pozzetti sono stati aspirati e lavati per tre volte con PBS (o fino a quando nessuna cellula era presente nei pozzetti di background). Il numero di cellule adese è stato esaminato mediante la reazione di esoamminidasi. 50 μ l del substrato esoamminidasi (p-nitrofenol-N-acetil- β -D-glucosamminide a 7.5 mM in 0.1 M di citrate buffer, pH=5, mescolato con un equal volume di 0.5% triton X-100 in acqua) è stato aggiunto ad ogni pozzetto. La piastra è stata incubata per 1 ora a 25°C; successivamente è seguita l'aggiunta di 100 μ l di stopping solution (50mM glycine buffer, pH=10.4, contenente 5 mM EDTA). Sono state preparate delle curve standard aggiungendo differenti aliquote di cellule a concentrazione nota, in parallelo, nella stessa piastra dei saggi di adesione. il numero di cellule adese è stato calcolato mediante fluorometria. L'attività dei potenziali antagonisti è stata determinata comparando il numero di cellule adese al numero di cellule nel controllo.

²²⁴ Fujii, H.;Komazawa, H.;Mori, H.;Kojima, M.;Itoh, I.;Murata, J.;Azuma, I.;Saiki, I. *Biol. Pharm. Bull.*,1995, *18*, 1681.

PENTAPEPTIDI CICLICI OPIOIDI

I peptidi sono stati ottenuti per sintesi su fase solida (SPPS) utilizzando la chimica dello Fmoc . La resina Wang resin (0.25 g, 0.5 mmol/g) sospesa in 9:1 DCM/DMF (4 mL) è stata trattata con una soluzione di Fmoc-Phe-OH (0.21 g, 0.5 mmol) e HOBt (0.07 g, 0.5 mmol) in DMF (2 mL), seguita da DCC (0.11 g, 0.5 mmol) e una quantità catalitica di DMAP. La miscela è stata agitata meccanicamente per 5 h, e poi è stata filtrata. La resina è stata successivamente lavata con DMF (5 mL), CH₃OH (5 mL), e DCM (5 mL). Il capping della resina (bloccare i gruppi OH che non hanno reagito con l'amminoacido) è stato fatto in DCM (5 mL), Ac₂O (0.3 mL) e piridina (0.3 mL), agitando meccanicamente. Dopo 0.5 h, il tutto è stato filtrato e la resina lavata due volte con DMF (5 mL), CH₃OH (5 mL), e DCM (5 mL).

Il gruppo Fmoc è stato rimosso con 4:1 DMF/piperidine (4 mL) sotto agitazione meccanica. Dopo 15 min la miscela è stata filtrata e la resina è stata lavata con DCM (5 mL) e trattata con una seconda porzione di 4:1 DMF/piperidine. Dopo 20 min, la miscela è stata filtrata e la resina lavata due volte con DMF (5 mL), CH₃OH (5 mL), DCM (5 mL).

I residui successive sono stati introdotti seguendo la stessa procedura riportata in precedenza, senza l'ausilio di DMAP cat e con l'esclusione del passaggio di Capping. Per verificare l'avvenuto coupling tra i residui sono stati utilizzati due test qualitative: test di Kaiser e il chloranil test.^{iii,iv}

Cleavage

Il peptide N-deprotetto legato alla resina è stato trattato con una miscela di TFA (4.7 mL), H₂O (0.15 mL), e PhOH (0.15 mL). Dopo due ore di agitazione meccanica la miscela è stata filtrata e la resina è stata lavata due volte con 10% TFA in Et₂O, e due volte con Et₂O. Per successiva evaporazione del TFA si è ottenuto un composto oleoso che è stato cristallizzato da MeOH/Et₂O.

Ciclizzazione

Il peptide lineare (0.1 mmol) è stato sciolto in DMF anidra (40 mL). Alla soluzione sono stati aggiunti NaHCO₃ (4.5 mmoli) e difenilfosforilazide (DPPA) (0.3 mmoli) a 0°C. Dopo 2 giorni la miscela è stata filtrata e il solvente eliminato per distillazione in alto vuoto. Il solido risultante è stato estratto da acqua (5 mL) con EtOAc (4 x 20 mL). Le fasi organiche sono state riunite e anidrificate con Na₂SO₄. Dopo aver evaporato i volatili si ottiene un residuo oleoso che viene purificato per flash cromatografia su gel di silice (eluente: EtOAc:MeOH 97:3),

seguito da RP-HPLC semi-preparativa. I ciclopeptidi si ottengono con rese variabili (50-70%) e con purezza del 93-97% (RP-HPLC analisi)

Saggi di binding

Il cervello di ratto, senza cervelletto, è pesato, omogeneizzato e centrifugato. Il pellet (residuo) è sospeso in NaCl e TRIS-HCl e incubato per 1 h a temperatura ambiente per rimuovere tutti i ligandi oppioidi endogeni; dopo una centrifugazione finale è immagazzinato a -80°C.

La concentrazione del peptide è determinata usando [3H]-DAMGO come radioligando μ -selettivo; il binding non specifico è determinato in presenza di 100 mM di DAMGO. Per prevenire la degradazione da parte delle peptidasi, sono aggiunti all'amplificatore alcuni inibitori della proteasi (captopril, bacitracina, etc.). I recettori κ e δ sono stati bloccati con DADLE e U50, 488, rispettivamente.

La miscela è incubata per 1 h a temperatura ambiente, quindi è filtrata sotto vuoto attraverso fibre di vetro e lavata con l'amplificatore di lavaggio ghiacciato (TRIS-HCl pH 7.4 a 4°C). La radioattività del complesso ligando-recettore ritenuto dal filtro è misurata tramite spettrometria liquida di scintillazione usando uno scintillatore dopo un'incubazione di 12 h.

