



Síntesi i aplicació de ψ -dipèptids amb estructura de 3 aminopiperidona. Síntesi de ψ -melanotans

Jordi Mas Pons

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA I QUÍMICA TERAPÈUTICA

SÍNTESI I APLICACIÓ DE ψ -DIPÈPTIDS AMB

ESTRUCTURA DE 3-AMINOPIPERIDONA.

SÍNTESI DE ψ -MELANOTANS

JORDI MAS PONS

2010

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA I QUÍMICA TERAPÈUTICA
PROGRAMA DE DOCTORAT
2004-2006

SÍNTESI I APLICACIÓ DE ψ -DIPÈPTIDS AMB ESTRUCTURA DE
3-AMINOPIPERIDONA. SÍNTESI DE ψ -MELANOTANS.

Memòria presentada per Jordi Mas Pons per optar al títol de doctor per la universitat
de Barcelona

Directores de la Tesi:

Anna Diez Pascual

Maria J. Macias Hernández

Jordi Mas Pons

JORDI MAS PONS

2010

*“Donaria tot el que sé per
la meitat del que ignoro.”*

René Descartes

Als meus avis

AGRAÏMENTS

Amb aquestes línies volia agrair a tota la gent que m'heu fet costat en aquest llarg camí i que m'heu permès d'arribar fins aquí.

En primer lloc agrair a la meva directora de tesi, la Dra. Anna Diez, professora titular del departament de Farmacologia i Química Terapèutica de la Facultat de Farmàcia, per haver-me acollit al seu grup de recerca, pel seu suport i la seva confiança i per haver-me ensenyat més enllà de la química. També voldria agrair al Dr. Màrius Rubiralta per haver-me acceptat al seu laboratori.

De la mateixa manera, voldria agrair a la Dra. María J. Macias, investigadora ICREA de l'IRB i co-directora d'aquesta tesi, el fet d'haver-me acollit al seu laboratori ara ja fa gairebé 2 anys i haver posat a la meva disposició tot el necessari per arribar al final d'aquest treball. Muchas gracias por todo tu apoyo.

Donar les gràcies també a l'IRB i al seu director, el Dr. Joan Guinovart, pel seu suport tant científic com econòmic.

Al Dr. Joan Bosch i la Dra. Mercedes Amat per haver-me ofert un lloc al seu laboratori i haver-me ajudat en aquesta part final.

Igualment, agraeixo el suport de la Dra. Miriam Royo, que es va oferir en tot moment i em va donar la darrera empenta i els consells finals, sobretot amb la síntesi de pèptids que em va donar algun mal de cap.

Vull agrair també el suport tècnic. Al servei de RMN, al servei d'espectroscòpia de masses i al servei de proteòmica del Parc Científic de Barcelona.

Voldria donar les gràcies de forma especial, a la Dra. Dolors Pujol, professora titular del departament de Farmacologia i Química Terapèutica de la facultat de Farmàcia, amb qui guardo amistat des d'aquells llunyans treballs pràctics quan jo encara feia la carrera. A ella li haig d'agrair que em transmetés el seu amor per la química i les ganes de fer recerca i, a nivell personal, el tracte i els consells que sempre m'ha donat. I no m'oblido de les persones que vaig conèixer allà i em van transmetre els seus coneixements, la Isa, el Manel i el Yousef i els meus companys, la Steffi, Clara, Gio,

l'Eli, amb els que vaig passar tants bons moments. També els doctorants actuals, el Joan i la Núria, amb els qui he passat bones estones, sobretot en aquell congrés de Viena.

A tots els companys del meu antic laboratori que em van ajudar quan vaig arribar i em van fer costat fins al final. Sobretot agrair a la Dra. Ana B. Sánchez i a la Dra. Montse Cruz, per ensenyar-me els primers secrets del laboratori i també a la Dra. Cristina Minguillon i al Dr. Rodolfo Lavilla.

També donar les gràcies a la gent del 100 i Pharmamar del PCB per deixar-me els equips com si fos un més del grup. Gràcies també a la Marta, la Yesica, la Sveta, per ajudar-me sempre que us ho he demanat i per les trobades als passadissos. Gràcies al Ramon per la Oxima i per les converses més futboleres. Gràcies també als companys del departament de Química Orgànica de la facultat de farmàcia.

I que dir dels meus companys del Macias Lab! Us haig d'agrar a tots la manera com em va acollir, com m'heu ajudat i el que m'heu ensenyat. A la Nina, que ja coneixia de les Cool-Off, al Pau, al que he portat de corcoll amb l'imant, les figures i els càlculs, a l'Eric que m'ha facilitat molt la feina quan tot era tan complicat, a la Lidia per fer-me les coses més fàcils (es que no m'aclaria amb els espectres). Menció apart per l'Albert amb el que he compartit la campana dels pèptids, els dinars i mil històries. Gràcies a tots per fer-me més agradable el dia a dia. També me'n recordo dels que ja van marxar, el Roman (gràcies pels consells) i el Tiago (o fenômeno)

També tinc un record pels companys francesos que em van fer passar una bona estada i als que he retrobat després de 3 anys. Je veux remercier au Dr. Laurent Micouin, directeur de recherche CNRS à l'université Paris Descartes, pour m'accueillir au sein de son équipe et pour me permettre d'appendre une chimie différente. Je remercie aussi à Thomas, Gauthier, Morgane, Farouk, Serge, Marlène, Mounira pour son aide ainsi que mes nouveaux collègues Olivier, Melissa et Thom.

No em puc oblidar dels meus ex-companys de la Farmàcia Rubís, que em van fer passar els dissabtes de feina de forma diferent. Mil gràcies tant a la Piedad com al Noel, als que he tingut una mica oblidats aquests darrers mesos, però...us en dec una.

I en tant de temps al Parc també he conegut a gent amb les que he compartit alguna cosa més que el laboratori. Es el cas da l'Eulàlia, la Patricia, el Carlos, el Nicola

(muchacha suerte!), l'Anna (ja falta poc) i l'Albert (gairebé un químic més), la Núria (ja ho tenim), la Miriam (i el Pedro), el Dani (quin gran tio) i l'Albert (gran químic, gran persona i millor culé).

També agrair als amics "farmacèutics": la Cris i l'Héctor (ens veiem al casament), el Xavi i la Neus, la Cesca i el Xavi, la Gemma (li he de dir jefa?) i el Joseba. Gràcies per sopars, calçotades i les estones que hem passat. I també als que no estan en el mundillo: la Silvia, el Paco, el Xavi, la Olga i la Maria José.

No puc deixar d'agrair el suport de tota la meva família, els meus tiets i cosins, que m'han recolzat al llarg del camí recorregut. Un "gràcies" amb majúscula per a la tieta Paquita, que sempre s'ha preocupat més per mi (i per tots) que per ella mateixa. Gràcies també a la meva altra família, la Verónica i la Tabita per fer-me oblidar una mica la química. Tabita, esforçat i estudia molt a veure si algun dia surto jo als teus agraïments, em faria molta il·lusió.

També vull tenir un record molt especial pels meus avis, als que els hagués agradat veure'm arribar fins aquí. Gran part d'aquest èxit és gràcies a ells, que em van ensenyar a lluitar, a treballar i a viure segons uns principis. Us trobo a faltar.

No tinc paraules per agrair tot el suport que he rebut dels meus pares. Al meu pare agrair-li tots els seus consells de bon químic i de bon pare. A la meva mare, que no m'ha pogut ajudar amb les reaccions, però que m'ha animat i tranquil·litza't quan les coses semblaven més complicades. Ells han patit amb mi i m'han animat a tirar endavant quan feia falta. Gràcies per haver-me ensenyat tantes coses, per haver-me recolzat sempre i per haver-me fet sentir tant estimat. Sou el millor exemple per mi. Gràcies també a la meva germana Núria i al Marcos que també han patit els meus nervis i m'han ajudat a que aquest treball arribés a bon port. Us estimo als dos. Gràcies per estar al meu costat.

Per acabar, vull agrair-li a l'Andrea tot el suport que m'ha donat en tot des de que la vaig trobar. Ella ha estat al meu costat en els moments feliços però també en els més complicats i m'ha donat tots els ànims i suport que necessitava. Gràcies per estar al meu costat sempre, per entendre'm i creure en mi, per estimar-me i voler seguir aquest camí amb mi. Gràcies per ser com ets, t'estimo.

Gràcies a tots.

ÍNDEX.

ABREVIATURES	1
CAPÍTOL 1. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS	5
1.1. Estructures secundàries: girs β i γ	9
1.2. Pèptids cíclics	13
1.3. Propietats conformacionals dels pèptids cíclics	15
1.4. Aminolactams com a mimètics de gir β	17
1.5. Sistema melanocortínic	21
1.5.1. Receptors melanocortínics	24
1.5.2. Estudis de relacions estructura-activitat de l' α -MSH	26
1.5.3. Estudis d'epimerització d' α -MSH i disseny de l' MT1	27
1.5.4. Estudis sobre MT1 : mínima seqüència activa	28
1.5.5. Disseny de l' MT2	30
1.5.6. Anàlegs d' MT2	31
1.5.7. Efectes sobre el receptor MC1R. Enfosquiment de la pell	33
1.5.7.1. Melanotan-1: estudis clínics i comercialització	34
1.5.8. Efectes sobre els receptors MC3R i MC4R. Tractament d'obesitat i transtorns sexuals	36
1.5.8.1. Obesitat	36
1.5.8.2. Disfunció erèctil	38
1.5.8.3. Melanotan-2 i PT-141 en el tractament de l'impotència	38
1.5.8.4. Selectivitat MC3R/MC4R	39
1.6. Objectius	42
1.6.1. Disseny	43
1.6.2. Síntesi dels dipèptids conformacionalment restringits	43
1.6.3. Síntesi de la quimioteca	43
1.6.4. Estudi conformacional per RMN	44
CAPÍTOL 2. ESTUDIS ESTRUCTURALS DE MODELITZACIÓ MOLECULAR	45
2.1. Tècniques clàssiques	47
2.1.1. Temprat simulat ("Simulated Annealing")	47
2.1.2. Temprat simulat iteratiu ("Iterative Simulated Annealing")	48

2.1.3. Dinàmica molecular	48
2.1.4. Monte Carlo	49
2.2. Precedents	50
2.3. Plantejament	52
2.4. Resultats	53
2.4.1. Anàlisi conformacional del model MT2	53
2.4.2. Anàlisi conformacional del ψ -melanotan 121a-b	54
2.5. Recapitulació	56

CAPÍTOL 3. SÍNTESI DELS LACTAMS **57**

3.1. Síntesi de la 3-amino- Δ^3 -piperideinona de partida (21)	61
3.2. Síntesi del lactam derivat de Trp (13)	63
3.2.1. Addició conjugada	63
3.2.2. Transposició de Curtius	63
3.2.3. Funcionalització per síntesi peptídica Fmoc/ ^t Bu	66
3.3. Síntesi del lactam derivat de Lys (14)	67
3.3.1. Addició conjugada del precursor del grup aminometil	68
3.3.1.1. Addició de nitril	68
3.3.1.2. Addició de nitrometà	69
3.3.2. Reducció del grup precursor d'aminometil	70
3.3.3. Transposició de Curtius	72
3.4. Síntesi de l'oxazolopiperidona (15)	74
3.4.1. Antecedents	74
3.4.2. Síntesi	77
3.4.2.1. Formació de l'aldehid de Fukuyama	77
3.4.2.2. Formació del bicicle 40	79
3.4.2.3. Funcionalització del bicicle per la síntesi peptídica	80
3.5. Recapitulació	81

CAPÍTOL 4. SÍNTESI DELS DIAZANORBORNANS **83**

4.1. Diazanorbans en estructures peptídiques. Azapèptids	86
4.2. Preparació de les hidrazines bicícliques	91
4.2.1 Antecedents en la síntesi de bicicles 2,3diazabicyclo[2.2.1]heptà	91
4.2.2. Síntesi dels diazanorbans a partir d'hidrazines no simètriques	94
4.2.2.1 Síntesi del motiu hidrazina intermedi 60	94

4.2.2.2. Modificació del motiu bicíclic	96
4.3. Síntesi dels diazanorbornans a partir d'hidrazines bicícliques <i>meso</i>	99
4.3.1. Síntesi dels bicicles <i>meso</i>	100
4.3.2. Síntesi dels precursors per addició enantioselectiva sobre la insaturació	101
4.3.3 Síntesi dels anàlegs de Ser	103
4.3.3.1. Anàlegs de Ser amb grup hidroxil en la posició C-5 (85-87)	103
4.3.3.2. Anàlegs de Ser amb grup hidroximetil a C-5 (88-90)	106
4.3.4. Síntesi dels derivats d'Arg	108
4.4. Síntesi dels tripèptids	110
4.4.1. Síntesi dels tripèptids Trp-azaSer-Phe 109 i 110	110
4.4.2. Síntesi del tripèptid Trp-azaArg-Phe 113	114
4.5. Síntesi dels diazanorbornans mimètics de gir 114 i 115	115
4.6. Recapitulació	117
CAPÍTOL 5. SÍNTESI DELS PSEUDOMELANOTANS	119
5.1. Introducció a la síntesi en fase sòlida	124
5.1.1. Estratègies en la SPPS	126
5.1.2. Agents d'acoblament	127
5.1.3. Escissió de la resina	130
5.2. Precedents en la síntesi de l' MT2	131
5.3. Síntesi de l' MT2	133
5.3.1. Ciclació en fase sòlida	134
5.3.2. Ciclació en dissolució	137
5.3.3. Purificació i caracterització d' MT2	138
5.4. Síntesi dels ψ -melanotans	138
5.4.1. Síntesi dels ψ -MT2 amb anàlegs dipèptidics rígids a la zona activa	139
5.4.1.1. Síntesi dels ψ -MT2 lactàmics 121a i 121b	139
5.4.1.2. Síntesi del ψ -MT2 120 modificat amb azaArg	141
5.4.2. Síntesi del ψ -MT2 amb modificació de la zona central del gir β (122)	142
5.4.3. Síntesi dels ψ -melanotans amb substitucions de la Lys	144
5.4.3.1. Modificació amb l'oxazolopiperidona 15	144
5.4.3.2. Modificació de la part flexible amb el diazanorbornà 101b	145
5.4.3.3. Substitució de la Lys pel diazanorbornà 114	149

5.4.3.4. Substitució de la Lys pel diazanorbornè	115	150
5.5. Estudi conformacional dels pseudopèptids per RMN		151
5.5.1. Estudi de RMN del pèptid de referència MT2		151
5.5.2. Estudi conformacional del ψ -pèptid 121a		152
5.5.3. Estudi conformacional del ψ -pèptid 120		154
5.5.4. Estudi del ψ -pèptid 122		154
5.5.5. Estudi estructural del ψ -melanotan 123		155
5.5.6. Estudi dels pèptids 124 i 125 per RMN		155
CHAPTER 6. SUMMARY & CONCLUSIONS		157
CHAPTER 7. EXPERIMENTAL SECTION		161
7.1. Main solvents and reagents		163
7.2. Materials and Instrumentation		164
7.3. Experimental procedures of chapter 3		166
7.4. Experimental procedures of chapter 4		189
7.5. Experimental procedures of chapter 5		237
7.5.1. General procedures for solid phase peptide synthesis		237
7.5.1.1. Protocol for the incorporatation of the first amino acid		237
7.5.1.2. Iterative peptide assembly		239
7.5.1.3. Macrocyclic lactam ring formation		240
7.5.2. Analytical methods		243
7.5.2.1. Kaiser Test		243
7.5.2.2. High-performance liquid chromatography		244
7.5.2.3. Mass spectrometry (MALDI-TOF)		244
7.6. Synthesis of peptides		244
7.6.1. Synthesis of MT2		244
7.6.2. Synthesis of {Trp} melanotans 121a and 121b		246
7.6.3. Synthesis of {Arg} melanotan 120		247
7.6.4. Synthesis of ψ -melanotan 122		248
7.6.5. Synthesis of ψ -melanotan 123		250
7.6.6. Synthesis of ψ -melanotans 124 and 125		251

ABREVIATURES

2,6-Dcb	2,6-diclorobenzil
Å	Amstrongs
aa	aminoàcid
AAA	anàlisi d'aminoàcids
Ac	acetil
AcOEt	acetat d'etil
AcOH	àcid acètic
ACTH	corticotropina
Ala	alanina
Alloc	al·liloxicarbonil
AMPC	adenosil monofosfat cíclic
anh	anhidre
Arg	arginina
Asp	àcid <i>L</i> -aspàrtic
ax	axial
Bn	benzil
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonil
Boc₂O	dicarbonat de di- <i>tert</i> -butil
Bom	benziloximetil
BOP	hexafluorofosfat
cm	centímetre
Cys	<i>L</i> -cisteïna
d	doblet
D	àcid <i>L</i> -aspàrtic
Dab	àcid α,γ -diaminobutíric
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-è
DCM	diclorometà
dd	doble doblet
ddd	doble doblet de doblets
DIEA	diisopropiletilamina
DIPCDI	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida
diZ	bis-benziloxicarbonil
DM	Dinàmica Molecular