Analisi spettroscopica

c[YpwFG] (3). 1H NMR (DMSO- d_6) δ : 10.62 (s, 1H, Y-OH); 9.25 (s, 1H, w-NH $_1$); 8.46 (d, J= 5.6, 1H, Y-NH), 8.38 (d, J= 8.4, 1H, F-NH); 7.84 (dd, J= 1.6, 8.4, 1H, G-NH); 7.51 (d, J= 7.6, 1H, w-H $_4$); 7.30 (d, J= 6.8, 1H, w-NH); 7.29 (d, J= 8.0, 1H, w-H $_7$); 7.12-7.19 (m, 3H, F-ArH $_{3-5}$); 7.05-7.10 (m, 2H, F-ArH $_{2,6}$); 7.02 (t, J= 7.2, 1H, w-H $_6$); 6.98 (d, J= 8.0, 2H, Y-HAr $_{2,6}$), 6.92 (t, J= 7.2, 1H, w-H $_5$); 6.79 (s, 1H, w-H $_2$); 6.65 (d, J= 8.0, 2H, Y-HAr $_{3,5}$); 4.49 (q, J= 6.8, 1H, w-H α); 4.42 (q, J= 8.0, 1H, F-H α); 4.36 (dt, J= 5.6, 8.0, 1H, Y-H α); 4.27 (dd, J= 8.4, 14.8, 1H, G-H α); 4.07 (dd, J= 3.6, 8.0, 1H, p-H α); 3.55-3.65 (m, 1H, p-H δ_{down}); 3.15 (dd, J= 1.6, 14.8, 1H, G-H α); 3.13 (dd, J= 9.1, 14.4, 1H, w-H β); 2.96 (dd, J= 6.8, 14.0, 1H, F-H β); 2.79 (dd, J= 5.2, 14.4, 1H, w-H β); 2.74 (d, J= 8.0, 2H, Y-H β); 2.68-2.78 (m, 1H, p-H δ_{up}); 2.66 (dd, J= 8.0, 14.0, 1H, F-H β); 1.75-1.86 (m, 1H, p-H β_{up}); 1.55-1.68 (m, 2H, p-H β_{down} + p-H γ_{down}); 1.46-1.55 (m, 1H, p-H γ_{up}).

c[YpwFp] (7). 1H NMR (DMSO- d_6) δ : 10.71 (s, 1H, w-NH $_1$); 9.27 (s, 1H, Y-OH); 8.13 (d, J= 7.6, 1H, Y-NH); 7.86 (d, J= 8.8, 1H, F-NH); 7.67 (d, J=8.0, w-NH); 7.45 (d, J= 8.0, w-H $_4$);

7.29 (d, J= 8.0, 1H, w-H₇); 7.14-7.26 (m, 5H, F-ArH); 7.03 (t, J= 7.2, 1H, w-H₆); 6.95 (d, J= 8.4, 2H, Y-ArH_{2,6}); 6.92 (s, 2H, w-H₂+w-H₅); 6.66 (d, J= 8.4, 2H, Y-ArH_{3,5}); 4.74 (q, J= 7.2, 1H, F-H α); 4.64 (d, J= 7.2, 1H, p⁵-H α); 4.54 (q, J= 7.6, 1H, Y-H α); 4.39 (q, J= 6.4, 1H, w-H α); 3.97 (dd, J= 8.0, 6.0, 1H, p²-H α); 3.45-3.55 (m, 1H, p²-H δ_{down}); 3.36-3.45 (m, 1H, p⁵-H δ_{down}); 3.26 (dd, J= 14.8, 4.8, 1H, w-H β); 3.10-3.19 (m, 1H, p⁵-H δ_{up}); 3.05 (dd, J= 13.6, 8.8, 1H, F-H β); 2.86 (dd, J= 14.8, 8.4, 1H, w-H β); 2.62-2.76 (m, 5H, p²-H δ_{up} +F-H β +Y-H β); 2.05-2.13 (m, 1H, p⁵-H β_{down}); 1.70-1.89 (m, 3H, p⁵-H γ_{up} + p⁵-H γ_{down} +p²-H β_{up}); 1.55-1.70 (m, 2H, p²-H γ_{down} +p⁵-H β_{up}); 1.45-1.55 (m, 1H, p²-H β_{down}); 1.39-1.45 (m, 1H, p²-H γ_{up}).

c[YpwFP] (8). ¹H NMR (DMSO-d₆) δ : 10.75 (s, 1H, w-NH₁); 9.29 (s, 1H, Y-OH); 8.41 (d, J= 6.0, 1H, Y-NH); 7.55 (d, J= 8.0, 1H, w-H₄); 7.49 (d, J= 8.6, 1H, F-NH); 7.27 (d, J=8.0, 1H, w-H₇); 7.10-7.21 (m, 5H, F-ArH); 7.05 (d, J= 8.0, 2H, Y-ArH_{2,6}); 7.03 (s, 1H, w-H₂); 7.01 (t, J=7.6, 1H, w-H₆); 6.93 (t, J= 7.4, w-H₅); 6.79 (d, J= 9.6, 1H, w-NH); 6.66 (d, J= 8.0, 2H, Y-ArH_{3,5}); 4.46-4.59 (m, 2H, Y-H α +F-H α); 4.12-4.24 (m, 1H, w-H α); 4.02 (d, J=8.8, 1H, P-H α); 3.95-4.05 (m, 1H, p-H α); 3.75-3.85 (m, 1H, P-H δ_{down}); 3.60 (q, J= 8.8, 1H, p-H δ_{down}); 3.45 (dd, J=12.8, 4.0, 1H, F-H β); 3.30-3.40 (m, 1H, P-H δ_{up}); 3.18 (dd, J=13.6, 3.0, 1H, w-H β); 2.80-2.99 (m, 4H, F-H β +Y-H β + p-H δ_{up}); 2.78 (dd, J=13.6, 11.6, 1H, w-H β); 1.98-2.09 (m, 1H, P-H β_{up}); 1.81-1.98 (m, 1H, P-H β_{down}); 1.65-1.80 (m, 2H, P-H γ_{up} +p-H β_{up}); 1.45-1.52 (m, 2H, P-H γ_{down} + p-H γ_{down}); 1.20-1.35 (m, 1H, p-H γ_{up}); 0.60-0.78 (m, 1H, p-H β_{up}).

^a br. = broad; p = D-Pro, w = D-Trp; H_{up} è definito come il protone che giace sullo stesso piano di p-H α ; H_{down} è definito come il protone che sta sul lato opposto di p-H α ; Js sono espresso in Hz.

^b p² = D-Pro², p⁵ = D-Pro⁵.

Valori di $\Delta\delta/\Delta t$ values (ppb/°K) dei protoni ammidici per 3, 7, 8 determinati tramite VT-¹H-NMR in DMSO-d₆ a 400 MHz (range 298-348 °K)

Compd	$\Delta\delta/\Delta t$ TyrNH	$\Delta\delta/\Delta t$ D-TrpNH	$\Delta\delta/\Delta t$ PheNH	$\Delta\delta/\Delta t$ GlyNH
3	-4.8	-1.5	-5.3	-1.4
7	-2.7	-2.5	-6.3	-
8	-8.3	-1.5	-0.2	-

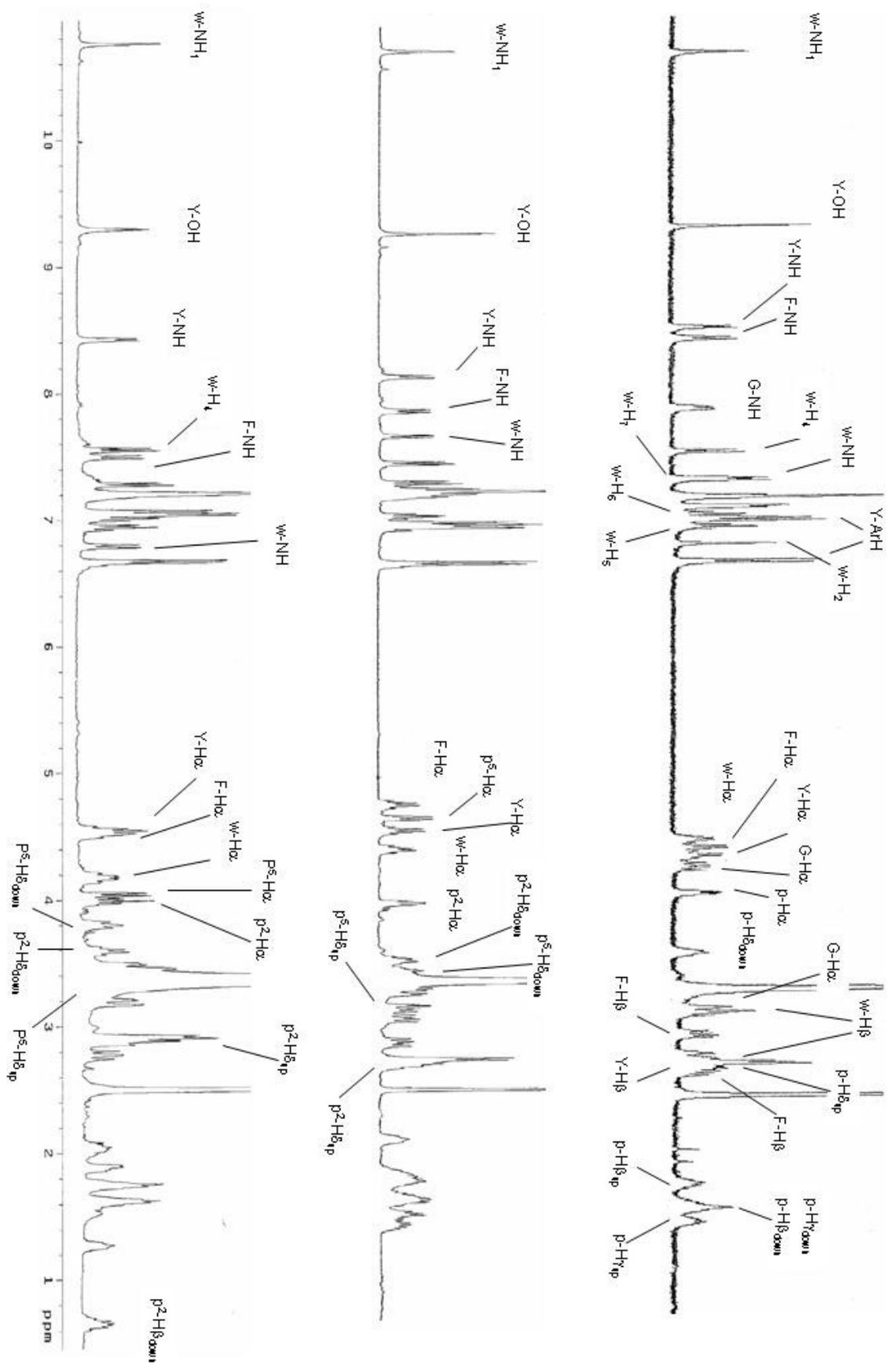


Figure S1. $^1\text{H-NMRs}$ di **3**, **7**, and **8**.

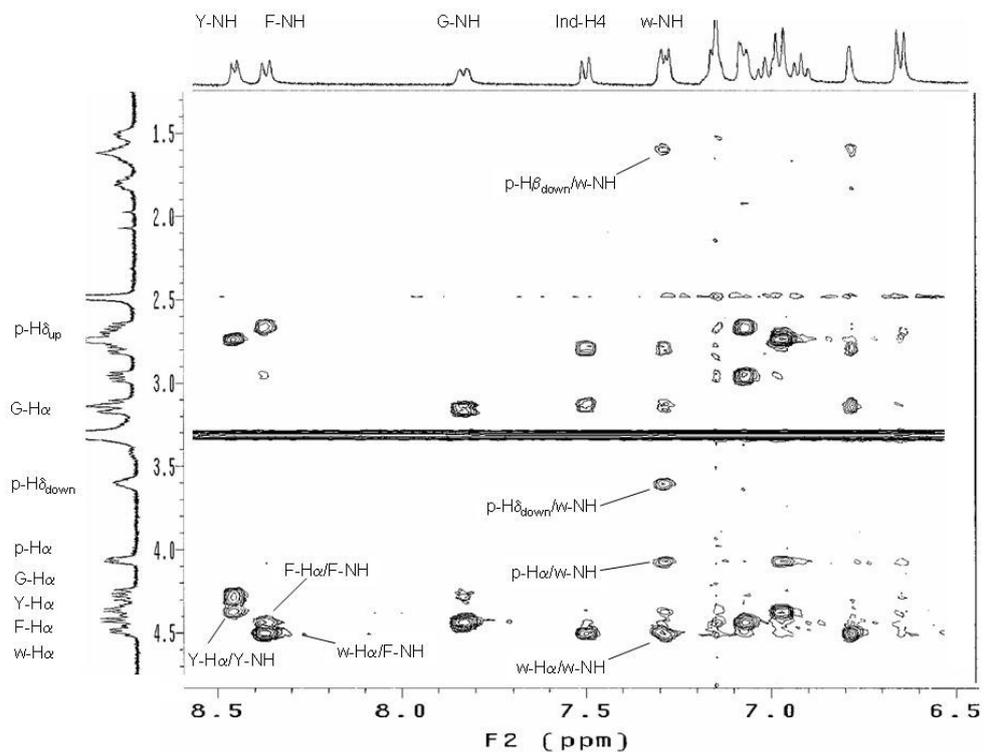


Figure S2. ROESY di **3** (400 MHz, DMSO- d_6).