DMAP	4-(dimetilamino)piridina
DME	1,2-dimetoxietà
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
D-Nal	<i>D</i> -naftilalanina
D-Phe	<i>D</i> -fenilalanina
DPPA	difenilfosforilazida
Dpr	àcid α,β -diaminopropiònic
E	àcid <i>L</i> -glutàmic
EM-IE	espectromètria de masses per impacte electrònic
EM-IQ	espectromètria de masses per ionització química
eq	equatorial
Et₂O	èter dietílic
Et₃N	trietilamina
F	<i>L</i> -fenilalanina
fig	figura
Fmoc	(9-fluorenil)metoxicarbonil
Fmoc-Osu	(9-fluorenilmetoxicarboniloxi)succinimida
For	formil
G	<i>L</i> -glicina
g	gram
Gln	<i>L</i> -glutamina
Glu	àcid <i>L</i> -glutàmic
Gly	<i>L</i> -glicina
H	<i>L</i> -histidina
h	hores
HBTU	hexafluorofosfat 2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1il)-1,1,3,3-tetrametiluroni
His	<i>L</i> -histidina
HOBt	1-hidroxibenzotriazole
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hz	hertz
Ile	<i>L</i> -isoleucina
i'PrOH	isopropanol
IR	infrarroig
ISA	Iterative Simulated Annealing
J	constant d'acoblament (en Hz)
K	<i>L</i> -lisina

LHMDS	bis(trimetilsilil)amidur de liti
Lys	<i>L</i> -lisina
m	multiplet
M	<i>L</i> -metionina
m/z	relació massa/càrrega
MALDI-TOF	Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization Time-Of-Flight
<i>m</i>-CPBA	àcid 3-cloroperbenzoic
MCR	receptors melanocotínics
Me	metil
MeOH	metanol
Met	<i>L</i> -metionina
mm	milímetres
MT1/MT2	melanotan-I/melanotan-II
Nle	<i>L</i> -norleucina
nm	nanòmetre
OCy	<i>O</i> -ciclohexil
Orn	<i>L</i> -ornitina
P	<i>L</i> -prolina
Pbf	2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-il-sulfonil
Ph	fenil
POMC	proopiomelanocortina
ppm	parts per milió
Pro	<i>L</i> -prolina
PyBOP	hexafluorofosfat de benzotriazol-1-il-tris-pirrolidinfosoni
PyBrOP	hexafluorofosfat de bromotripirrolidinfosoni
R	<i>L</i> -arginina
ref	referència
RMN	Ressonància Magnètica Nuclear
s	singlet
S	<i>L</i> -serina
Ser	serina
SNC	sistema nerviós central
SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis
t	triplet
t.a	temperatura ambient
TBAB	bromur de tetrabutilamoni

tBu	<i>tert</i> -butil
td	triple doblat
TFA	àcid trifluoroacètic
THF	tetrahidorfuran
TIS	triisopropilsilà
TMSOTf	triflat de trimetilsilil
Tos	tosil
Trp	triptòfan
Trt	trifenilmetil (tritol)
Tyr	<i>L</i> -tirosina
UV	ultraviolat
V	<i>L</i> -valina
Val	<i>L</i> -valina
W	<i>L</i> -triptòfan
Y	<i>L</i> -tirosina
Z	benziloxicarbonil
Δ	escalfar
α-MSH	alfa-melanotropina/hormona melanocit estimulant
δ	desplaçament químic (en ppm)
μL	microlitre

INTRODUCCIÓ

CAPÍTOL 1. INTRODUCCIÓ

Els pèptids són un dels principals components dels éssers vius. Aquests estan involucrats en un gran nombre de processos fisiològics com, per exemple, en la transmissió de senyals extracel·lulars (són neurotransmisors, hormones, o neuromoduladors) i també en processos de metabolisme i defensa immune. A més moltes interaccions pèptid-proteïna estan involucrats en el desenvolupament de processos patològics.

Les propietats biològiques d'un pèptid venen donades per la seva estructura primària, es a dir, la seqüència d'aminoàcids que el constitueixen. Però, en realitat de la manera com es disposin aquests residus en l'espai conformacional dependrà la eficàcia de la unió entre el pèptid i el receptor, es a dir de la seva estructura secundària. Aquesta estructura secundària o conformació depèn de diferents factors, com poden ser l'entorn de la molècula, les interaccions estèriques i electrostàtiques entre les cadenes laterals de l'esquelet peptídic, la configuració dels diferents residus i la formació d'enllaços d'hidrogen intramoleculars.

En els darrers anys hi ha hagut un augment considerable de fàrmacs peptídics disponibles, que inclouen un ampli ventall d'indicacions terapèutiques. Es conegut que, malgrat el gran potencial terapèutic que tenen els pèptids, presenten serioses limitacions, sobretot pel que fa a la seva biodisponibilitat per via oral. Per aquesta raó, molts esforços s'han centrat a trobar maneres de reemplaçar certes parts dels pèptids biològicament actius per estructures no peptídiques. Aquests compostos que presenten estructures no peptídiques però que són capaces de mimetitzar o antagonitzar l'acció biològica del peptid natural del qual deriven es defineixen com peptidomimètics. Els peptids en dissolució existeixen com una barreja de conformers en equilibri. Una de les maneres de obtenir peptidomimètics es la ciclació¹ o la introducció en el seu esquelet d'aminoàcids de conformació restringida.²

¹ Hruby, V. J.; *Life Science*, **1982**, *32*, 189-199.

² a) Hugues, J.; Smith, T. W.; Kosterlitz, H. W.; Fothergill, L. A.; Morgan, B. A.; Morris, H. R., *Nature*, **1975**, *258*, 577-579. b) Freidinger, R. M.; Veber, D. F.; Perlow, D. S.; Brooks, J. R.; Saperstein, R.; *Science* **1980**, *210*, 656-658. c) Freidinger, R. M.; Perlow, D. S.; Veber, D. F.; *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 104-109. d) Scott, W. L.; Martynow, J. G.; Huffman, J. C.; O'Donnell, M. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7077-7088. e) Krasavin, M.; Parchinsky, V.; Shumsky, A.; Konstantinov, I.; Vantskul, A.; *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 1367-1370.

Idealment aquests peptidomimètics mantenen la disposició en l'espai apropiada dels grups funcionals essencials pel reconeixement del receptor i a més eviten algunes de les propietats no desitjades dels pèptids.³ Degut a la capacitat dels peptidomimètics per disposar-se de manera semblant al pèptid natural al qual imiten, aquests es poden unir als receptors i enzims desplaçant als seus lligands naturals. Es per això que els peptidomimètics poden augmentar els efectes del pèptid original (agonistes) o bé reduir-los (antagonistes).⁴

Normalment, els peptidomimètics es preparen mantenint la seqüència del pèptid natural, alterant mínimament el seu entorn amb aminoàcids o enllaços amida modificats (pseudopeptids) o introduint enllaços no amídics com, per exemple, un enllaç ester (depsipeptids)⁵ o heterocicles com lactams⁶ o espirolactams⁷ de diferents mides. Fins i tot pot ser que no tinguin estructura peptídica.⁸ En tots els casos el que s'aconsegueix es una major resistència metabòlica ja que aquests peptidomimètics no són reconeguts per les proteases. A més la modificació introduïda tendeix a reduir la llibertat conformacional respecte al pèptid natural del qual deriven, el que pot fer augmentar la seva selectivitat front al receptor. A més, els peptidomimètics ens poden donar informació de la conformació bioactiva del peptid natural (lligand) així com també del seu receptor.⁹

³ a) Piserchio, A.; Han, Y.; Chorev, M.; Mierke, D. F.; *Biopolymers*, **2002**, *64*, 16. b) Goodman, M.; Zapf, C.; Rew, Y.; *Biopolymers*, **2001**, *60*, 229-245.

⁴ Nozawa, D.; Okubo, T.; Chaki, S.; Okuyama, S.; Nakazato, A. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 1232-1239.

⁵ Li, W.; Schlecker, A.; Ma, D. *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 5403-5420.

⁶ Hanessian, S.; McNaughton-Smith, G.; Lombart, H. G.; Lubell, W. D., *Tetrahedron*, **1997**, *53*, 12789-12854.

⁷ Gutiérrez-Rodríguez, M.; Martín-Martínez, M.; García-López, M. T.; Herranz, R.; Cuevas, F.; Polanco, C.; Rodríguez-Campos, I.; Manzanares, I.; Cárdenas, F.; Feliz, M.; Lloyd-Williams, P.; Giralt, E., *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 5700-5712.

⁸ Mwakwari, S. C.; Guerrant, W.; Patil, V.; Khan, S. I.; Tekwani, B. L.; Gurard-Levin, Z. A.; Mrksich, M.; Oyelere, A. K., *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 6100-6111.

⁹ a) Nikiforovich, G. V.; Marshall, G. R.; Achilefu, S. *Chem. Biol. Drug Des.* **2007**, *69*, 163-169. b) Marshall, G. R. *Biopolymers* **2001**, *60*, 246-277.

1.1. Estructures secundaries: girs β i girs γ

Sovint els pèptids biològicament actius adopten en la seva estructura secundària conformacions com girs, que poden augmentar la unió amb la diana terapèutica.¹⁰ Hi ha dos tipus de conformacions anomenades girs β i girs γ . Aquestes estructures secundaries reben el nom de girs perquè provoquen un canvi en la direcció de la cadena peptídica i són aquests els que fan que la molècula sigui més aviat globular que lineal. A més aquests girs també són presents en proteïnes als llocs on es produeixen canvis conformacionals o plegaments. Els residus que formen part d'ells estan situats a la superfície de les proteïnes i per tant són importants zones de reconeixement d'anticossos i també zones d'interacció amb altres pèptids i proteïnes o bé amb el DNA. Es conegut que els aminoàcids que formen part d'un gir β juguen un paper clau en processos de reconeixement molecular i en determinació antigènica.

El gir beta va ser identificat per primer cop per Venkatachalam¹¹ l'any 1968 i proposava la presència de 3 tipus diferents de girs β , basant-se en els valors dels angles phi i psi. Va establir així que hi havia girs β de tipus I, II i III i els va diferenciar dels girs amb els angles phi i psi de signe oposat (imatges especulars) que s'anomenaven I', II' i III' respectivament. Tots aquests girs formaven un pont d'hidrogen entre el carbonil de l'aminoàcid en posició (i) i el grup amino del residu en posició (i+3) formant un pseudocicle de 10 membres.

Posteriorment, Lewis i col·laboradors¹² van estudiar els girs β que es trobaven en diverses proteïnes i van establir que per a la formació d'un gir β calia que: (a) la distància entre el C α del residu (i) i el C α del residu (i+3) fos menys de 7 Å i (b) que el residu (i+1) i (i+2) no es trobin formant part d'una hèlix. Així, doncs, un gir β es pot definir com una regió de la proteïna que inclou 4 residus consecutius d'una zona no helicoïdal que provoca un canvi en la direcció d'aquesta cadena i en que la distància entre (i) i (i+3) és inferior a 7 Å. Aplicant aquests requisits van obtenir un total de 10 tipus de girs beta (I, I', II, II', III, III', IV, V, VI, VII).

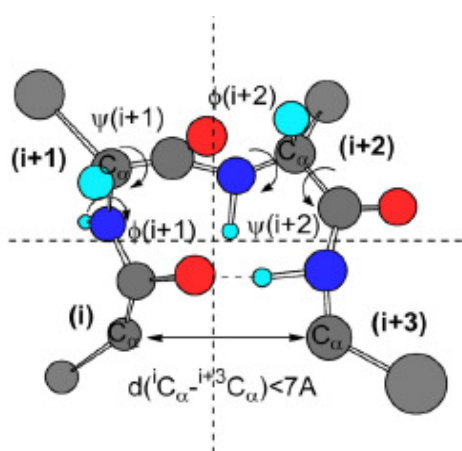
¹⁰ a) Hruby, V. J., Wilkes, B. C., Cody, W. L., Sawyer, T. K., Hadley, M. E., *Pep. Protein Rev.* **1984**, *3*, 1-64.
b) Haubner, R.; Gratias, R.; Diefenbach, B.; Goodman, S. L.; Jonczyk, A.; Kessler, H., *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7461-7472. c) Schumann, F.; Müller, A.; Kokschi, M.; Müller, G.; Sewald, N., *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12009-12010.

¹¹ Venkatachalam, C. M. *Biopolymers* **1968**, *6*, 1425-1436.

¹² Lewis, P. N.; Momany, F. A.; Scheraga, H. A. *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, *303*, 211-229.

Lewis també va observar que només el 60% dels girs β presentaven el pont d'hidrogen entre els residus (i) i (i+3) formant un pseudocicle de 10 membres. A vegades també es pot formar un segon pont d'hidrogen que consolida aquesta estructura. Aquells girs β que no presenten pont d'hidrogen s'anomenen girs oberts.

Més tard, l'any 1994, Hutchinson i Thornton¹³ han suggerit l'existència de 9 tipus diferents de gir beta (I, I', II, II', IV, VIa1, VIa2, VIb i VIII) basant-se en els angles phi i psi. En la següent taula es mostren els nou tipus de gir beta segons aquesta classificació amb els corresponents angles diedres ideals per cadascun d'ells.¹⁴



Tipus de gir β	Angles diedres			
	Φ_{i+1}	Ψ_{i+1}	Φ_{i+2}	Ψ_{i+1}
I	-60	-30	-90	0
I'	60	30	90	0
II	-60	120	80	0
II'	60	-120	-80	0
IV	-61	10	-53	17
VIa1	-60	120	-90	0
VIa2	-120	120	-60	0
VIb	-135	135	-75	160
VIII	-60	-30	-120	120

Taula I. Classificació dels girs β segons Thornton i Hutchinson.¹³

Els angles ω dels enllaços peptídics són generalment plans i constants, normalment 180° (trans), tot i que en ocasions poden ser de 0° (cis). Una altra característica dels girs beta es que la longitud de l'enllaç $C=O_{(i)} \cdots N-H_{(i+3)}$ està compresa entre 1,8 i 2,5 Å. Els girs β que es troben més freqüentment en la natura són els de tipus I, II i VIII. Malgrat que els girs de tipus I representen el 42% dels girs trobat en estructures cristal·lines de proteïnes, la majoria dels mimètics de gir β descrits són de tipus II i II'¹⁵ i en menor mesura de tipus I o VI.¹⁶

¹³ Hutchinson, G.; Thornton, J. M., *Protein Science*, **1994**, *3*, 2207-2216

¹⁴ Per a classificacions detallades de tipus de girs- β , veure: a) Rose, G. D.; Gierasch, L. M.; Smith, J. A. *Adv. Protein Chem.*, **1985**, *37*, 1-109. b) Wilmot, C. M.; Thornton, J. M., *Prot. Engineer.*, **1990**, *3*, 479-493. c) Rotondi, K. S.; Gierasch, L. M. *Biopolymers (Peptide Science)*, **2006**, *84*, 13-22.

¹⁵ a) Raghavan, B.; Skoblenick, K. J.; Bhagwanth, S.; Argintaru, N.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L., *J. Med. Chem.*, **2009**, *52*, 2043-2051. b) Angell, Y.; Burgess, K., *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 9595-9598. c) Somu, R.

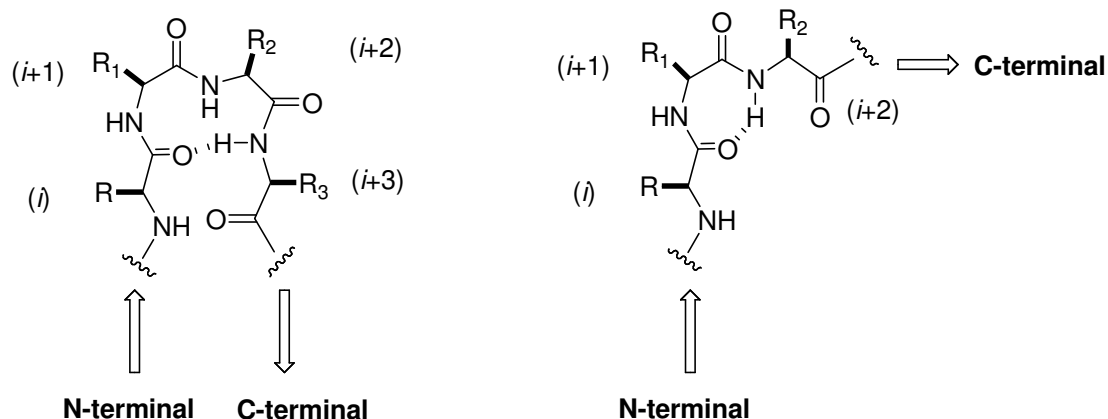
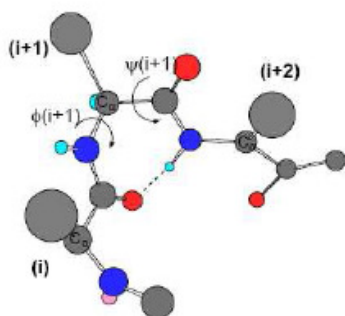


Figura 1.1. Estructura general d'un gir- β i d'un gir- γ .