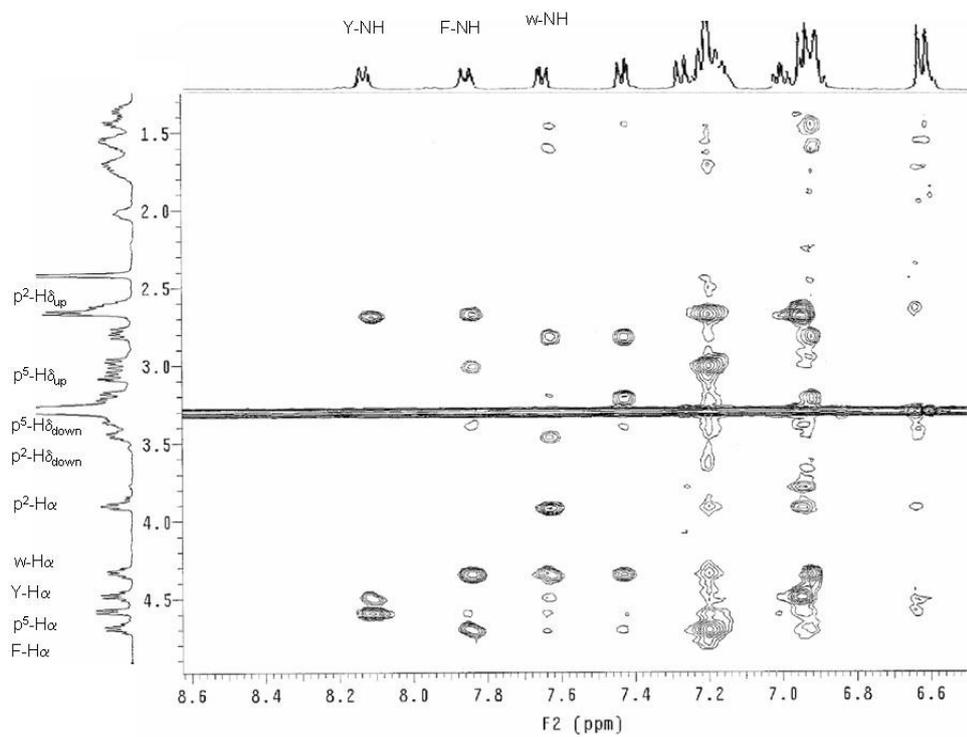


Fig. S3. ROESY di **7** (400 MHz, DMSO- d_6).

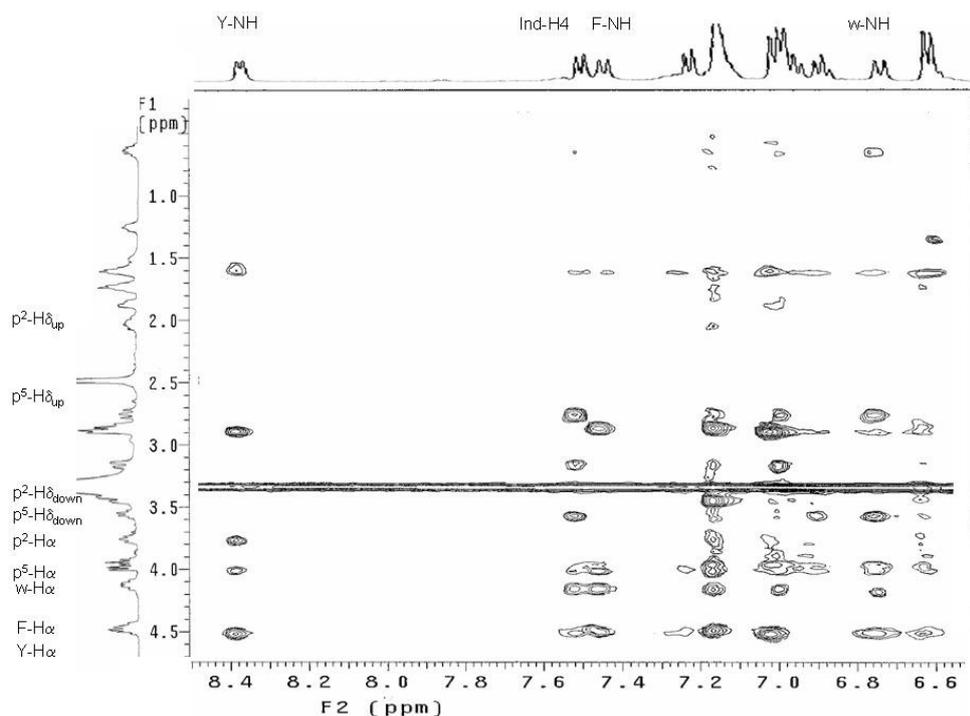


Fig. S4. ROESY di **8** (400 MHz, DMSO- d_6).

Tab. S2. ROESY cross-peaks non usuali osservati per **3**.^a

Cross peak	Intensità	Cross peak	Intensità
Y-H α - p-H δ_{down}	Vs	w-H $_2$ - w-H α	vs
p-H γ_{down} - w-NH	W	F-NH - G-NH	w
p-H γ_{down} - w-H $_2$	W	Y-NH - G-NH	w
G-NH - G-H $\alpha_{3,2}$	Vs	Y-NH - F-NH	w
G-NH - G-H $\alpha_{4,3}$	M	Y-NH - Y-HAr $_{2,6}$	m
p-H δ_{down} - w-NH	M	F-NH - w-NH	m
p-H α - w-NH	M	F-NH - F-HAr $_{2,6}$	vs
p-H α - Y-HAr $_{2,6}$	M	F-NH - w-H $_2$	m
Y-NH - G-H $\alpha_{4,3}$	Vs	w-H α - w-H $\beta_{3,1}$	s
Y-NH - Y-H α	S	w-H α - w-H $\beta_{2,8}$	s
F-NH - F-H α	S	F-H α - F-H $\beta_{2,8}$	s
F-NH - w-H α	Vs	F-H α - F-H $\beta_{3,1}$	s
G-NH - H α	Vs	w-H $_4$ - w-H $\beta_{2,8}$	vs
w-H α - w-H $_4$	S	w-NH - w-H $\beta_{3,1}$	m

w-NH – w-H α	S	w-NH – w-H $\beta_{2,8}$	m
Y H α - w-NH	W	w-H $\beta_{3,1}$ – w-H $_2$	vs
F-H α - F-HAr $_{2,6}$	Vs	p-H α - Y-HAr $_{3,4}$	w
Y-H α - Y-HAr $_{2,6}$	Vs	w-H $_2$ – w-H $\beta_{2,8}$	m