D'altra banda, els girs γ estan formats per 3 aminoàcids generant pseudocicles de 7 membres. En aquest cas es forma un enllaç d'hidrogen entre el carbonil del residu (i) i la amida del residu (i+2) però únicament queda un residu intern.¹⁷ Els angles diedres (ϕ i ψ) que pot adoptar un gir- γ van ser determinats per Némethy i Printz.¹⁸



Gir γ	Φ_{i+1}	Ψ_{i+1}
Normal	70/85	-60/-70
Invers	-70/-85	60/70

Taula II. Tipus de girs γ en funció dels seus angles diedres.

V.; Johnson, R. L., *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 5954-5963. d) Oishi, S.; Miyamoto, K.; Niida, A.; Yamamoto, M.; Ajito, K.; Tamamura, H.; Otake, A.; Kuroda, Y.; Asai, A.; Fujii, N., *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 1416-1424.

¹⁶ a) Liu, J.; Brahimi, F.; Saragovi, H. U.; Burgess, K., *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5044-5048. b) Vartak, A. P.; Johnson, R. L., *Org. Lett.*, **2006**, *8*, 983-986. c) Verbist, B. M. P.; De Borggraeve, W. M.; Toppet, S.; Compennolle, F.; Hoornaert, G. J., *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, *14*, 2941-2950.

¹⁷ a) Chon, K. C.; *Anal. Biochem.*, **2000**, *286*, 1-16. b) Rosenström, U.; Sköld, C.; Plouffe, B.; Beaudry, H.; Lindeberg, G.; Botros, M.; Nyberg, F.; Wolf, G.; Karlén, A.; Gallo-Payet, N.; Hallberg, A., *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 4009-4024.

¹⁸ Némethy, G.; Printz, M. P., *Macromolecules*, **1972**, *5*, 755-758.

Es poden formar dos tipus de gir- γ segons si la cadena lateral del residu (i+1) queda orientada en equatorial (C7-eq), cas en el que es forma un gir γ invers, o en axial (C7-ax) en que es formarà el gir γ clàssic molt menys comú.¹⁹

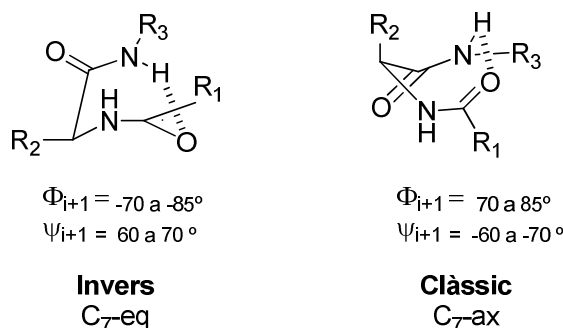


Figura 1.2. Tipus de gir- γ .

El fet que es formi un gir o un altre depen de la naturalesa dels residus que hi participen, així com també de la posició que ocupen dintre el gir i la configuració relativa dels aminoàcids de les posicions (i+1) i (i+2).²⁰ Per exemple, es conegut, que la presència d'un residu de prolina en la posició (i+1) o glicina en la (i+2) afavoreix la formació de gir- β .²¹ L'anell de pirrolidina en la L-prolina restringeix l'angle ϕ a -60° . Per tant la prolina amb un enllaç peptídic trans es troba preferencialment en posició (i+1) de un gir β de tipus I o de tipus II. D'altra banda també es coneguda la influencia, quant a la quiralitat, dels residus centrals del gir (i+1) i (i+2) en el tipus de gir β que es forma.²² En general seqüències homoquirals, es a dir (L-L) o (D-D) afavoreixen la formació de girs- β de tipus I i I' respectivament i seqüències heteroquirals (L-D) o (D-L) afavoreixen la formació de girs- β de tipus II i II'.²³

Aquest fet s'explica per les interaccions estèriques entre la cadena lateral del residu (i+1) amb el carbonil (i+1) i el NH (i+2), afavorint les conformacions en les que aquests grups es troben allunyats. Els girs- β més abundants són, per tant, els de tipus I, degut a que els aminoàcids naturals son L-aminoàcids. Altres residus que es fan servir per restringir la conformació són els N-metil aminoàcids, que possibiliten la isomeria cis-

¹⁹ Stachel, S. J.; hu, H.; Van, Q. N.; Shaka, A. J.; Van Vranken, D. L. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1439-1446.

²⁰ Boussard, G.; Marraud, M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107*, 1825-1828.

²¹ a) Fu, H.; Grimsley, G. R.; Razvi, A.; Scholtz, J. M.; Pace, C. N., *Proteins*, **2009**, *77*, 491-498. b) Kessler, H.; Bermel, W.; Friedrich, A.; Krack, G.; Hull, W. E., *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, *104*, 6297-6304.

²² Feng, Y.; Pattarawarapan, M.; Wang, Z.; Burgess, K., *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 9175-9177.

²³ Brenner, V.; Piuze, F.; Dimicoli, I.; Tardivel, B.; Mons, M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 2463-2466.

trans de l'enllaç peptídic, els α -substituïts, que donen lloc a estructures semblants a α -helix 3_{10} , o els aminoàcids α,β -insaturats, i els α,α -disubstituïts (per exemple Aib) que també donen lloc a altres tipus de girs- β .²⁴

La disposició de les cadenes laterals dels aminoàcids contigus es un altre factor influent en el tipus de gir que es formarà.²⁵ L'esquelet peptídic es disposarà d'una determinada manera segons els angles que formin les cadenes laterals entre elles, i aquest canvi de conformació depenent de la orientació de les cadenes laterals dels residus es un factor crític en la selectivitat dels pèptids pels seus receptors.

1.2. Pèptids cíclics

Com s'ha comentat anteriorment, una de les maneres de fixar la conformació d'una determinada regió són les estructures cícliques.¹ Els pèptids cíclics són un tipus de compostos poc freqüents que van ser descoberts per primer cop als microorganismes, degut a les seves propietats biològiques. L'interès pels pèptids cíclics començà amb el descobriment de l'antibiòtic gramicidina S d'estructura cíclica.²⁶ Aquest decapeptid cíclic va ser un dels primers fàrmacs peptídics sintetitzats²⁷ i es comercial des dels anys 50. Posteriorment, s'han trobat a la natura des de pèptids cíclics amb activitat antimicrobiana, com la bacitracina²⁸ i la polimixina B, fins a immunosupresors com la ciclosporina. També s'han descobert toxines naturals amb estructura de pèptid cíclic, com per exemple les amatoxines, com la amanitina A que prové del gènere dels bolets amanita.

Aquests compostos han adquirit una gran importància com a potencials fonts de nous fàrmacs, ja que presenten diferents avantatges respecte als lineals. En primer lloc gaudeixen d'una major estabilitat metabòlica,²⁹ es a dir, són molt més resistents a les

²⁴ Hruby, V. J.; Al-Obeidi, F.; Kazmierski, W., *Biochem. J.*, **1990**, *268*, 249-262.

²⁵ a) Ötvös, F.; Gembitsky, D. S.; Murphy, R. F.; Lovas, S., *International Journal of peptide research and therapeutics*, **2007**, *13*, 329-336. b) Stites, W. E.; Meeker, A. K.; Shortle, D., *J. Mol. Biol.*, **1994**, *235*, 27-32.

²⁶ a) Gause, G. F.; Brazhnikova, M. G., *Am. Rev. Sov. Med.* **1944**, *2*, 134-138. b) Gause, G. F.; Brazhnikova, M. G. *Nature (London)*, **1944**, *154*, 703.

²⁷ a) Schwyzer, R.; Sieber, P., *Helv. Chim. Acta*, **1957**, *40*, 624-626. b) Schwyzer, R.; Sieber, P., *Helv. Chim. Acta*, **1958**, *41*, 2186-2190.

²⁸ Johnson, B.; Anker, H.; Meleney, F., *Science*, **1945**, *102*, 376-377.

²⁹ Hess, S.; Linde, Y.; Ovadia, O.; Safrai, E.; Shalev, D. E.; Swed, A.; Halbfinger, E.; Lapidot, T.; Winkler,

proteases. Aquest fet s'explica perquè aquests pèptids no tenen extrems lliures i per tant no són reconeguts pels enzims exopeptidasa encarregats de l'inici del metabolisme de les proteïnes.

A més, els pèptids cíclics tenen una polaritat menor que els seus anàlegs lineals afavorint, així, la permeabilitat a través de les membranes cel·lulars i augmentant la potència farmacològica. Degut a aquesta elevada permeabilitat aquests pèptids tenen una gran utilitat com a transportadors o *carriers*.³⁰ Això vol dir que poden ser dissenyats per transportar fàrmacs que per si sols no travessarien les barreres fisiològiques. Si el fàrmac a transportar és un altre pèptid, aquest pot ser inclòs en la estructura cíclica del pèptid.

Pel que fa a la selectivitat, aquests són més selectius degut a la reducció de llibertat conformacional que presenten.³¹

Aquestes característiques específiques dels pèptids cíclics són degudes, no solament a la seva estructura circular sinó també a la seva biosíntesi, que normalment incorpora compostos poc comuns, per exemple aminoàcids de configuració D.

Pel que fa a la seva classificació, els pèptids cíclics es diferencien segons el tipus d'enllaç que uneixen els diferents residus del pèptid. Aquests poden ser homodètics o heterodètics. En els cas dels primers, l'anell està format exclusivament per aminoàcids units únicament per enllaços amida. En el cas dels heterodètics, existeixen altres tipus d'enllaç entre els aminoàcids que formen el cicle, com per exemple enllaços tipus ester, éter, tioèter, enllaços C-C o més freqüentment ponts disulfur formats per la oxidació dels tiols presents a la cadena lateral dels residus de cisteïna.

I.; Gabinet, Y.; Faier, A.; Yarden, D.; Xiang, Z.; Portillo, F. P.; Haskell-Luevano, C.; Gilon, C.; Hoffman, A., *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 1026-1034.

³⁰ a) Prakash, J.; de Jong, E.; Post, E.; Gouw, A. S. H.; Beljaars, L.; Poelstra, K., *J. Controlled release*, **2010**, *145*, 91-101. b) Sasaki, Y.; Minamizawa, M.; Ambo, A.; Sugawara, S.; Ogawa, Y.; Nitta, K., *FEBS Journal*, **2008**, *275*, 6011-6021. c) Dumy, P.; Favrot, M. C.; Boturyn, D.; Coll, J. L., *PCT Int. Appl.*, **2004**, WO 2004026894 A2 20040401.

³¹ a) Hruby, V. J., *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2002**, *1*, 847. b) Byk, G.; Halle, D.; Zeltser, I.; Bitan, G.; Selinger, Z.; Gilon, C., *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 3174-3178. c) Afargan, M.; Janson, E. T.; Gelerman, G.; Rosenfeld, R.; Ziv, O.; Karpov, O.; Wolf, A.; Bracha, M.; Shohat, D.; Liapakis, G.; Gilon, C.; Hoffman, A.; Stephenson, D.; Oberg, K., *Endocrinology*, **2001**, *142*, 477-486. d) Linde, Y.; Ovadia, O.; Safrai, E.; Xiang, Z.; Portillo, F. P.; Shalev, D. E.; Haskell-Luevano, C.; Hoffman, A.; Gilon, C., *Biopolymers*, **2008**, *90*, 671-682.

Alhora, els pèptids homodètics poden classificar-se segons els aminoàcids que intervenen en la formació del cicle. Podem trobar ciclopèptids homodètics “cap-cua” en els que la ciclació es dona per un enllaç amida entre el residu N-terminal i C-terminal. Si el cicle està format per la cadena lateral de un residu i el grup N-terminal o C-terminal parlem de ciclopèptids “cadena lateral-terminal” i si el cicle es forma per connexió de les cadenes laterals de dos residus parlarem d’un pèptid “cadena lateral-cadena lateral”

Hi ha una àmplia varietat de pèptids cíclics en la natura formats per un nombre divers de residus, trobant-se des de tripèptids i tetrapèptids fins a pèptids de deu residus com la ciclosporina A o la gramicidina S. Malgrat tot els més comuns són els pentapèptids i hexapèptids cíclics.

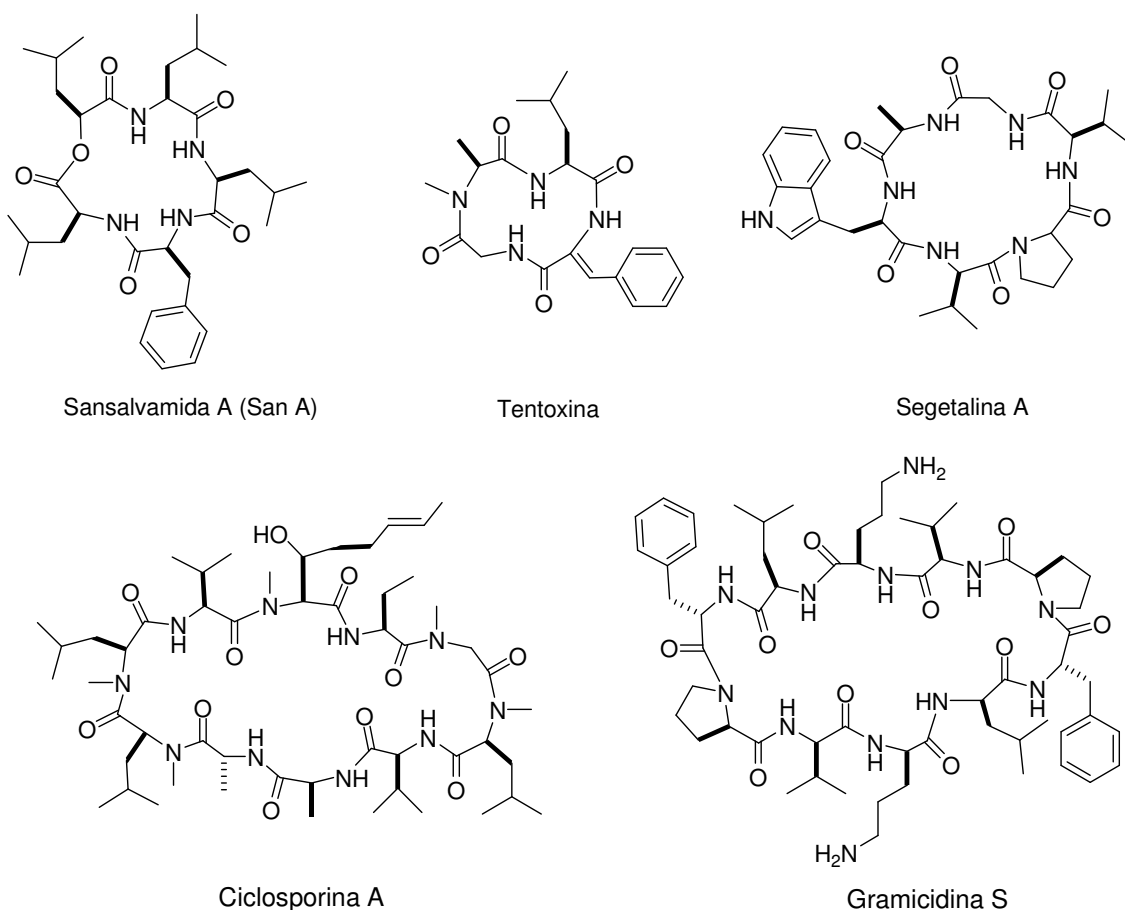


Figura 1.3. Exemples de ciclopèptids aïllats de la natura.

1.3. Propietats conformacionals dels pèptids cíclics

Els ciclopèptids han estat extensament estudiats per tal de conèixer la seva preferència a disposar-se d'una o una altra manera. Un dels motius pot ser per exemple, la presència de ponts d'hidrogen entre les diferents regions de la seqüència.

En el cas dels pèptids cíclics hi ha dos tipus de restriccions conformacionals. En primer lloc trobem una restricció deguda al propi cicle i d'altra banda hi ha les restriccions locals, degudes a la presència de certs residus en la seqüència com per exemple D-aminoàcids, glicina, prolina, etc.³²

Una altra característica que afecta a la conformació dels pèptids es la presència d'enllaços d'hidrogen que poden ser intra o intermol·leculars. En el cas dels enllaços intramol·leculars, aquests poden estabilitzar la conformació de la cadena peptídica degut a la formació de girs- β o γ . En el cas dels enllaços de hidrogen intermol·leculars, aquests poden estabilitzar l'estructura mitjançant interacció amb un medi polar.

De la mateixa manera que en el cas dels pèptids de cadena oberta, la disposició de l'esquelet peptídic tendeix a minimitzar l'impediment estèric entre les cadenes laterals. Això fa que hi hagi preferències per determinades conformacions pel que fa als angles diedres ϕ i ψ .³³ Hi ha una forta tendència a que l'angle diedre ϕ adopti valors de -120° donant lloc a una orientació paral·lela de l'enllaç amida amb el enllaç $C\alpha-H$ de cada residu. L'angle ψ no està tan ben definit. Aquest pot tenir valors de 120° (corresponent a una fulla β) o de -60° (com s'observa en les α -hèlices), essent -60° la conformació predominant ja que, en aquest cas, és la que permet la ciclació dels pèptids al quedar les amides dels L-aminoàcids orientades cap a la mateixa direcció.