Tab. S3. Non obvious ROESY cross-peaks observed for 7.^a

Cross peak	Intensità	Cross peak	Intensità
Y-NH – Y-H α	S	Y-NH – p ⁵ -H α	vs
Y-NH – Y-ArH	S	Y-NH – F-NH	s
F-NH – F-H $\beta_{2,6}$	S	F-NH – F-H $\beta_{3,1}$	m
F-NH – p ⁵ -H δ_{down}	W	F-NH – w-H α	vs
F-NH – F-H α	S	F-NH – w-NH	s
w-NH – w-H $_2$	M	w-NH – p ² -H β_{down}	w
w-NH – p ² -H γ_{down}	W	w-NH – w-H $\beta_{2,8}$	m
w-NH – w-H $\beta_{3,2}$	W	w-NH – p ² -H δ_{down}	m
w-NH – p ² -H α	S	w-NH – w-H α	s
w-NH – Y-H α	W	w-NH – p ⁵ -H α	w
w-NH – F-H α	W	w-H $_4$ – p ² -H β_{down}	w
w-H $_4$ – w-H $\beta_{3,2}$	S	w-H $_4$ – w-H $\beta_{2,8}$	s
w-H $_4$ – w-H α	S	w-H $_4$ – F-H α	s
F-ArH – F-H α	Vs	F-ArH – F-NH	m
w-H $_2$ – w-H α	Vs	Y-ArH – Y-H α	vs
F-H α – F-H $\beta_{2,7}$	S	F-H α – F-H $\beta_{3,0}$	m
F-H α – p ⁵ -H δ_{up}	Vs	F-H α – p ⁵ -H δ_{down}	s
Y-H α – p ² -H δ_{up}	M	Y-H α – p ² -H δ_{down}	vs

w-H α - w-H $\beta_{2,8}$	M	w-H α - w-H $\beta_{3,2}$	s
w-H α - F-ArH	M	P ² -H δ_{up} - Y-ArH	m
p ⁵ -H α - F-NH	W		

Tab. S4. ROESY cross-peaks non usuali osservati per **8**.^a

Cross peak	Intensità	Cross peak	Intensità
Y-NH - P-H γ_{down}	M	Y-NH - Y-ArH	m
Y-NH - P-H δ_{down}	S	Y-NH - F-NH	m
Y-NH - P-H α	M	Y-NH - Y-H α	s
w-H ₄ - P-H α	W	w-H ₄ - p-H β_{down}	w
w-H ₄ - w-H $\beta_{2,8}$	Vs	w-H ₄ - w-H $\beta_{3,3}$	m
w-H ₄ - p-H δ_{down}	S	w-H ₄ - w-H α	m
w-H ₄ - w-NH	S	F-NH - F-H $\beta_{2,9}$	vs
F-NH - P-H α	M	F-NH - w-H α	s
F-NH - F-H α	M	F-NH - w-NH	vs
F-NH - Y-H α	M	Y-ArH _{2,6} - Y-H α	vs
Y-ArH _{2,6} - Y-NH	S	w-H ₂ - w-H $\beta_{2,8}$	m
w-H ₂ - w-H $\beta_{3,2}$	S	w-H ₂ - w-H α	vs
w-H ₂ - p-H δ_{down}	W	w-H ₅ - p-H δ_{down}	m
w-NH - p-H β_{down}	M	w-NH - w-H $\beta_{2,8}$	vs
w-NH - p-H δ_{down}	S	w-NH - w-H α	s
w-NH - Y-H α	W	w-NH - p-H α	w
w-NH - P-H α	W	Y-H α - p-H δ_{down}	m
F-H α - P-H α	M	F-H α - F-ArH	vs
w-H α - w-H $\beta_{2,8}$	W	w-H α - w-H $\beta_{3,2}$	m

w-H α - F-ArH	M	P-H α - F-ArH	m
p-H α - Y-ArH	M		

^a vs = very strong, s = strong, m = medium, w = weak

Table S5. Residui a 5 Å da **3** nelle due orientazioni identificate

TMH/EL	Residuo	Orientazione		TMH/EL	Residue	Orientazione	
		1	2			1	2
TMH III	Asp147	+	*	TMH V	Asn230	-	+
	Tyr148	-	+		Lys233	+	*
	Met151	-	*		Val326	+	-
	Phe152	-	*		Phe237	*	+
EL-2	Gly213	*	-	TMH VI	Ala240	+	-
	Ser214	+	-		Phe241	+	-
	Asp216	+	+		Trp293	*	-
	Cys217	+	-		Ile296	+	-
	Thr218	*	+		His297	+	-
	Leu219	+	+		Val300	*	+
	Thr220	-	*		Lys303	+	+
	Phe221	*	*		Ala304	-	+
His223	+	+	Thr307	-	+		
				EL-3	Glu310	-	+
				TMH VII	Thr315	+	+
					Trp318	*	*
					His319	+	+
					Ile322	+	+

*) residui a una distanza $\leq 3\text{\AA}$ da **3**
+) residui a una distanza $\leq 5\text{\AA}$ da **3**
-) residui a una distanza $\geq 5\text{\AA}$ da **3**

Tab. S6. Caratteristiche geometriche del sito di binding di MOR, residui alla distanza di 3.5Å dal ciclopeptide **3** (Orientazioni 1 e 2) dopo l'ottimizzazione QM/MM.

<i>Orientazione 1</i>				<i>Orientazione 2</i>			
	<i>Contact</i> (Å ²)	<i>Exposed</i> (Å ²)	%		<i>Contact</i> (Å ²)	<i>Exposed</i> (Å ²)	%
Binding Site	597,375427	769,406555	78	Binding Site	537,49968	780,206726	69
W318	49,100136	148,556046	33	W318	62,831818	119,088234	53
F237	48,221581	118,398483	41	T218	36,782269	91,974495	40
T218	46,296394	79,319122	58	I322	35,52417	125,676758	28
I322	41,536057	120,740158	34	F221	34,154587	147,222824	23
D216	30,838886	72,021126	43	K303	31,823547	93,484138	34
K303	30,79351	136,542908	23	L219	30,492432	119,187988	26
F221	27,897736	121,694916	23	Y148	29,027008	149,43512	19
Y148	27,283768	116,21315	23	K233	23,601128	117,792969	20
K233	27,033585	138,730957	19	W293	22,90538	193,670059	12
W293	22,334961	169,342087	13	H223	22,711929	153,636505	15
I296	21,369629	89,759315	24	F313	21,343353	182,748825	12
L219	20,726433	110,850227	19	E229	20,905167	121,838257	17
V300	20,688656	57,401249	36	F237	20,372002	136,677841	15
D147	20,522552	95,386551	22	F152	15,336395	142,52179	11
F152	16,294098	136,868927	12	T307	13,05822	83,535149	16
H319	11,449493	112,630386	10	D147	12,494095	109,225677	11
H223	11,212189	149,913559	7	E310	11,489334	183,046722	6
T315	10,967773	120,314552	9	D216	10,622086	104,533928	10
E229	9,275925	136,29454	7	V300	10,050377	78,048927	13
C217	7,611015	71,560684	11	M151	8,836594	141,35675	6
A240	6,01701	66,78334	9	T315	8,530991	105,678108	8
V236	5,036133	124,534134	4	H319	6,705956	102,350067	7
Y299	4,975891	158,374725	3	T220	5,470413	95,115547	6
F241	3,465363	150,965729	2	Y299	4,013855	159,655762	3
G213	4,711624	49,633621	9	A304	4,095413	65,313927	6

T220	3,329819	83,822678	4	N230	2,990845	111,816444	3
M151	3,033722	139,40593	2	I296	0,945099	103,584831	1

Tab. S7. Caratteristiche geometriche del sito di binding di MOR, residui alla distanza di 3.5Å dal ciclopeptide **4** (Orientazioni 1 e 2) dopo l'ottimizzazione QM/MM.