En general es coneixen les conformacions dels pèptids cíclics de 3 a 7 residus constituïts únicament per aminoàcids L,³⁴ però en el cas dels peptidomimètics que incorporen en la seqüència aminoàcids de configuració D, mimètics de gir, els peptoids o altres tipus de restricció, la predicció de la conformació del ciclopèptid és complicada.

³² Klose, J.; Ehrlich, A.; Bienert, M., *Lett. Pept. Sci.*, **1998**, *5*, 129-131.

³³ Heller, M.; Sukopp, M.; Tsomaia, N.; John, M.; Mierke, D. F.; Reif, B.; Kessler, H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 13806-13814.

³⁴ a) Kessler, H.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1982**, *21*, 512-523. b)Loiseau, N.; Gomis, J. M.; Santolini, J.; Delaforge, M.; Andre, F., *Biopolymers*, **2003**, *69*, 363-385. c) Mierke, D. F.; Kurz, M.; Kessler, H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 1042-1049. d) Morita, H.; Kayashita, T.; Takeya, K.; Itokawa, H.; Shiro, M., *Tetrahedron* **1995**, *51*, 12539-12548.

Les conformacions dels ciclopèptids venen dictades per la quiralitat del residu que els constitueixen. Com ja s'ha comentat la configuració L o D de la prolina juga un paper important en la conformació del pèptid.²¹ Una altra forma de modular la conformació dels ciclopèptids es la N-metilació.³⁵ La metilació del N de l'enllaç peptídic en primer lloc redueix la diferència energètica entre la configuració cis i trans³⁶ i normalment l'enllaç N-metilat es un enllaç cis.³⁷ A més el fet de estar substituït provoca interaccions esteriques i la pèrdua del H fa que no pugui formar ponts d'hidrogen, la qual cosa influeix en la conformació final del pèptid, fent-ne difícil la seva predicció. Aquests pèptids són d'interès perquè permeten presentar les cadenes laterals (farmacòfor) amb una disposició espacial diferent però sense modificar la seva constitució (connectivitat).

Les tècniques més efectives per determinar la conformació dels ciclopèptids són la difracció de raigs X i les tècniques de ressonància magnètica nuclear (RMN). Degut a que la obtenció de cristalls de pèptids cíclics petits es difícil, els experiments mono i bidimensionals de RMN, juntament amb càlculs de dinàmica molecular (DM) són els experiments més emprats per determinar l'estructura espacial del pèptid.

1.4. Aminolactams com a mimètics de gir beta

El primer a fer servir un compost amb estructura d'aminolactam com una forma de restringir la conformació d'un pèptid fou Freidinger l'any 1980^{2a} quan va demostrar que la introducció d'un anell de lactam en una cadena peptídica induïa la formació de girs β . Posteriorment, en treballs anteriors del nostre equip,³⁸ es va observar la capacitat de l'estructura de lactam per a la inducció de girs de tipus γ (Figura 1.4). Normalment, però aquests lactams s'utilitzen per substituir un dipèptid a la zona central d'un gir β de tipus II'.

³⁵ a) Chatterjee, J.; Mierke, D.; Kessler, H., *Chem. Eur. J.*, **2008**, *14*, 1508-1517. b) Chatterjee, J.; Mierke, D.; Kessler, H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 15164-15172.

³⁶ Kessler, H.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1970**, *9*, 219-235.

³⁷ Kessler, H.; Anders, U.; Schudok, M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 5908-916.

³⁸ Fernández, M. M.; Diez, A.; Rubiralta, M.; Montenegro, E.; Casamitjana, N.; Bogan, M. J.; Giralt, E.; *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 7587-7599.

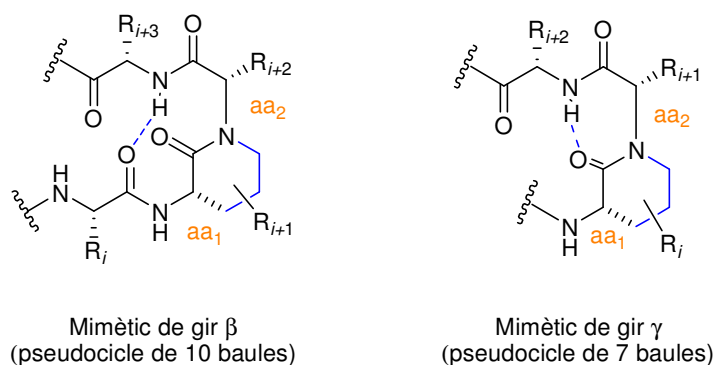


Figura 1.4. Representació de mimètics de girs β i γ .

Amb la introducció de l'anell lactàmic l'angle ω es fixa en la seva conformació trans i es restringeix l'angle ψ_i ja que aquests angles queden dins del lactam. La proximitat de l'anell també provoca una restricció dels angles diedres de la cadena peptídica ϕ_i i ϕ_{i+1} ja que aquests dependran de la conformació de cadira que adopti l'anell de piperidona.³⁹ A més la diferent mida de l'anell modifica la conformació de l'esquelet peptídic de diferent manera (Figura 1.5).

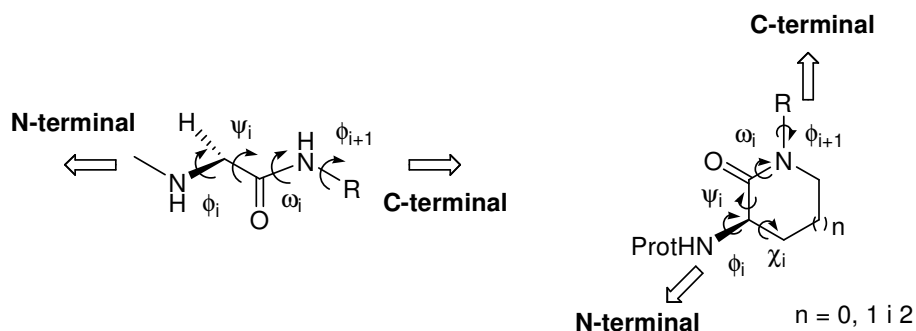


Figura 1.5. Angles de torsió que restringeix l'anell lactàmic.

Per a que aquests lactams siguin útils per la síntesi peptídica, aquests s'han de poder introduir a la cadena peptídica emprant els procediments estàndards, per la qual cosa s'han de protegir amb els grups protectors que s'utilitzen per la síntesi peptídica. A més la seva síntesi no ha de ser complicada i ha de permetre introduir les diferents cadenes laterals dels diferents aminoàcids.

La incorporació en l'esquelet peptídic d'una estructura de "lactam de Freidinger" ha estat àmpliament utilitzada per a una gran varietat de dianes terapèutiques rellevants,⁴⁰ Però aquests anells lactàmics també s'han trobat en les estructures de

³⁹ Freidinger, R. M., *J. Med. Chem.*, **2003**, 46, 5553-5566.

⁴⁰ a) Samanen, J.; Cash, T.; Narinday, D.; Brandeis, E.; Adams, W. Jr.; Weideman, H.; Yellin, T., *J. Med. Chem.*, **1991**, 34, 3036-3043. b) Thorsett, E. D.; Harris, E. E.; Aster, S. D.; Peterson, E. R.; Snyder, J. P.;

diferents productes naturals. Es molt conegut el cas dels β -lactams que es troben presents en antibiòtics, com per exemple la Penicil·lina G. Més recentment s'han trobat casos de γ -lactams en l'Argadina⁴¹ (producte aïllat d'un fong) i δ -lactams en un producte aïllat de la llebre marina *Dolabella auricularia* anomenat Dolastatina⁴².

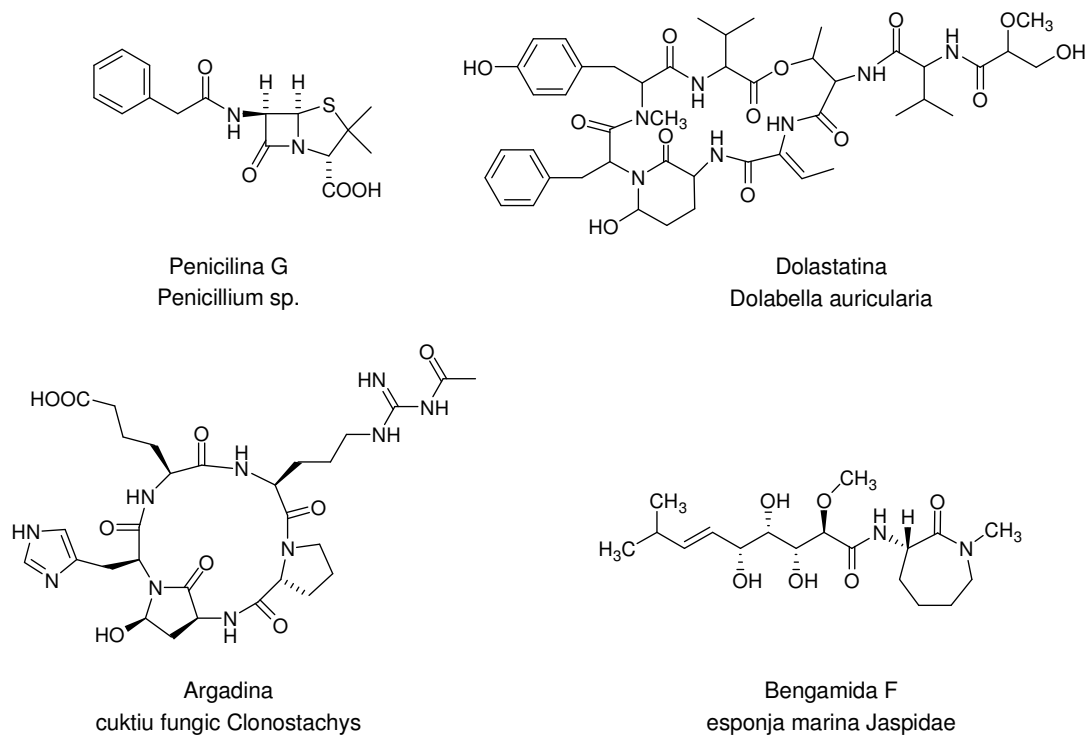


Figura 1.6. Exemples de productes naturals que contenen lactams

El nostre grup compta amb una gran experiència en la síntesi de lactams de Freidinger de 6 membres i en l'aplicació d'aquests en l'estructura de compostos d'importància biològica. Actualment disposem d'una col·lecció de diversos lactams (vegeu figura 1.7) que hem emprat com a "scaffolds", o esquelets de suport de grups funcionals, com a inductors d'estructures secundàries de tipus gir β i γ , o bé com a substituïts de dipèptids en estructures més complexes.

Springer, J. P.; Hirshfield, J.; Tristram, E. W.; Patchett, A. A.; Ulm, E. H.; Vassil, T. C., *J. Med. Chem.*, **1986**, *29*, 251-260. c) Semple, J. E.; Rowley, D. C.; Brunck, T. K.; Ha-Uong, T.; Minami, N. K.; Owens, T. D.; Tamura, S. Y.; Goldman, E. A.; Siev, D. V.; Ardecky, R. J.; Carpenter, S. H.; Ge, Y.; Richard, B. M.; Nolan, T. G.; Hakanson, K.; Tulinsky, A.; Nutt, R. F.; Ripka, W. C., *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 4531-4536. d) Forns, P.; Piró, J.; Cuevas, C.; García, M.; Rubiralta, M.; Giralt, E.; Diez, A., *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 5825-5833.

⁴¹ a) Arai, N.; Shiomi, K.; Yamaguchi, Y.; Masuma, R.; Iwai, Y.; Turberg, A.; Koelbl, H.; Omura, S., *Chem. Pharm. Bull.*, 2000, *48*, 1442-1446.

⁴² Pettit, G. R.; Kamano, Y.; Herald, C. L.; Dufresne, C.; Cerny, R. L.; Herald, D. L.; Schmidt, J. M.; Kizu, H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 5015-5017.

Per exemple, el lactam **1** s'ha emprat en la síntesi d'una quimioteca d'inhibidors de triptasa d'estructura dimèrica,⁴³ i el lactam de tipus **10** es va fer servir per obtenir el derivats restringits de Met **11** que es van assajar com a inhibidors del transport hepàtic del glutatió (GSH).⁴⁴

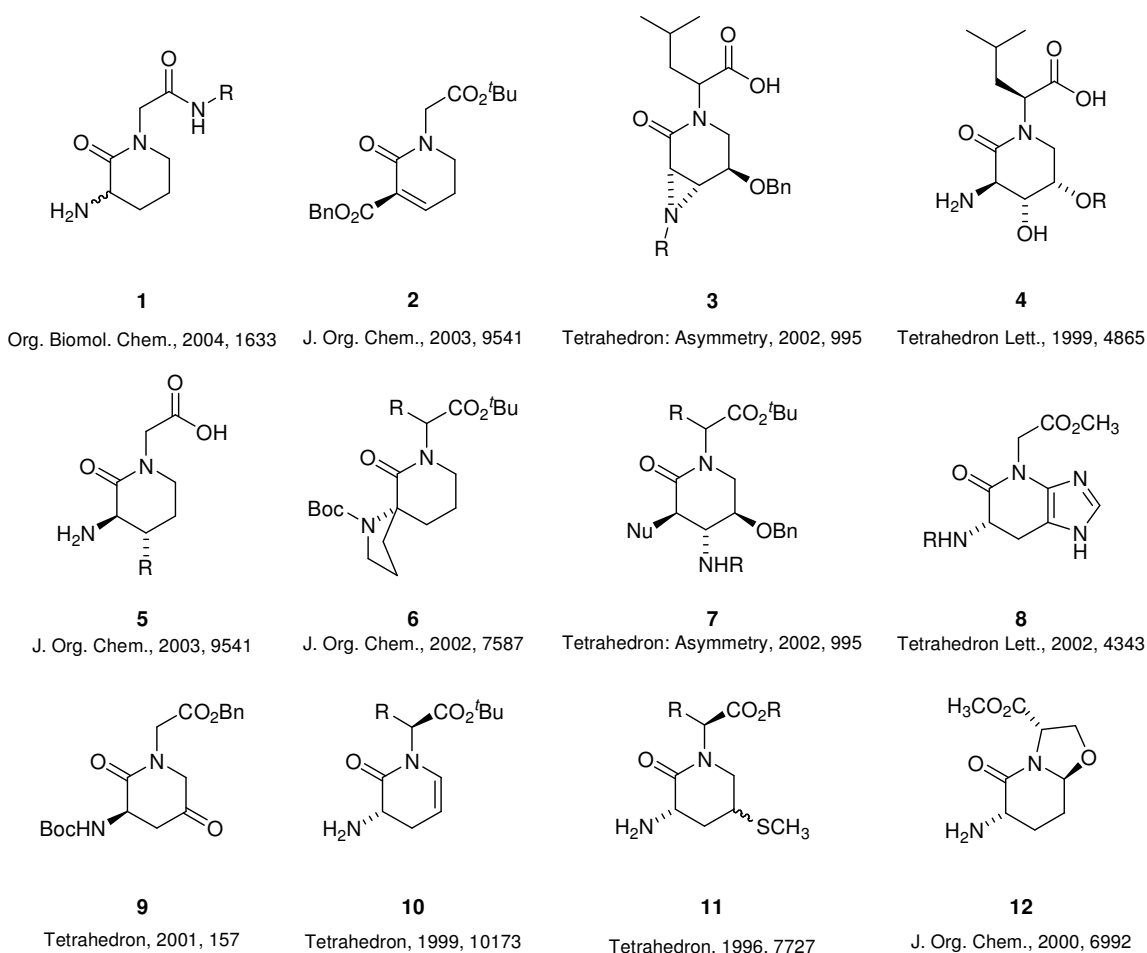


Figura 1.7. Estructures dels lactams de que disposa el grup.

El lactam de tipus **2** s'ha emprat principalment per a la funcionalització de la posició 4 de l'anell mitjançant addicions conjugades,⁴⁵ i per tant l'obtenció de lactams de tipus **5** (R₄=indole, derivats de Trp). La funcionalització de la posició 5 es va dur a terme aplicant la reactivitat de compostos organozínics, i es va obtenir la 3-amino-5-hidrox-

⁴³ García, M.; del Rio, X.; Silvestre, S.; Rubiralta, M.; Segarra, V.; Loyza, E.; Diez, A., Org. Biol. Chem., 2004, 2, 1633-1642.

⁴⁴ a) Estiarte, M. A.; De Souza, M. V. N.; del Rio, X.; Dodd, R. H.; Rubiralta, M.; Diez, A., Tetrahedron 1999, 55, 10173-10186. b) Colell, A.; García-Ruiz, C.; Rodríguez, R.; Estiarte, M. A.; Diez, A.; Kaplowitz, N.; Rubiralta, M.; Fernández-Checa, J. C., Hepatology, Part 2 Suppl. S, 1996, 24, 51.