<i>Orientazione 1</i>				<i>Orientazione 2</i>			
	<i>Contact</i> (Å ²)	<i>Exposed</i> (Å ²)	%		<i>Contact</i> (Å ²)	<i>Exposed</i> (Å ²)	%
Binding Site	601,132248	788,125549	76	Binding Site	483,116425	803,377014	60
W318	54,217255	149,951599	36	W318	51,741646	122,105545	42
I322	47,784161	85,143417	56	T218	38,767776	101,033257	38
T218	45,655735	103,769386	44	K303	32,011139	97,254211	33
Y148	41,373192	136,914413	30	I322	22,008461	94,076546	23
K233	36,887375	126,352783	29	L219	21,36525	110,649345	19
K303	36,665039	170,599594	21	F313	21,268921	178,172699	12
F237	35,384071	128,324066	28	K233	21,085243	111,339867	19
W293	26,558792	198,747253	13	F237	21,015175	134,118164	16
V300	26,367413	83,032982	32	H223	20,651718	137,605621	15
D216	18,752197	119,866745	16	W293	18,814346	191,312225	10
A240	15,05386	55,428356	27	D216	17,6828	97,6521	18
L219	14,753967	103,26149	14	F221	17,304871	166,309662	10
D147	14,024246	88,783081	16	F152	16,29567	114,440536	14
T307	11,595276	112,680687	10	Y148	13,205078	157,650375	8
H223	11,351456	156,098648	7	E229	12,605743	115,72451	11
I296	11,314865	91,413864	12	T307	10,656456	84,977821	13
C217	9,824417	89,993187	11	H319	10,365211	85,286339	12
M151	7,543259	135,757843	6	V300	8,111176	81,648659	10
H319	6,971375	92,43158	8	D147	7,135323	100,632263	7
F152	6,930702	112,389854	6	T315	6,396667	113,904449	6
V236	6,891296	102,446861	7	E310	5,781067	165,331985	3
Y299	6,233536	165,159653	4	T220	4,994728	89,027084	6
E229	5,470413	109,935379	5	A304	2,205223	62,318581	4
I198	3,124054	137,228409	2	I296	1,575165	104,219276	2
F221	3,355545	185,087753	3	Y299	2,134323	163,519043	1

T315	2,997833	76,648529	4	M151	0,945099	139,164658	1
I144	0,630066	140,382736	0				

Tab. S8. Caratteristiche geometriche del sito di binding di MOR, residui alla distanza di 3.5Å dal ciclopeptide **5** (Orientazioni 1 e 2) dopo l'ottimizzazione QM/MM.

<i>Orientazione 1</i>				<i>Orientazione 2</i>			
	<i>Contact</i> (Å ²)	<i>Exposed</i> (Å ²)	%		<i>Contact</i> (Å ²)	<i>Exposed</i> (Å ²)	%
Binding Site	606,523773	795,842957	76	Binding Site	479,801544	773,995544	62
I322	54,723595	131,669785	42	W318	58,399481	89,568459	65
T218	45,677782	75,743378	60	F221	47,567993	158,493881	30
W318	44,764977	168,981766	26	T218	42,749561	88,866585	48
F237	41,610275	114,449532	36	I322	34,876595	123,471542	28
K303	34,774765	145,799088	24	K233	30,257584	105,803078	29
D216	31,742073	96,322945	33	K303	29,098663	128,312027	23
K233	26,136612	148,869186	18	F237	25,42128	122,669037	21
F221	26,064445	143,169739	18	V300	21,896721	99,153015	22
V300	24,533096	78,42511	31	W293	20,664948	154,667816	13
Y148	24,424683	113,285378	22	I296	19,160042	112,363091	17
W293	23,662201	174,501694	14	E310	14,701813	209,826614	7
F152	21,929642	127,044022	17	D216	11,712799	103,049088	11
D147	21,920223	72,744858	30	F313	11,288605	194,645599	6
T315	17,39843	124,622704	14	T315	9,945488	101,565063	10
C217	16,98671	67,032379	25	L219	8,816513	90,568604	10
L219	16,9767	95,309769	18	T307	8,378403	101,578407	8
I296	16,652924	102,887489	16	T220	7,373169	95,561104	8
M151	14,438927	140,069199	10	H319	7,336021	101,824203	7
H223	13,51207	181,578476	7	Y299	6,940796	144,632996	5
H319	11,670387	124,337608	9	M151	6,490318	125,617935	5
A240	9,473602	71,889801	13	A304	5,355537	86,558205	6
V236	9,096519	107,502396	8	H223	4,801384	115,016212	4
Y299	5,37439	177,860321	3	E229	3,567665	96,158112	4
S214	3,900818	114,872498	3				
G213	4,41045	50,578716	9	F152	0,945099	128,57338	1

I144	3,465347	105,145668	3				
T307	3,169159	108,970619	3				

Tab. S9. Caratteristiche geometriche del sito di binding di MOR, residui alla distanza di 3.5Å dal ciclopeptide **6** (Orientazioni 1 e 2) dopo l'ottimizzazione QM/MM.