⁴⁵ Ecija, M.; Diez, A.; Rubiralta, M.; Casamitjana, N.; Kogan, M. J.; Giral, E., J. Org. Chem., 2003, 68, 9541-9553.

2-piperidona que presentava una activitat com a inhibidor de l'enzim convertidor d'angiotensina.⁴⁶ Un dels lactams que ha tingut més aplicacions fins al present és el compost polihidroxilat **4**.⁴⁷ Entre d'altres es va emprar per la obtenció de beta-aminoàcids de conformació restringida de tipus **7**.⁴⁸

Finalment, també hem desenvolupat la síntesi i algunes aplicacions de derivats bicíclics com els compostos **6**,³⁸ **8**⁴⁹ i **12**.⁵⁰ Aquí cal destacar que les oxazolopiperidones són inductors de girs β de tipus II', mentre que els espirolactams van mostrar ser inductors de girs de tipus gamma.

Més recentment, ens hem proposat com a nou repte l'aplicació d'aquestes estructures lactàmiques a la síntesi de quimiotèques pseudopeptídiques d'activitat biològica determinada. Amb aquesta finalitat modifiquem pèptids naturals d'activitat biològica coneguda substituint alguns dels aminoàcids per anàlegs sintètics de conformació restringida.

Aquest nou repte implica una etapa prèvia de cerca dels pèptids nadius que ens interessin, un disseny dels derivats, la síntesi dels lactams amb la funcionalització necessària, la síntesi de les quimiotèques, i els assaigs biològics dels compostos.

Fa uns anys, es van descriure derivats sintètics de la hormona humana α -MSH (melanotropina o hormona estimulant dels melanòcits). L' α -MSH és una hormona que segrega la hipòfisi (glàndula pituïtària), i per tant és una del grup d'hormones que regulen el funcionament de l'organisme humà.

Donada la importància d'aquesta hormona en la regulació de moltes de les funcions del nostre organisme, ens hem decidit a estudiar-la. En el present capítol es fa una introducció del sistema melanocortínic, s'expliquen els precedents i es recullen els darrers avanços en aquest camp, per després plantejar els objectius que ens vam plantejar en aquest treball.

⁴⁶ Estiarte, M. A.; Diez, A.; Rubiralta, M.; Jackson, R. F. W., *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 157-161.

⁴⁷ Piró, J.; Rubiralta, M.; Giralt, E.; Diez, A., *Tetrahedron Lett.*, **2001**, *42*, 871-873.

⁴⁸ Piró, J.; Forns, P.; Blanchet, J.; Bonin, M.; Micouin, L.; Diez, A., *Tetrahedron: Asymm.*, **2002**, *13*, 995-1004.

⁴⁹ Escolano, C.; Kogan, M. J.; Rubiralta, M.; Giralt, E.; Diez, A., *Magnetic Resonance in Chemistry*, **2003**, *41*, 219-222.

⁵⁰ Estiarte, M. A., Rubiralta, M.; Diez, A.; Thormann, M.; Giralt, E., *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*, 6992-6999.

1.5. El sistema melanocortínic

El sistema melanocortínic inclou les hormones peptídiques melanocortíniques (α -MSH) i la corticotropina (hormona estimulant adreno-cortical, ACTH). Fins fa uns anys, els pèptids melanocortínics (α , β i γ -MSH) eren d'interès només en un àmbit reduït de l'endocrinologia però el descobriment, en aquesta darrera dècada, dels diferents tipus de receptors melanocortínics, ha fet que l'interès per aquest tipus de pèptids s'estengui a la indústria farmacèutica degut a les seves possibles aplicacions clíniques.

Els pèptids melanocortínics estan evolutivament relacionats i comparteixen una seqüència central tetrapeptídica His-Phe-Arg-Trp que constitueix el lloc actiu dels pèptids. També tenen una certa homologia estructural entre ells en els seus extrems N- i C-terminal (Fig.1.8).

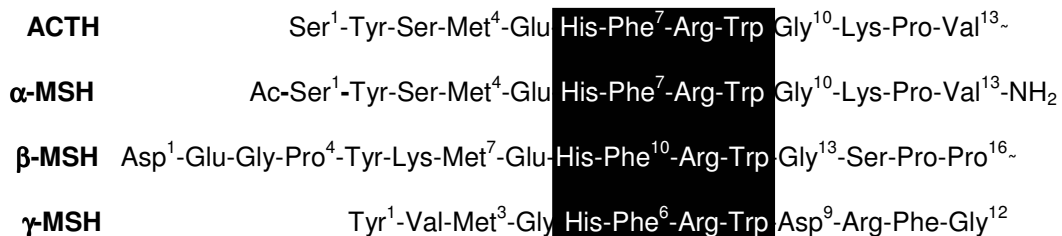


Figura 1.8. Homologia estructural dels pèptids melanocortínics amb la seva zona central idèntica.

Tots aquests pèptids, deriven d'un llarg precursor proteic anomenat proopiomelanocortina (POMC). Aquest precursor s'ha trobat en diferents localitzacions. Depenent del diferent perfil enzimàtic de la cèl·lula, aquesta prohormona serà processada per donar lloc al pèptid específic per cada tipus de cèl·lula (Fig. 1.9). Per exemple, α -MSH en cèl·lules melanotròfiques i ACTH per les corticotrofes de la hipòfisi).

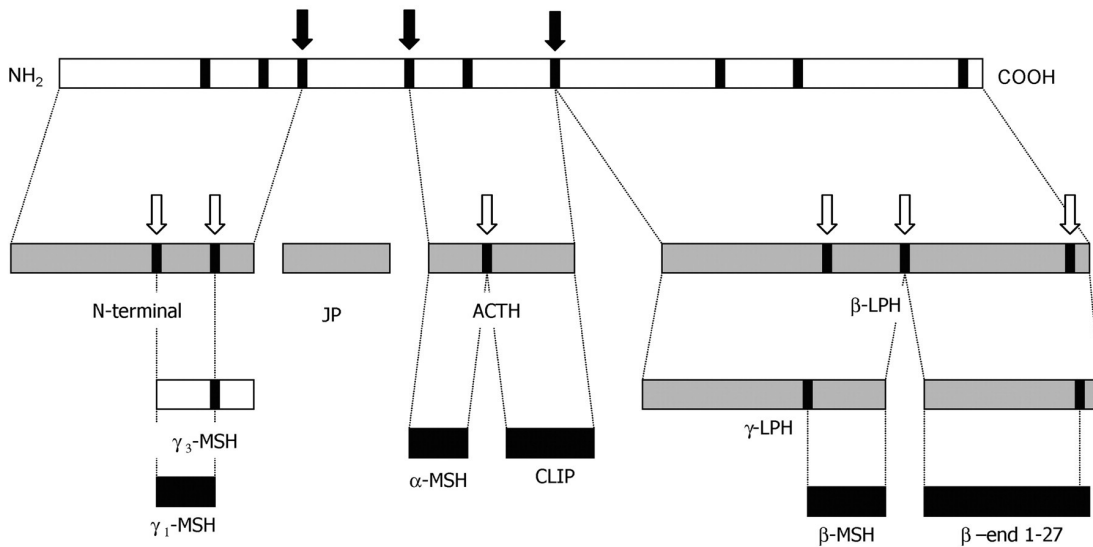


Figura 1.9. Processat de la pre-hormona POMC específic per cada teixit .

La hormona α -melanocit-estimulant (α -MSH) que deriva de la proteïna precursora proopiomelanocortina, és un tridecapèptid secretat per la glàndula pituïtària. Tot i que l' α -MSH exhibeix diferents efectes biològics tant a nivell central com perifèric, l'hormona és particularment coneguda pel seu paper en la regulació de la pigmentació cutània en molts vertebrats. L' α -MSH és sintetitzada i alliberada per les cèl·lules melanotrófiques de la hipòfisi i actua com a hormona sistèmica per estimular la melanogènesi (síntesi de melanina) als melanòcits de l'epidermis de molts animals (Fig. 1.10). Es creu que en humans, l' α -MSH i les melanotropines derivades són sintetitzades pels queratinòcits de l'epidermis i per una acció paracrina als melanòcits, estimulen la melanogènesi per tal de produir un augment de la pigmentació cutània.

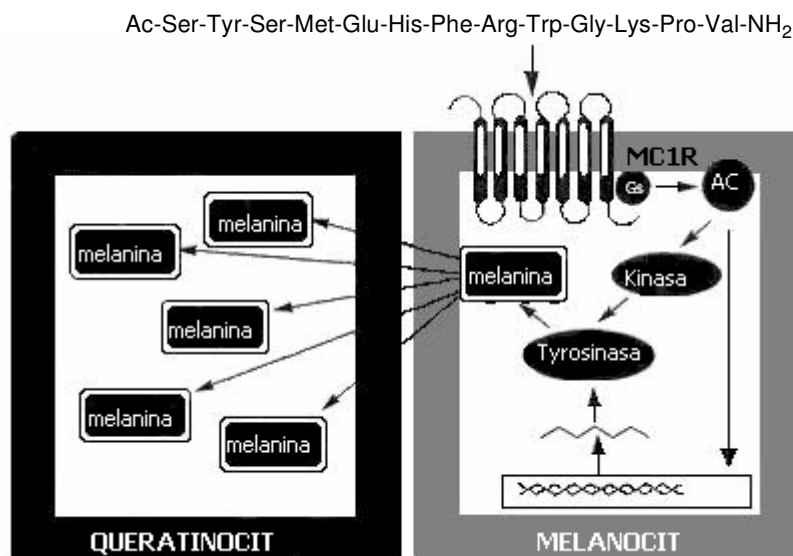


Figura 1.10. Alliberament de la melanina per part dels melanocits als queratinocits veïns.

Al cervell, la localització de la pre-hormona POMC a les neurones suggereix que un o més pèptids melanocortínics puguin tenir funcions de neurohormona o neurotransmissor. En aquest sentit, els pèptids melanocortínics han mostrat propietats d'augment de les habilitats cognitives, retenció de la memòria, inducció de sacietat, comportament sexual i altres activitats d el SNC.

Com la majoria d'hormones peptídiques lineals, l' α -MSH té una curta durada d'acció degut a la seva ràpida degradació per enzims proteolítics. Un dels objectius és, per tant, el disseny d'anàlegs d' α -MSH amb elevada potència i una durada d'acció perllongada.

Durant els darrers 25 anys s'han sintetitzat i estudiat biològicament nombrosos anàlegs de l' α -MSH ⁵¹. Alguns d'aquests mostren una superpotència i activitat perllongada pel que fa a les propietats melanogèniques, és a dir, donen lloc a un enfosquiment de la pell. A més, però, també presenten propietats interessants com la resistència a la degradació produïda per enzims proteolítics. Dos d'aquests anàlegs, **MT1** i **MT2**, han estat extensament estudiats i actualment es troben en assaigs de fase clínica II. En la taula I es recullen les possibles aplicacions dels dos anàlegs agonistes superpotents de l' α -MSH, el melanotan-1 (**MT1**) i el melanotan-2 (**MT2**).

Melanogènesi	MT1 i MT2 per estimular la melanogènesi cutània i desenvolupar nous fàrmacs fotoprotectors o cosmètics.
Diagnòstic de melanoma	Pèptids basats en MT conjugats amb marcadors fluorescents per us en la detecció i localització del melanoma.
Quimioteràpia per melanoma	Conjugats de pèptids MT amb agents anticancerosos per alliberament específic del fàrmac en melanoma
Desordres alimentaris	Pèptids MT o agonistes/antagonistes peptidomimètics per ús en tractament d'obesitat/anorèxia

⁵¹ Hruby, V. J.; Wilkes, B. C.; Hadley, M. E.; Al-Obeidi, R.; Sawyer, T. K.; Staples, D. J.; de Vaux, A. E.; Dym, O.; Castrucci, A. M. L.; Hintz, M. E.; Riehm, J. P.; Rao, R., *J. Med. Chem.*, **1987**, *30*, 2126-2130.

Inflamació	Pèptids MT o agonistes peptidomimètics per tractament d'inflamació cutània.
-------------------	---

Disfunció erèctil	Pèptids MT o peptidomimètics agonistes per ús en la diagnosi i/o tractament de la disfunció erèctil.
--------------------------	--

Taula III. Possibles usos clínics del melanotan-1 (MT1) i del melanotan-2 (MT2).

1.5.1. Receptors melanocortínic

Els pèptids melanocortínic realitzen la seva acció a través de receptors MCRs que són específics per certs teixits. Actualment es coneixen 5 tipus de receptors humans diferents. Tots ells s'han clonat, expressat i caracteritzat bioquímicament. Són receptors acoblats a proteïna G, caracteritzats pels seus 7 dominis transmembrana, α -hèlix i "loop" intracel·lulars (Fig. 1.11).

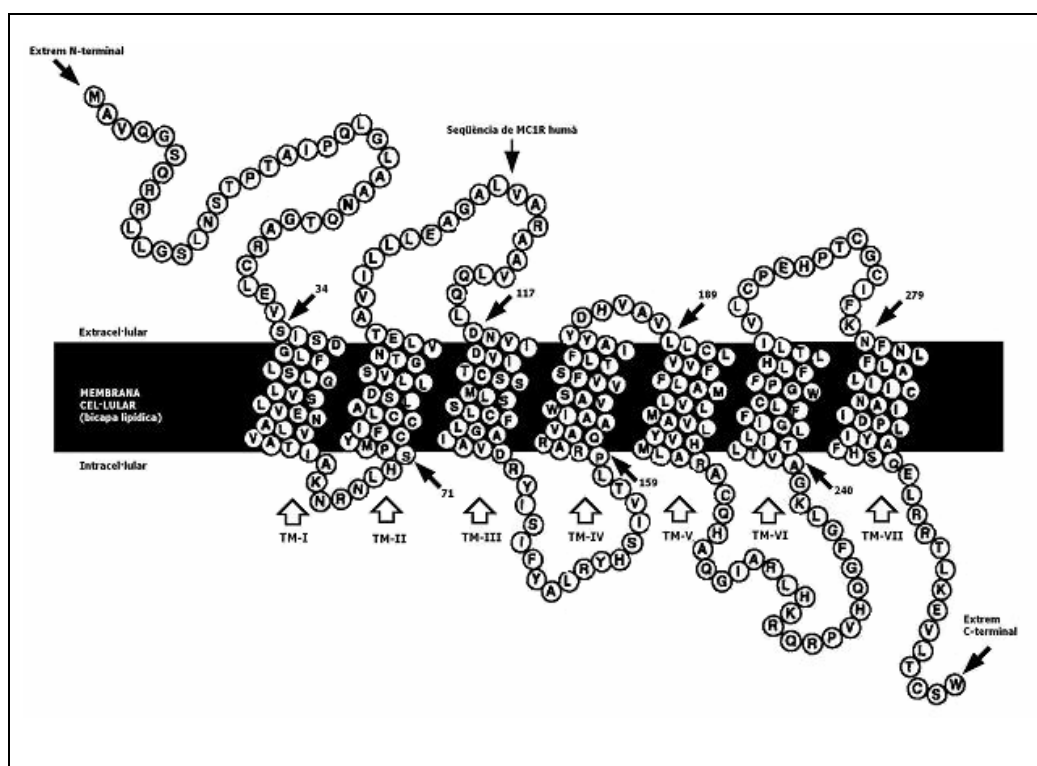


Figura 1.11. Receptor melanocortínic associat a proteïna G.

El receptor de melanocortina MC1R es localitza als melanòcits de l'epidermis i als seus progenitors malignes, les cèl·lules de melanoma.⁵² Els receptors MC2R són bàsicament sensibles a ACTH i es troben a les cèl·lules adrenocorticals que

⁵² Loir, B.; Perez Sanchez, C.; Ghanem, G.; Lozano, J. A.; Garcia-Borron, J. C.; Jimenez-Cervantes, C., *Cell. Mol. Biol.*, **1999**, 45, 1083-1092.

produeixen cortisol. Els receptors de tipus MC3R i MC4R es localitzen al cervell. La majoria dels MC3R els trobem en zones de l'hipotàlem i el sistema límbic (nucli arquejat, preòptic, hipotalàmic ventromedial, etc.) tot i que també es poden trobar a l'hipocamp, tàlem i tronc de l'encèfal i fins i tot en alguns teixits perifèrics com la placenta, cor, estómac, pàncreas, testicles i ovaris, teixit muscular i ronyó.⁵³ Els receptors MC4R es troben àmpliament distribuïts per gairebé totes les regions cerebrals, incloent-hi l'escorça cerebral, l'hipotàlem, el tàlem, el tronc encefàlic i la medulla espinal,⁵⁴ mentre que el receptor MC5R està àmpliament distribuït per l'organisme (ronyons, pulmons, nodes limfàtics, leucòcits, glàndules mamàries, ovaris, testicles, etc).⁵⁵ (Veure Taula II)

Receptor	Localització	Lligands primaris	Funció
MC1R	α -MSH	α -MSH	Pigmentació
MC2R	ACTH	ACTH	Esteroidogènesi
MC3R	α -MSH, γ -MSH	α -MSH, γ -MSH	Homeòstasi energètica
MC4R	α -MSH	α -MSH	Homeòstasi energètica, activitat erèctil i regulació de l'estat d'ànim
MC5R	α -MSH, ACTH	α -MSH, ACTH	Secreció de glàndules sebàcies

Taula IV. Receptors melanocortínic, lligands i funcions observades.

Mentre que l'activitat fisiològica de MC1R i MC2R està clarament definida, el paper fisiològic de les melanocortines que interaccionen amb els receptors MC3R, MC4R i MC5R es manté encara sense definir. Tots aquests receptors pertanyen a la superfamília dels receptors acoblats a proteïna G i estan lligats a la formació d'AMPc degut a l'activació de l'adenilat ciclase per part d'una proteïna Gs.

1.5.2. Estudis de relacions estructura-activitat de l' α -MSH

Per estudis de relacions estructura-activitat de més de mil anàlegs de l'hormona α -MSH, el grup de Victor Hruby,⁵¹ va determinar el fragment mínim del pèptid natiu

⁵³ Gantz, I.; Konda, Y.; Tashiro, T.; Shimoto, Y.; Miwa, H.; Munzert, G.; Watson, S. J.; Del Valle, J.; Yamada, T., *J. Biol. Chem.*, **1993**, *268*, 8246-8250.

⁵⁴ Cowley, M. A.; Pronchuk, N.; Fan, W.; Dinulescu, D. M.; Colmers, W. F.; Cone, R. D., *Neuron*, **1999**, *24*, 155-163.

⁵⁵ Chhajlani, V., *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **1996**, *38*, 73-80.

necessari per l'activitat biològica. Concretament va realitzar els bioassaigs clàssics sobre pell de granota i de llangardaix i va determinar que el mínim fragment requerit de l' α -MSH per la seva activitat agonista era la seqüència tetrapeptídica, His⁶-Phe⁷-Arg⁸-Trp⁹ com va demostrar al sintetitzar l'anàleg Ac-His-Phe-Arg-Trp-NH₂. Amb aquest assaig també va poder determinar quina era la contribució de cadascun dels aminoàcids de la seqüència tridecapeptídica de l' α -MSH en l'activitat biològica¹. Hruby també va aportar evidències en contra de la hipòtesi de Eberle i Schwyzer⁵⁶ que suggerien un segon lloc actiu centrat en la seqüència propera a l'extrem C-terminal Ac-Lys-Pro-Val-NH₂, al sintetitzar aquest tripèptid i comprovar que no era actiu, ni tant sols a concentracions tan elevades com 0'2 mM.

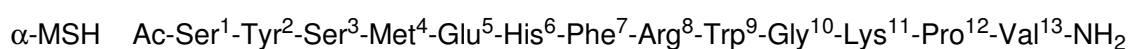


Figura 1.12. Seqüència mínima d' α -MSH amb activitat melanotròpica.

Mitjançant la síntesi d'un anàleg macrocíclic d' α -MSH, c[Cys⁴,Cys¹⁰]- α -MSH, que resultà ser un agonista molt potent en l'assaig realitzat en pell de granota⁵⁷, es va observar que en la "conformació bioactiva" de l' α -MSH, podria existir una conformació de gir de tipus revers en la seva seqüència activa de His-Phe-Arg-Trp. Amb aquesta hipòtesi es van dur a terme un gran nombre d'estudis de relació estructura-conformació-activitat amb anàlegs lineals i cíclics de l' α -MSH per tal d'explorar les propietats tridimensionals de la hormona α -MSH en relació amb la seva unió amb el receptor, és a dir, el reconeixement molecular, i l'activació d'aquest (transducció del senyal). Aquests estudis es van dur a terme tant en receptors d' α -MSH de melanocits de granota i llangardaix,⁵⁸ cèl·lules de melanoma humà i de ratolí,⁵⁹ així com també més recentment en receptors humans clonats de MC1R.⁶⁰

⁵⁶ Eberle, A.; Schwyzer, R., *Helv. Chim. Acta*, **1975**, *58*, 1528-1535.

⁵⁷ Hruby, V. J.; Wilkes, B. C.; Cody, W. L.; Sawyer, T. K.; Hadley, M. E., *Pep. Protein Rev.* **1984**, *3*, 1-64.

⁵⁸ Al-Obeidi, F.; Hruby, V. J.; Pettitt, B. M.; Hadley, M. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 3413-3416.

⁵⁹ a) Abdel-Malek, Z. A.; Kreutzfeld, K. L.; Marwan, M. M.; Hadley, M. E.; Hruby, V. J.; Wilkes, B. C., *Cancer Res.*, **1985**, *45*, 4735-4740. b) Hadley, M. E.; Abdel-Malek, Z. A.; Marwan, M. M.; Kreutzfeld, K. L.; Hruby, V. J., *Endocr. Res.* **1985**, *11*, 157-170.

⁶⁰ Haskell-Luevano, C.; Miwa, H.; Dickinson, C.; Hadley, M. E.; Hruby, V. J.; Yamada, T.; Gantz, I., *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 432-435.

1.5.3. Estudis d'epimerització de l' α -MSH i disseny de l'MT1

En aquest afany per conèixer les característiques estructurals i conformacionals de l'hormona endògena α -MSH que permetien la seva unió amb els seus receptors i donar lloc a una activitat fisiològica concreta, es van sintetitzar un gran nombre d'anàlegs d'aquesta. Una de les diferències que presentaven la majoria d'anàlegs d' α -MSH és la presència de la D-Phe en la seva seqüència activa, en lloc de la Phe de configuració oposada. Aquesta substitució resulta crítica per la obtenció d'anàlegs amb activitat superagonista sostinguda, i fou el resultat de nombrosos estudis en els que es duia a terme l'epimerització de l' α -MSH i d'un anàleg d'aquesta, la [Nle⁴] α -MSH per tractament tèrmic alcalí.⁶¹ El resultat d'aquest tractament fou un augment en l'enfosquiment de la pell quan es va assajar amb granota. Per tant, s'intuïa que la epimerització conduïa a un augment de les propietats melanotròpiques. Utilitzant mètodes de CG per comprovar el grau d'epimerització (conversió de L-aminoàcids a la seva forma D) s'observà que la Phe-7 s'epimeritzava molt més del que s'esperava. Aquest fet explica el perquè de la substitució de Phe per l'anàleg restringit D-Phe.

Un dels anàlegs superagonistes de l' α -MSH que es va sintetitzar va ser el tridecapèptid [Nle⁴, D-Phe⁷] α -MSH al qual es va donar el nom de Melanotan-1⁶² (**MT1**) que va mostrar una activitat biològica sostinguda. La seva estructura mantenia la seqüència activa central, His-D-Phe-Arg-Trp que adopta una conformació de gir invers quan s'uneix al receptor MC1R.

La síntesi d'**MT1** va demostrar que la substitució de Phe per D-Phe li conferia a la molècula un increment en la potència i una activitat melanotròpica sostinguda com es va demostrar en diferents assaigs biològics que es van realitzar.

1.5.4. Estudis sobre **MT1**: mínima seqüència activa

Un cop trobat aquest agonista melanocortínic d'acció sostinguda es van dur a terme estudis d'estructura-activitat modificant principalment la seqüència activa de l'**MT1**. L'equip de Victor Hruby va dur a terme estudis per trobar la mínima seqüència activa en els anàlegs superpotents de α -MSH.⁶³ Prenent l'**MT1** com a molècula de referència

⁶¹ Bool, A. M.; Gray, G. H.; Hadley, M. E.; Heward, C. B.; Hruby, V. J.; Sawyer, T. K.; Yang, Y. C., *J. Endocrinology*, **1981**, 88(1) 57-65.

⁶² Sawyer, T. K.; Sanfilippo, P. J.; Hruby, V. J.; Engel, M. H.; Heward, C. B.; Burnett, J. B.; Hadley, M.E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1980**, 77, 5754-5758.

⁶³ Haskell-Luevano, C.; Sawyer, T. K.; Hendrata, S.; North, C.; Panahinia, L.; Stum, M.; Staples, D. J.; De Lauro Castrucci, A. M.; Hadley, M. E.; Hruby, V. J., *Peptides* **1996**, 17, 995-1002.

volien cercar fragments simplificats estructuralment que tinguessin activitat agonista així com també identificar “leads” que tinguessin una activitat melanotrópica perllongada. Per això, van fer el mateix que havien fet anteriorment en el cas de l' α -MSH,⁵¹ es a dir, van estudiar l'activitat de diferents seccions del pèptid en pell de granota i d'aquesta manera van identificar el tripèptid Ac-D-Phe-Arg-Trp-NH₂ com el mínim fragment amb activitat agonista i d'acció perllongada. Així, van demostrar que en l'**MT1** la His⁶ no és necessària per l'activitat biològica.

A continuació, i per tal d'explorar aquest anàleg tripeptídic, es van proposar fer series d'anàlegs modificant la seva estereoquímica i les seves propietats estructurals. D'aquests anàlegs, dos van incrementar l'activitat respecte al tripèptid de referència. El compost resultant del canvi de l'Arg⁸ per la D-Arg⁸ (Ac-D-Phe⁷-D-Arg⁸-Trp⁹-NH₂) augmentava la potència però sense activitat perllongada, però el que presentà una potència més gran va ser el tripèptid en el que s'havia modificat el Trp⁹ pel seu anàleg D-Trp⁹ (Ac-D-Phe⁷-Arg⁸-D-Trp⁹-NH₂), que a més tenia una acció perllongada. Sorprenentment, el compost on tots els residus tenien una configuració D va resultar inactiu.

Per tant es va voler estudiar la influència de cada residu d'aminoàcid en el tripèptid amb major potència, es a dir, que van realitzar modificacions en Ac-D-Phe-Arg-D-Trp.

En el cas de la D-Phe⁷, totes les substitucions (per Gly o Ala) van resultar en anàlegs sense activitat. A més tots els tripèptids amb L-Phe eren inactius.

Per determinar el paper específic de la Arg⁸, van variar aquesta estructuralment. Modificacions d'aquesta per Lys conduïen a una disminució de la potència i a més la seva activitat no era perllongada. Si la substitució que es feia era per Ala o Gly, l'anàleg resultant era actiu però sense activitat biològica residual i si aquesta Arg⁸ es substituïa per una Gln el resultat era una pèrdua en l'activitat.

Pel que fa a la His⁶, com que se sap que aquesta sol augmentar la potència, es va afegir als tripèptids anteriors, per tal d'explorar l'efecte sinèrgic. En alguns casos en que els tripèptids eren inactius, l'addició de la His⁶ va fer que els tetrapèptids resultants tinguessin activitat, com és el cas dels tripèptids amb L-Phe⁷, o aquells amb tots els residus amb configuració D. En el cas de compostos tripeptídics amb molt baixa potència, aquesta es veia augmentada amb l'addició d'His⁶, tal com passa en els tripèptids en els que s'havia substituït l'Arg⁸ per Lys⁸, Ala⁸ o Gly⁸. Sorprenentment, en el cas dels tetrapèptids, la substitució del D-Trp⁹ per Trp⁹ no va comportar un augment de la seva potència, la qual cosa és contrària als estudis realitzats amb els tripèptids

on el D-Trp augmentava la potència. D'aquests tetrapèptids que inclouen la His⁶, només un resultà tenir activitat perllongada, l'Ac-His⁶-D-Phe⁷-D-Arg⁸-D-Trp⁹-NH₂.

Aquests resultats suggerien la possibilitat de l'existència de diferències en el mode d'unió dels pèptids de 3 residus respecte als tetrapèptids. A més també sembla que els residus aromàtics dintre d'aquesta "seqüència missatge" són la clau per un farmacòfor agonista mínimament actiu.

Amb diverses modificacions sobre aquest anàleg **MT1**, també es van trobar antagonistes d' α -MSH. Un dels millors d'aquests antagonistes va resultar de la substitució de la His⁶ i l' Arg⁸ per Trp⁶ i Nle⁸ respectivament en un anàleg d'**MT1**. De totes formes, no hi havia cap generalitat estructural que pogués explicar el perquè eren antagonistes, ja que altres compostos molt propers estructuralment van resultar ser agonistes.

Aquests antagonistes han estat utilitzats com a eines de diagnòstic o agents transportadors de fàrmacs a cèl·lules de melanoma degut a la seva unió amb receptors MC1R⁶⁴.

1.5.5. Disseny de l'**MT2**

El disseny de l'**MT2**⁶⁵ es basava en la creació d'un anàleg macrocíclic de Ac-[Nle⁴, D-Phe⁷] α -MSH(4-10)-NH₂ en el qual s'hi afegien 2 nous aminoàcids flanquejant la seqüència activa i que permetien formar el cicle lactàmic a través de les seves cadenes laterals, l'Asp⁵ i la Lys¹⁰. En aquest anàleg cíclic s'ha demostrat tant per espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear com per modelatge molecular assistit per ordinador la presència proposada d'una conformació de gir revers en la seqüència activa (Figura 1.13).

⁶⁴ Hadley, M. A.; Hruby, V. J.; Jiang, J.; Sharma, S. D.; Fink, J. L.; Haskell-Luevano, C.; Bentley, D. L.; Al-Obeidi, F.; Sawyer, T. K., *Pigment Cell Res.*, **1996**, *9*, 213-234.

⁶⁵ Al-Obeidi, F.; Castrucci, A. M. L.; Hadley, M. E.; Hruby, V. J., *J. Med. Chem.*, **1989**, *32*, 2555-2561.

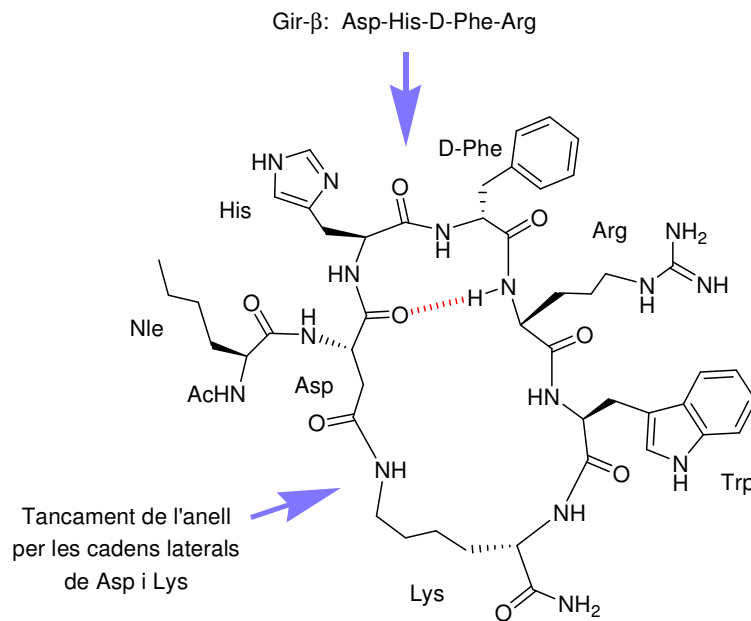


Figura 1.13. Característiques estructurals d'**MT2**.

Per estudis de relacions estructura-activitat de l' α -MSH previs, es va suggerir l'existència d'un pont salí entre les cadenes laterals del Glu⁵ (COOH) i la Lys¹¹ (ϵ -NH₂) de l' α -MSH en la seva conformació bioactiva. Malgrat això, no es van obtenir resultats concloents ni per càlculs teòrics,⁶⁶ ni mitjançant la síntesi d'anàlegs d'aquesta hormona. Però mitjançant estudis de dinàmica molecular posteriors es va poder suggerir que el canvi de Gly¹⁰ per Lys¹⁰ podria provocar amb una alta probabilitat una interacció intramolecular energèticament favorable entre la cadena lateral del Glu⁵ i de Lys¹⁰.

Per constatar aquesta hipòtesi, es van sintetitzar un gran nombre d'anàlegs lineals derivats de l'**MT1**, que contenen únicament 7 residus d'aminoàcid, amb una estructura [Nle⁴,Xxx⁵,Yyy⁷,Zzz¹⁰] α -MSH₄₋₁₀-NH₂, on Xxx=Asp o Glu; Yyy=Phe o D-Phe; i Zzz=aminoàcid bàsic (Lys, Orn, Dbp, Dpr) (Figura 1.11). Aquests derivats van mostrar ser unes 10 vegades més potents que l' α -MSH.⁶⁷

⁶⁶ Nikiforovich, G. V.; Shenderovich, M. E.; Chipens, G. I., *FEBS Lett.*, **1981**, 126, 180-182.

⁶⁷ Al-Obeidi, F.; Hruby, V. J.; Castrucci, A. M. L.; Hadley, M. E., *J. Med. Chem.*, **1989**, 32, 174-179.