<i>Orientazione 1</i>				<i>Orientazione 2</i>			
	<i>Contact</i> (Å ²)	<i>Exposed</i> (Å ²)	%		<i>Contact</i> (Å ²)	<i>Exposed</i> (Å ²)	%
Binding Site	646,428497	800,429626	81	Binding Site	572,920944	795,234375	72
W318	52,759285	137,665131	38	F221	50,012756	185,858932	27
I322	51,590797	88,38652	58	W318	48,412556	89,431015	54
F237	48,221573	126,68325	38	K303	46,435646	124,395996	37
T218	44,838051	83,550819	54	T218	40,076317	98,97686	40
Y148	31,854843	122,408348	26	H223	36,973236	98,063881	38
K303	30,440567	94,443924	32	I322	36,163002	108,189751	33
V300	27,093506	50,02459	54	Y148	26,471771	162,615143	16
K233	22,962311	121,716721	19	L219	24,200546	112,77285	21
W293	19,61058	174,128296	11	K233	21,391525	126,186035	17
D147	18,776764	74,55101	25	I296	18,556244	89,940285	21
D216	18,201225	117,914383	15	D147	17,983444	100,128967	18
Y299	15,57856	132,821121	12	V300	16,830509	80,785126	21
I296	14,11953	81,823174	17	E310	16,064819	211,13765	8
C217	14,032806	88,372948	16	F237	15,419052	182,014404	8
L219	12,855011	113,17083	11	D216	14,121895	101,431946	14
F152	10,907898	100,230835	11	M151	12,291214	142,079468	9
H319	7,59269	94,443001	8	E229	11,503891	101,388199	11
V236	5,031754	96,191895	5	W293	10,606003	210,131104	5
A240	4,667133	53,801075	9	T315	9,941116	103,834366	10
A304	4,095413	48,918259	8	T220	7,135323	96,444771	7
T315	3,477905	85,976639	4	F313	6,585022	193,630463	3
I144	2,835297	114,953827	2	H319	6,39093	102,551712	6
M151	2,830917	140,712402	2	A304	3,78038	71,444122	5
T307	0,237839	105,909019	0	T307	3,509895	89,692505	4

				Y299	2,693466	151,233368	2
				G213	0,630066	92,42791	1

Tab. S10. Caratteristiche geometriche del sito di binding di MOR, residui alla distanza di 3.5Å dal ciclopeptide **7** (Orientazioni 1 e 2) dopo l'ottimizzazione QM/MM.

<i>Orientazione 1</i>				<i>Orientazione 2</i>			
	<i>Contact</i> (Å ²)	<i>Exposed</i> (Å ²)	%		<i>Contact</i> (Å ²)	<i>Exposed</i> (Å ²)	%
Binding Site	594,902542	787,081543	76	Binding Site	519,502838	800,436462	65
W318	57,499466	110,457626	52	W318	57,637497	138,334244	42
F237	48,803482	121,975288	40	T218	38,631126	98,58136	39
T218	45,567852	74,050758	62	H223	38,39386	136,712311	28
F221	37,042435	144,188614	26	K303	35,504677	118,487411	30
W293	32,749985	194,21463	17	I322	34,596603	150,563156	23
I322	31,778824	122,112244	26	K233	22,966675	120,633682	19
K303	31,065712	142,311707	22	D216	20,764694	93,670486	22
I296	25,762573	115,462036	22	F237	20,39389	153,531937	13
D147	24,117916	75,311546	32	F313	20,100754	198,127823	10
V300	23,57486	88,15863	27	V300	19,524551	85,181854	23
D216	22,648029	81,829399	28	L219	17,939308	114,825874	16
K233	22,021591	146,803741	15	T315	16,074234	119,124969	13
Y148	21,444046	163,136398	13	E310	15,227081	185,542252	8
T315	18,124519	76,028595	24	W293	13,988174	173,088669	8
C217	14,44701	73,39473	20	E229	13,955147	113,018036	12
H223	14,288574	157,544525	9	M151	12,332909	133,765137	9
L219	12,85939	86,798889	15	F152	10,711075	142,925064	7
M151	8,160172	159,185501	5	T307	10,20208	100,536865	10
H297	5,93161	128,096268	5	G213	7,645958	60,412914	13
H319	4,82016	110,210571	4	I296	7,538864	142,356735	5
I144	4,725479	102,739929	5	Y299	6,45636	170,339981	4
G213	3,780384	49,322968	8	T220	6,421791	95,373505	7
Y299	3,400726	162,189987	2	F221	4,101685	171,479309	2
S214	0,670212	197,986252	1	A304	3,78038	67,1259	6
F241	0,945099	173,076584	1	S214	4,07901	117,869568	3

F313	0,310654	163,467667	0	H319	1,72821	128,62851	1
				C217	0,931961	89,983391	1

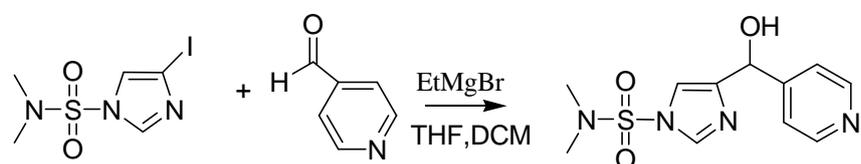
Tab. S11. Caratteristiche geometriche del sito di binding di MOR, residui alla distanza di 3.5Å dal ciclopeptide **8** (Orientazioni 1 e 2) dopo l'ottimizzazione QM/MM.

<i>Orientazione 1</i>				<i>Orientazione 2</i>			
	<i>Contact</i> (Å ²)	<i>Exposed</i> (Å ²)	%		<i>Contact</i> (Å ²)	<i>Exposed</i> (Å ²)	%
Binding Site	558,08374	798,133484	70	Binding Site	490,223572	814,875061	60
I322	53,397804	134,600983	40	K303	62,794319	151,818161	41
T218	51,618214	78,402763	66	W318	58,812111	92,46994	64
W318	44,878815	173,075806	26	I322	41,789795	99,398392	42
F221	35,034027	137,313416	26	T218	40,112167	119,982269	33
D216	31,868137	64,77359	49	F237	25,740677	118,512314	22
K303	31,594368	126,491158	25	L219	25,364647	139,461105	18
F237	29,29776	112,625702	26	K233	23,592377	107,182114	22
D147	26,634464	64,235855	41	F221	23,198914	189,182861	12
Y148	25,663498	115,413757	22	I296	22,297211	113,310692	20
W293	22,27533	178,352524	12	W293	21,916306	161,552933	14
K233	21,710236	151,490631	14	V300	16,42572	97,796265	17
C217	21,355644	89,735352	24	D216	15,466911	119,675293	13
V300	20,770214	60,555939	34	E310	13,611069	211,898758	6
T315	13,618599	140,584351	10	M151	11,619179	112,759209	10
F152	10,028488	129,36702	8	T307	9,038086	95,443504	9
H319	9,1007	134,96582	7	Y299	8,505859	158,935349	5
S214	9,07373	81,605133	11	H319	7,700668	96,154243	8
I296	8,177696	126,991577	6	T220	5,946098	88,661774	7
T220	7,135323	95,827232	7	H223	3,141563	118,173172	3
A240	6,897476	78,517464	9	A304	1,890198	65,152245	3
L219	6,239334	119,506363	5	T315	1,420784	87,74015	2
H223	5,666199	148,710907	4	A240	0,237846	58,044582	0
I144	3,78038	101,1362	4	D147	0,237839	147,365311	0

V236	2,205223	128,878036	2				
M151	1,326279	116,724815	1				
G213	0,945099	75,279968	1				
F241	0,630066	161,331985	0				

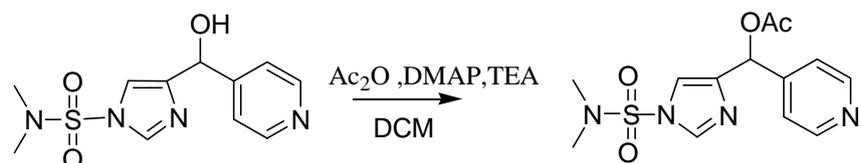
7.9 SINTESI DI AGONISTI DEL RECETTORE H3: IMMETHRIDINE E IMMEPIP

1.