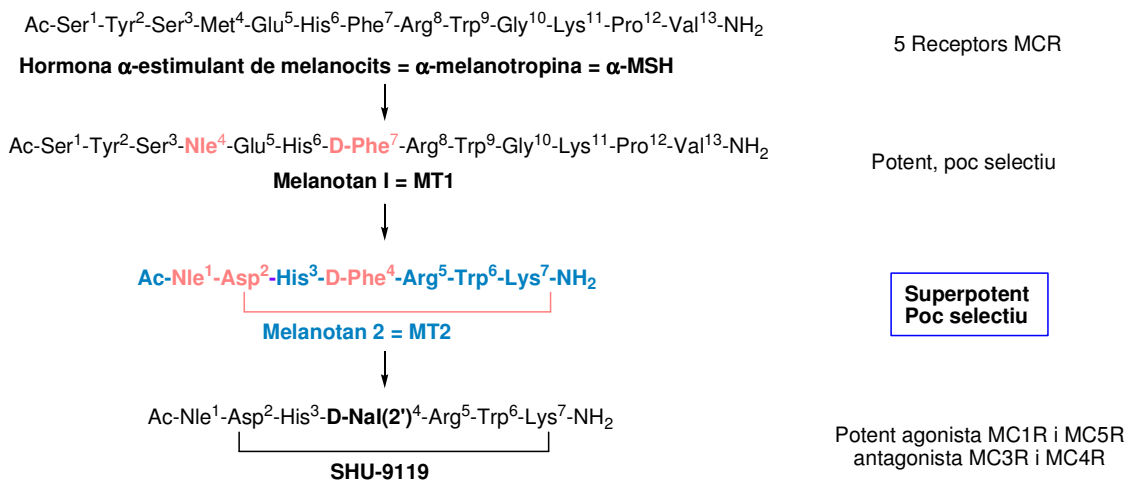


Figura 1.14. Disseny de l'**MT2** a partir de l' α -MSH i el seu predecessor **MT1**.

A més de la síntesi dels compostos lineals també van dur a terme la síntesi dels corresponents anàlegs lactàmics cíclics, per obtenir estructures cícliques que variaven en la mida de l'anell d'entre 20 i 24 membres. Cal destacar que els anells de 23 membres van ser els que van tenir una potència més elevada,⁶⁵ entre ells l'**MT2**, que amb només 7 aminoàcids (6 menys que α -MSH) posseeix entre 90-100 cops més potència que la hormona de referència, i que a més té una activitat perllongada.

1.5.6. Anàlegs de l'**MT2**

Tot i el disseny d'aquest nou derivat de l' α -MSH, no es va lograr augmentar la selectivitat per cap dels receptors. En un esforç per optimitzar l'activitat biològica i la selectivitat per un determinat tipus de receptor, es van dissenyar diversos anàlegs a partir de l'**MT2**.^{68,69,70} Aquestes modificacions inclouen canvis en el tamany de l'anell, substitució dels residus d'aminoàcid i inversió de la quiralitat dels aminoàcids.⁷¹

El desenvolupament de lligands selectius pels diferents receptors melanocortínics, ha estat obstaculitzat per l'absència del coneixement detallat dels requeriments

⁶⁸ Haskell-Luevano, C.; Boteju, L. W.; Mowa, H.; Dickinson, C.; Gantz, I.; Yamada, T.; Hadley, M. E.; Hruby, V. J., *J. Med. Chem.*, **1995**, *38*, 4720-4729.

⁶⁹ Haskell-Luevano, C.; Nikiforovich, G.; Sharma, S. D.; Yang, Y-K.; Dickinson, C.; Hruby, V. J.; Gantz, I., *J. Med. Chem.*, **1997**, *40*, 1738-1748.

⁷⁰ Haskell-Luevano, C.; Toth, K.; Boteju, L.; Job, C.; Castrucci, A. M. L.; Hadley, M. E.; Hruby, V. J., *J. Med. Chem.*, **1997**, *40*, 2740-2749.

⁷¹ Hruby, V. J.; Lu, D.; Sharma, S. D.; Castrucci, A. M. L.; Kesterson, R. A.; Al-Obeidi, F.; Hadley, M. E.; Cone, R. D., *J. Med. Chem.*, **1995**, *38*, 3454-3461.

estructurals dels lligands peptídics per una unió específica als receptors melanocortínics i la seva posterior activació.

Com que està demostrat que la part activa dels pèptids melanocortínics és la seqüència central His-Phe-Arg-Trp (α -MSH 6-9) i aquesta és necessària per la unió a tots els receptors melanocortínics, la selectivitat del lligand per un determinat receptor pot estar determinada pels residus que queden fora d'aquesta regió ja sigui per una interacció selectiva amb diferents subtipus de receptors, per que alterin el plegament de la zona activa, o bé per una combinació d'ambdós.

Canvis en la "seqüència missatge" de l'**MT2** ens confirmen la importància d'aquesta per a l'activitat del pèptid, ja que modificacions de cadascun dels aminoàcids de la seqüència per un aminoàcid neutre (Ala) dona lloc a una disminució tant en la unió del pèptid amb els diferents receptors, així com també una disminució de la capacitat de generar AMPc.⁷²

L'excepció es produeix en el cas de la His⁶ ja que la seva substitució no modifica la unió ni l'activitat agonista. Sembla que la His⁶ no és essencial per a l'activitat de l'**MT2**. Malgrat això, la delecció de la His en l'**MT2** dona lloc a un pèptid inactiu, la qual cosa podria ser deguda a una reducció en la mida de l'anell.

En els altres casos aquesta disminució de l'activitat és molt clara. Per exemple, els residus de D-Phe⁷ i Trp⁹ són necessaris per a l'activitat i sembla clau aquesta presència aromàtica per la unió del pèptid al receptor.⁷²

A més, com ja era d'esperar, el derivat "enantio" d'**MT2** (Ac-D-Nle⁴-c[D-Asp⁵-D-His⁶-Phe⁷-D-Arg⁸-D-Trp⁹-D-Lys¹⁰]-NH₂), amb tots els residus amb inversió de configuració, no va resultar actiu en assaigs d'unió amb els receptors humans ni tampoc en l'assaig de transducció de senyal. Això confirmà la importància de la topologia de les cadenes laterals en la interacció amb els receptors melanocortínics. Pel mateix motiu l'anàleg "retro" **MT2** (Ac-c[Lys¹⁰-Trp⁹-Arg⁸-D-Phe⁷-His⁶-Asp⁵]-Nle⁴-NH₂), amb la direcció del enllaços peptídics alterada, mostra que la interacció de l'esquelet peptídic amb aquests receptors juga un paper important en el reconeixement lligand-receptor. El compost "retro-enantio" (Ac-c[D-Lys¹⁰-D-Trp⁹-D-Arg⁸-Phe⁷-D-His⁶-D-Asp⁵]-D-Nle⁴-NH₂), hauria de tenir una disposició de les cadenes laterals similar a la del compost model (**MT2**) però per estudis teòrics s'ha comprovat que la superfície no seria idèntica. Aquest compost tenia una potència 1000 vegades menor que la molècula de

⁷² Bednarek, M. A.; Silva, M. V.; Arison, B.; MacNeil, T.; Kalyani, R. N.; Huang, R-R. C.; Weinberg, D. H., *Peptides*, **1999**, *20*, 401-409.

referència indicant novament una gran importància de la disposició de les cadenes laterals i dels enllaços peptídics en la unió amb els receptors.

Estudis de RMN i modelatge molecular realitzats pel grup de Victor Hruby suggerien una conformació plegada preferida de l'esquelet peptídic en la majoria de confòrmers de baixa energia.^{73,74} Malgrat això, estudis realitzats per Bednarek et al. de RMN no revelen la predilecció per cap tipus de conformació, cosa que està d'acord amb els estudis de modelatge molecular realitzats pel nostre grup. (veure capítol 2).

Una altra modificació sobre l'**MT2** va ser la N-metilació de la D-Phe⁷ i l'Arg⁸. En el compost amb l'Arg⁸ N-metilada, [NMe-Arg⁸]-MT2 es manté la capacitat d'unió als receptors i l'activitat agonista de l'**MT2** mentre que el pèptid [NMe-D-Phe⁷]-MT2 va resultar ser molt menys potent. Això pot voler dir que l'àtom d'hidrogen NH de la D-Phe⁷ participa en ponts d'hidrogen intramoleculars que estabilitzarien la conformació plegada activa proposada.

Amb aquestes modificacions també es van trobar antagonistes competitiu de α -MSH. En els casos en que es substituïa la D-Phe⁷ de l'**MT2**, per un aminoàcid aromàtic voluminós, es podien produir antagonistes potents i selectius pels receptors melanocortínics MC3R i MC4R,⁷¹ però agonistes dels receptors MC1R i MC5R. Un dels més coneguts és el SHU-9119 resultant de la substitució de D-Phe per D-Nal(2).

1.5.7. Efectes sobre el receptor MC1R. Enfosquiment de la pell

La pigmentació cutània és deguda a la melanina, un pigment sintetitzat en els melanocits de la pell en el procés de melanogènesi i que s'allibera en forma de grànuls cap als queratocits de la epidermis. La melanina constitueix el principal pigment de la pell i se sintetitza com a resposta als raigs ultraviolats del sol com un mecanisme de protecció. En aquest procés de melanogènesi la tirosinasa és l'enzim clau ja que catalitza la transformació de la L-tirosina a L-dopaquinona, la qual posteriorment es transforma en eumelanina, fosca i que confereix protecció a l'individu, o bé feomelanina, groga i que no protegeix de les radiacions solars (Fig.1.15). La hormona α -MSH activa l'enzim tirosinasa i d'aquesta manera afavoreix la síntesi de melanines.

⁷³ Al-Obeidi, F.; O'Connor, S. D.; Job, C.; Hruby, V. J.; Pettitt, B.M., *J. Pept. Res.*, **1998**, *51*, 420-431.

⁷⁴ Ying, J.; Köver, K. E.; Gu, X.; Han, G.; Trivedi, D. B.; Kavarana, M. J.; Hruby, V. J., *Biopolymers*, **2003**, *71*, 696-716.

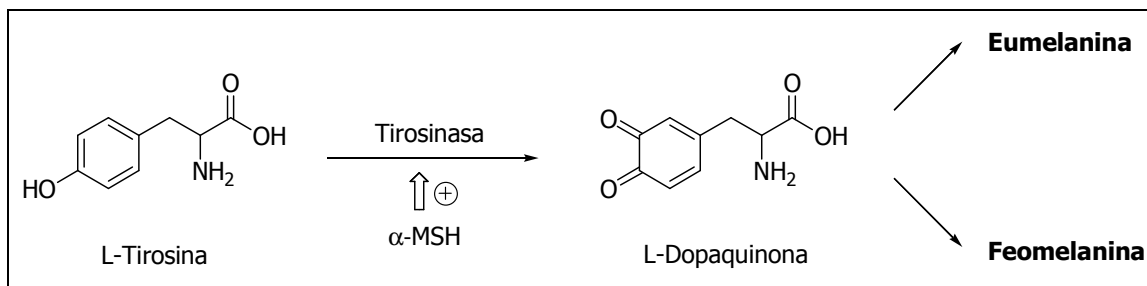


Fig 1.15. Síntesi de melanina als melanòcits: melanogènesi.

Després de l'aprovació de la FDA, el grup de Victor Hruby de la universitat d'Arizona va investigar si l'anàleg **MT1** podria ser útil per augmentar la pigmentació cutània en el cas dels humans. Com anteriorment s'havia demostrat utilitzant α -MSH⁷⁵ i ACTH, van comprovar un enfosquiment de la pell en individus voluntaris sans que havien estat injectats per via subcutània amb **MT1**. Van demostrar així que el l'**MT1** indueix un increment de la expressió d'eumelanina⁷⁶ i un consegüent enfosquiment de la pell sense exposició a la llum solar. A més, l'**MT1** no indueix l'expressió de feomelanina induint així un augment en la proporció eumelanina:feomelanina, la qual cosa implica una major protecció cutània. Amb l'**MT2** també s'indueix un enfosquiment de la pell, però també produïa efectes paral·lels com una erecció immediata en voluntaris mascles.⁷⁷ Degut a aquest altre efecte de l'**MT2** no s'han realitzat més estudis cutanis, sinó que s'ha centrat l'atenció en l'acció que aquest té quan actua sobre altres receptors melanocortínics.

1.5.7.1. Melanotan-1 : Estudis clínics i comercialització

En estudis de fase clínica I i II es van fer assaigs de reflectància dels canvis que l'**MT1** produïa en el color de la pell humana. Aquest estudi revelava que els efectes de la llum solar, després de 5 exposicions diàries d'aproximadament 30 minuts en la pell dels subjectes de l'estudi, provocava un bronzejat màxim a la setmana d'haver començat i que posteriorment retornava al nivell de pre-exposició a les 7 setmanes⁷⁸.

Posteriorment es va voler comprovar la seguretat de l'administració d'**MT1** en combinació amb l'exposició a la llum solar. El que es va observar va ser una sinèrgia

⁷⁵ Lerner, A. B.; McGuire, J. S., *Nature*, **1961**, *185*, 176-179.

⁷⁶ Dorr, R. T.; Dvorakova, K.; Brooks, C.; Lines, R.; Levine, N.; Schram, K.; Miketova, P.; Hruby, V. J.; Alberts, D. S., *Photochem. photobiol.*, **2000**, *72*, 526-532.

⁷⁷ Dorr, R. T.; Lines, R.; Levine, N.; Brooks, C.; Xiang, L.; Hruby, V. J.; Hadley, M. E., *Life Sci.* **1996**, *58*, 1777-1784.

⁷⁸ Dorr, R. T.; Ertl, G.; Levine, N.; Brooks, C.; Bangert, J. L.; Broome Powell, M., *Arch. Dermatol.*, **2004**, *140*, 827-835.

en el bronzejat de la pell. El grau d'enfosquiment era significativament superior a l'assolit amb l'exposició solar o l'administració d'**MT1** únicament. A més a més, l'administració d'**MT1** conjuntament amb l'exposició a la llum solar provoca un bronzejat de més llarga durada, que no retorna a l'estat inicial de reflectància ni tan sols 11 setmanes després del tractament amb **MT1** i es necessari la meitat del temps d'exposició al sol per tenir el bronzejat màxim. Això redueix la necessitat d'una exposició substancial al sol per augmentar la pigmentació cutània i per tant redueix el dany de la pell deguda als raigs UV del sol, que s'han considerat un factor de risc de càncer de pell. Cal remarcar també que l'administració d'**MT1** sense exposició a la llum solar comporta un enfosquiment mínim de la pell. Per tant, l'acció sinèrgica de la llum solar i l'**MT1** en la duració i la intensitat de la resposta pigmentària és remarcable.

Prèviament a aquests assaigs amb voluntaris humans, van ser necessaris assaigs preclínic. Diversos assaigs tant *in-vitro* com *in-vivo*, van ser dissenyats per tal de permetre valorar el fàrmac en l'administració en humans. Aquests estudis van demostrar que la molècula no és tòxica ni carcinogènica,⁷⁹ ni *in-vivo* ni *in-vitro*.

En quant als assaigs clínics en humans, el fàrmac induïx pigmentació en individus amb diferents tipus de pell, tant aquells que responen fàcilment a la llum solar com aquells que presenten una resposta menor. A més un tret únic en humans és que l'**MT1** és capaç de reduir la resposta tòxica (cèl·lules cremades pel sol) de la pell als raigs UV solars en aquells individus amb pells escassament bronzejables. Però l'administració subcutània diària que es feia servir en els assaigs clínics provocava efectes secundaris com fogots i nàusees i ja s'està canviant per una formulació depot subcutània,⁸⁰ que farà que l'administració d'**MT1** sigui més efectiva i més còmoda.

L'empresa EpiTan s'ha fet amb els drets d'**MT1** anomenant-lo CUV-1647. Aquests laboratoris, recentment han provat una formulació depot implantada sota la pell que elimina els efectes secundaris i produeix un bronzejat més intens i durador.⁸¹ Per tot això, l'**MT1** pot formar part del primer "protector solar injectable" que podria ser útil com a prevenció per les persones amb riscos de desenvolupar un càncer de pell induït per les radiacions solars.

⁷⁹ Dawson, B. W.; Ford, C. A.; Holloway, H.; Dorr, R. T.; Johnson, P., *Toxicology*, **1993**, *77*, 91-101.

⁸⁰ Bhardwaj, R.; Hadley, M. E.; Dorr, R. T.; Dvorakova, K.; Brooks, C.; Blanchard, J., *Pharmaceut. Res.*, **2000**, *17*, 593-599.

⁸¹ Hadley, M. E.; Dorr, R. T., *Peptides*, **2006**, *27*, 921-930.

1.5.8. Efectes sobre MC3R i MC4R. Tractament de l'obesitat i trastorns sexuals.

Els receptors MC3R i MC4R es troben àmpliament expressats al cervell i es creu que juguen un paper important en el comportament alimentari, comportament sexual i trastorns de la conducta i estat d'ànim.