Procedura: 4-Iodo-imidazole-1-sulfonic acid dimethylamide (5g, 16.6 mmol) è stato dissolto in 100 ml di DCM e 18 ml (18.3 mmol) di etilmagnesio bromuro (1.0 M in THF) è stato aggiunto goccia a goccia a RT. La miscela è stata lasciata in agitazione per 45 min. 4-Pyridine carboxaldehyde (1.6 ml, 16.6 mmol) è stata aggiunta goccia a goccia a RT e la reazione è rimasta sotto agitazione per 16 h. Dopo di che si sono fatti lavaggi con una soluzione di sodio carbonato (3 x 100 ml) e le fasi organiche sono state seccate su sodio solfato . L'evaporazione del solvente e la ricristallizzazione da EtOAc hanno dato un solido arancio (3.54 g, 75 %). HPLC-MS ($M+1 = 283.03$)

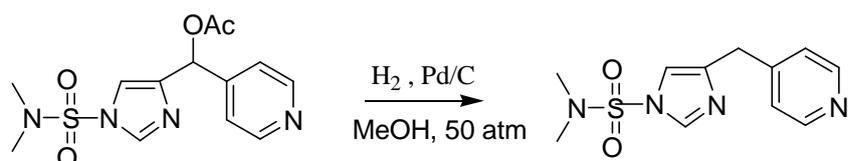
2.



Procedura: L'alcol (3.5 g, 12.4 mmol) è stato sciolto in una soluzione di 0.15 g (1.25 mmol) di DMAP e 3.5 ml (25 mmol) di TEA in 100 ml di DCM. Dopo aver raffreddato in un bagno di ghiaccio , 1.2 ml (12.4 mmol) di anidride acetica sono stati aggiunti goccia a goccia e la

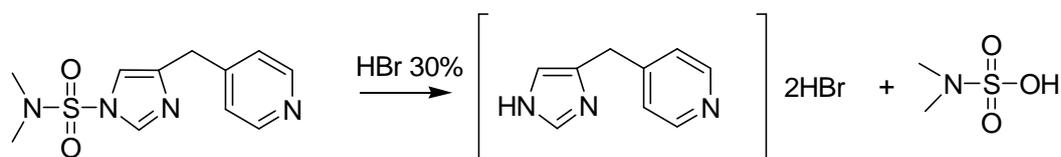
soluzione è stata sotto agitazione magnetica per 3 h a RT. Successivamente si è lavata la soluzione con acqua (3 x 100 ml), seccato su sodio solfato e concentrato a pressione ridotta per dare il composto finale (4.204 g, 100 %). Il composto non ha subito nessuna purificazione. HPLC-MS (M+1 =340.1)

3.



Procedura: l'acetato (4 g, 12.4 mmol) è stato dissolto in 100 ml di MeOH e sono stati aggiunti 0.4 g di 10% Pd/C. La miscela risultante è stata idrogenata a RT, a 50 atm di H₂ per 24 h.in autoclave. La miscela è stata filtrata attraverso Hyflo e il filtrato evaporato a pressione ridotta. Il residuo è stato dissolto in 100 ml di DCM, lavato con acqua (3 x 100 ml), seccato su sodio solfato anidro e evaporato. I 300 ml di acqua utilizzata per lavare la miscela sono stati estratti con DCM (3 x 300 ml), e le fasi organiche sono state seccate su sodio solfato e il solvente evaporato ottenendo un olio giallo (0.25 g). Non sono state condotte ulteriori purificazioni sul prodotto finale unito (2.65 g, 76 %) . HPLC-MS (M+1 =282.1)

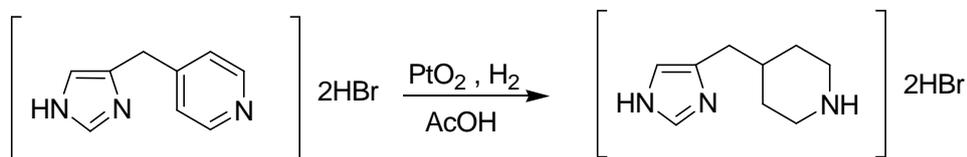
4.



Procedura: 2.364 g (8,4 mmol) di 4-pyridinyl-methyl-imidazole-1-sulfonic acid dimethylamide sono stati messi a riflusso in 23.6 ml (30% HBr) per 24 h e la miscela risultante è stata seccata a pressione ridotta ottenendo un solido arancio. Il solido è stato ricristallizzato da EtOH (75 ml) e acqua (5 ml) a riflusso ottenendo un solido giallo che è stato seccato a pressione ridotta per 24 h. Il solido stesso è stato ricristallizzato ancora da EtOH e acqua a riflusso per eliminare i residui di acido sulfamidico presenti. Il prodotto ottenuto ha

una purezza > 98% (1.104 g, 42 %). Il residuo della prima ricristallizzazione è 0.69 g, 26 %.
HPLC-MS (M+1= 160.1)

5.



Procedura: [(1H-Imidazol-4(5)-yl)-metil]piridina diidrobromuro (0.690 g, 2.16 mmol) è stata sciolta in una miscela di AcOH (9 ml) e acqua (4 ml). A questa soluzione, sono stati aggiunti 15.9 mg di PtO₂ (0.07 mmol) e il tutto è stato tenuto sotto agitazione in atmosfera di idrogeno 1.1 atm a RT tutta la notte. Il catalizzatore è stato filtrato tramite Hyflo e il filtrato è stato evaporato ottenendo un solido arancio. (0.69 g, 98 %). HPLC-MS (M+1= 166.1)

ⁱ. Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595.

ⁱⁱ. Christensen, T. *Acta Chem. Scand.* **1979**, *B33*, 763.

ⁱⁱⁱ. Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595.

^{iv}. Christensen, T. *Acta Chem. Scand.* **1979**, *B33*, 763.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.