1.5.8.1 Obesitat

La obesitat és un problema de salut comú als països industrialitzats que pertany al grup de factors de risc de la diabetis i malalties cardiovasculars. La seva incidència ha augmentat arreu en els darrers 20 anys. Aquesta malaltia és atribuïble a un desequilibri entre la ingesta d'aliments i la despesa energètica. Un bon tractament d'aquesta malaltia hauria d'incloure la supressió de l'aport energètic i l'increment de la despesa d'energia.⁸²

En condicions normals, l'individu manté el seu nivell de greixos corporals, malgrat les diferències diàries en els guanys i despeses energètiques. Això és degut a una regulació endocrina ("feedback loop") en la que participa una hormona adipocítica, la leptina, i els receptors melanocortínics MC3R i MC4R (fig. 1.11). La leptina circula en proporció al greix corporal i provoca respostes cerebrals que modulen l'apetit i la despesa energètica.⁸³ Aquesta induïx l'expressió de proopiomelanocortina (POMC), el precursor de l' α -MSH, principal agonista dels receptors MC3R i MC4R.

⁸² Chaki, S.; Nakazato, A., *Drugs of the future*, **2004**, 29, 1065-1074.

⁸³ Chen, A. S.; Marsh, D. J.; Trumbauer, M. E.; Frazier, E. G.; Guan, X-M.; Yu, H.; Rosenblum, C. I.; Vongs, A.; Feng, Y.; Cao, L.; Metzger, J. M.; Strack, A. M.; Camacho, R. E.; Mellin, T. N.; Nunes, C. N.; Min, W.; Fisher, J.; Gopal-Truter, S.; MacIntyre, D. E.; Chen, H. Y.; Van der Ploeg, L. H. T., *Nat. Genet.*, **2000**, 26, 97-102.

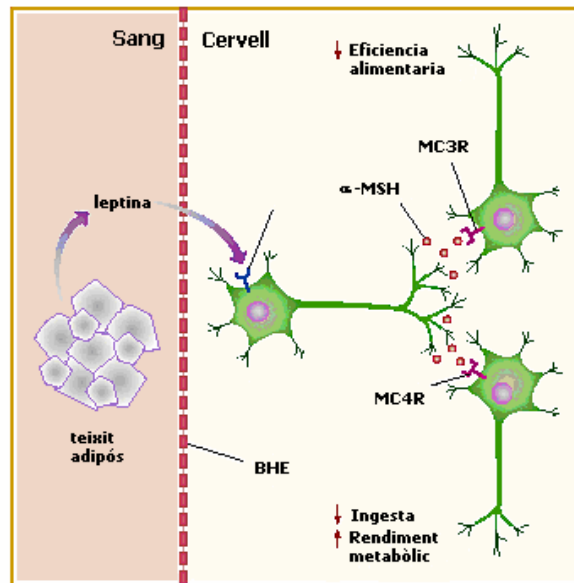


Figura 1.16. Mecanisme de regulació “feedback” del pes corporal.

Durant els anys 90, una sèrie d'estudis farmacològics i genètics van demostrar que els pèptids melanocortínics participen en la regulació del pes corporal mitjançant efectes en la ingesta d'aliments i la despesa energètica.⁸⁴ Ratolins mutats genèticament, que expressaven un antagonista competitiu endogen (la proteïna Agouti) a nivell central eren obesos, aparentment per antagonisme del receptor MC4R i probablement de l'MC3R.⁸⁵

Posteriorment es va trobar un gen homòleg al d'Agouti, que codifica un antagonista d'MC3R i agonista invers de MC4R,⁸⁶ anomenat “Agouti related protein” (AgRP) que s'expressa en l'hipotàlem. Injeccions intravenoses d'aquest AgRP provocaven un augment de la ingesta d'aliments.

La confirmació de la importància dels pèptids melanocortínics en la regulació del pes corporal va arribar amb l'estudi de ratolins POMC Knock-out, en els que el gen de la proopiomelanocortin (POMC) estava desactivat. La obesitat en aquests ratolins es podia revertir per tractament amb un agonista com l'α-MSH.

Per comprovar la implicació de cadascun dels receptors melanocortínics centrals, es van estudiar ratolins MC3R i MC4R “Knock-out”. Aquests models demostren que el receptor implicat en la regulació del pes corporal es l'MC4R i que el receptor MC3R

⁸⁴ Cone, R. D., *Trends Endocrinol. Metab.*, **1999**, 10, 211-216.

⁸⁵ Lu, D.; Willard, D.; Patel, I. R.; Kadowitz, S.; Overton, L.; Kost, T.; Luther, M.; Chen, W.; Woychik, R. P.; Wilkinson, W. O.; Cone, R. D., *Nature*, **1994**, 371, 799-802.

⁸⁶ Nijenhuis, W. A.; Oosterom, J.; Adan, R. A., *Mol. Endocrinol.*, **2001**, 15, 162-171.

juga un paper complementari.⁸⁷ Els ratolins amb el receptor MC3R inactivat incrementen la massa grassa, redueixen la massa magra i tenen una eficiència alimentaria més elevada.⁸⁸ Per tant sembla ser que el receptor MC4R estaria implicat en la regulació de la ingesta i la despesa energètica, mentre que l'MC3R regularia l'eficiència alimentaria i la participació dels nutrients a la massa grassa. Així, l'**MT2**, preferentment agonista MC4R, inhibiria la presa d'aliments, mentre que l'antagonista **SHU-9119** n'incrementaria la ingesta.

1.5.8.2. Disfunció erèctil

La disfunció erèctil es defineix com la inhabilitat per iniciar o mantindre una erecció suficient per una relació satisfactòria. Nombrosos assaigs genètics, farmacològics i anatòmics han donat suport a la tesi que un o més pèptids melanocortítics funcionen com a neurohormones al cervell per regular diverses activitats sexuals.⁸⁹

1.5.8.3. Melanotan-2 i PT-141 pel tractament de l'impotència

Per accident, el grup de Hruby va descobrir que el **MT2** regulava alguns aspectes de la sexualitat tant en homes com en dones. En un assaig de fase clínica I per determinar l'eficàcia de l'**MT2** com a inductor de l'enfosquiment de la pell en homes van notar que el pèptid produïa erecció.⁷⁷

Per tant, l'**MT2** pot augmentar la pigmentació cutània, regular el pes corporal i també estimular l'erecció. Per tot això és coneguda mediàticament com a "Barbie drug". El problema és, però, que per obtenir un augment en la pigmentació caldrien dosificacions prolongades, el que podria provocar efectes secundaris indesitjables com nausees i emesi. Per tant no seria apropiada aquesta denominació.

La importància clínica i comercial d'aquesta observació va fer que l'**MT2** fos venut per lla Universitat d'Arizona a la empresa Palatin Technologies. Un metabolit de l'**MT2**, el **PT-141**, va ser desenvolupat per aquests laboratoris.⁸¹ Aquest **PT-141** difereix de

⁸⁷ MacNeil, D. J.; Howard, A. D.; Guan, X.; Fong, T. M.; Nargund, R. P.; Bednarek, M. A.; Goulet, M. T.; Weinberg, D. H.; Strack, A. M.; Marsh, D. J.; Chen, H. Y.; Shen, C-P.; Chen, A. S.; Rosenblum, C. I.; MacNeil, T.; Tota, M.; MacIntyre, E. D.; Van der Ploeg, L. H. T., *Eur. J. Pharm.*, **2002**, *440*, 141-157.

⁸⁸ La eficiència alimentaria és la percentatge de guany de pes respecte a la quantitat de menjar ingerit.

⁸⁹ Van der Ploeg, L. H. T.; Martin, W. J.; Howard, A. D.; Nargund, R. P.; Austin, C. P.; Guan, X.; Drisko, J.; Cashen, D.; Sebhat, I.; Patchett, A. A.; Figueroa, D. J.; DiLella, A. G.; Connolly, B. M.; Weinberg, D. H.; Tan, C. P.; Palyha, O. C.; Pong, S-S.; MacNeil, T.; Resenblum, C.; Vongs, A.; Tang, R.; Yu, H.; Sailer, A. W.; Fong, T. M.; Huang, C.; Tota, M. R.; Chang, R. S.; Stearns, R.; Tamvakopoulos, C.; Christ, G.; Drazen, D. L.; Spar, B. D.; Nelson, R. J.; Malcnyre, D. E., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2002**, *99*, 11381-11386.

l'**MT2** en el seu extrem C-terminal, ja que el grup $-NH_2$ es reemplaça per un grup $-OH$. Els resultats demostren que el **PT-141** és efectiu com a inductor de ereccions en homes fins i tot en aquells que no responen al tractament amb sildenafil (Viagra[®]).⁹⁰ Aquest farmac es presenta en forma de nebulitzador nasal i difereix del sildenafil i altres farmacs relacionats en que aquest actua als receptors melanocortínics MC3R i MC4R al SNC, on aquest activa el desig sexual i l'erecció mitjançant un mecanisme neuronal.

Malgrat ser un potent inductor d'ereccions, el **PT-141**, no presenta efectes secundaris indesitjables. A més, l'activitat d'aquest al SNC fa que sigui útil per tractar tant les disfuncions sexuals orgàniques com les psicogèniques.

Quant a les dones, el 43% pateix disfuncions sexuals.⁹¹ Estudis previs del **PT-141** havien demostrat l'eficàcia d'aquest compost en femelles. Aquest fet van fer que s'iniciessin estudis amb dones. En aquests el **PT-141** va resultar ser segur i produïa un augment de la irrigació vaginal.⁹²

Actualment, aquest **PT-141** s'anomena Bremelanotide, i ha finalitzat els assaigs de fase clínica II tant en disfuncions sexuals en homes, mentre que continua realitzant-se en el cas de disfuncions sexuals femenines.⁹³ L'empresa Palatin[®] té previst començar els assaigs de fase clínica III en homes a principis d'aquest mateix any.

Per tant, es demostra amb l'intent de comercialització de l'**MT2** i **PT-141**, així com també de l'**MT1**, la importància d'aquests compostos en el tractament de diverses disfuncions fisiològiques.

1.5.8.4. Selectivitat MC3R/MC4R

Encara que tant l'MC3R com l'MC4R reconeixen l' α -MSH, l'afinitat de la γ -MSH és 50 vegades més gran pel receptor MC3R. El receptor de melanocortina 4 (MC4R) té una afinitat elevada per l' α -MSH i la β -MSH però una afinitat molt baixa per γ -MSH.

En mamífers, la γ -MSH (fig.1.5, pag.4) conté una Lys addicional al seu extrem N-terminal, trobant-se en forma de Lys- γ -MSH. Aquesta, al igual que α -MSH, conté la seqüència missatge His-Phe-Arg-Trp, conté també un residu de Tyr a la posició 2 i un

⁹⁰ Diamond, L. E.; Earle, D. C.; Garcia, W. D.; Spana, C., *Urology*, **2005**, *65*, 755-759.

⁹¹ Lauman, E. O.; Paik, A.; Rosen, R. C., *JAMA*, **1999**, *281*, 537-544.

⁹² Palatin Technologies reports phase-I data for PT-141, www.palatin.com, September, 26, **2002**.

⁹³ Palatin Technologies, Development status of Bremelanotide in men and women, www.palatin.com.

de Met a la posició 4, mentre que els extrems N i C-terminal difereixen una mica respecte a α -MSH així com també en el residu 5. (Fig. 1.17)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
α -MSH	Ac-	S	Y	S	M	E	H	F	R	W	G	K	P	V-NH ₂
Lys- γ -MSH	H-	K	Y	V	M	G	H	F	R	W	D	R	F	G-OH

Figura 1.17. Comparació de la seqüència aminoacídica de α -MSH i γ -MSH.

L'any 1998, el grup d'Oosterom i col·laboradors, va demostrar que l'Asp¹⁰ en la Lys- γ -MSH determinava la selectivitat per l'MC3R.⁹⁴ Queda, però, encara per demostrar, si el residu d'Asp¹⁰ interacciona directament amb el receptor MC3R o bé si aquest residu induïx una estructura peptídica que sigui favorable a MC3R. El fet que [Nle4,Gly10]Lys- γ -MSH i [Nle4]Lys- γ -MSH tinguin una afinitat similar per MC3R fa pensar que el residu Asp¹⁰ no interactua directament amb la zona d'unió de MC3R sinó que aquest residu pot obstaculitzar la interacció amb MC4R.

Aquest mateix grup un any més tard i mitjançant receptors quimèrics en els que es substituïen diferents residus del receptor MC4R pels residus de MC3R va concloure que el tercer loop extracel·lular del receptor (fig.1.8, pag.8) era el responsable de la selectivitat per la γ -MSH.⁹⁵ Concretament es modificà el residu 268 del tercer domini extracel·lular pel mateix residu del receptor MC3R (Ile per Tyr) i s'arribà a la conclusió que la selectivitat per la γ -MSH residia únicament en aquest residu de Ile²⁶⁸. Tot i això, i com ja havien postulat anteriorment, és necessari el residu de Asp¹⁰ per que la selectivitat es vegi augmentada, ja que anàlegs amb aquesta posició modificada, com és el cas de [Nle4, Gly10]Lys- γ -MSH, exhibien una afinitat semblant pel receptor mutat i per MC4R. A més, l'intercanvi del residu de Tyr²⁶⁸ d'MC4R al residu d'Ile, també provoca una disminució en l'afinitat d'un peptid melanocortínic cíclic com és l'**MT2**.

Per tant, una interacció lligand-receptor selectiva pot ocórrer a través d'un mecanisme d'exclusió més que per un reconeixement específic. En aquest sentit, la Tyr²⁶⁸ de MC4R pot obstaculitzar la interacció amb Lys- γ -MSH. S'ha demostrat que la His²⁶⁴ del receptor MC4R és essencial per a l'activació d'aquest per part de la γ -MSH.⁹⁶ Aquest

⁹⁴ Oosterom, J.; Burbach, J. P.; Gispen, W. H.; Adan, R. A., *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, *354*, R9-11.

⁹⁵ Oosterom, J.; Nijenhuis, W. A. J.; Schaapert, W. M. M.; Sloopstra, J.; Meloen, R. H.; Gispen, W. H.; Burbach, J. P.; Adan, R. A., *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 16853-16860.

residu és molt proper al residu de Tyr²⁶⁸ i podria emmascarar el residu His²⁶⁴ impedit així la interacció entre MC4R i la Lys- γ -MSH (fig 1.18).

Pel que fa al lligand, sembla ser que la presència de dos grups acídics propers en l'espai (Glu⁵ i Asp¹⁰) condueix a una disminució de l'afinitat tant per MC3R com en MC4R, possiblement degut a la repulsió de les seves càrregues negatives. Això està d'acord amb els lactams cíclics, com l'**MT2** en el que, en la conformació activa, (fig. 1.13, pag. 28) els residus de les posicions 5 i 10 estan molt propers.

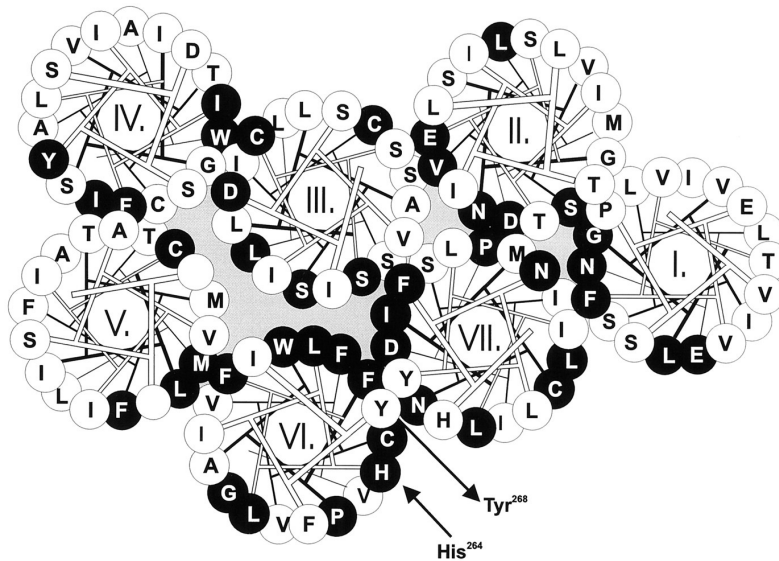


Figura 1.18. Model helicoïdal de MC4R on s'observa la proximitat His²⁶⁴ / Tyr²⁶⁸

S'observa també un increment de la selectivitat per MC4R quan la "seqüència missatge", His-Phe-Arg-Trp, es troba en una conformació restringida, com és el cas de pèptids cíclics, com per exemple l'**MT2**. En el cas dels peptids lineals, com **MT1**, l'afinitat es més gran per MC3R. Això voldria dir que, la ciclació del pèptid podria ser apropiada pel disseny de lligands selectius MC4R, mentre que la modificació de pèptids MSH podria ser de més utilitat per la selectivitat MC3R.⁹⁷

Per tant, s'ha demostrat que uns mateixos residus de la seqüència missatge, His-Phe-Arg-Trp, no interaccionen de la mateixa manera amb residus conservats dels receptors melanocortínics. Es podria dir, doncs, que els residus del lligand fora de la seqüència activa poden dirigir la conformació d'aquesta, presentant-la a la zona d'unió al receptor d'una determinada manera, responsable de la selectivitat.

⁹⁷ Haskell-Luevano, C.; Nikiforovich, G.; Sharma, S. D.; Yang, Y.K.; Dickinson, C.; Hruby, V. J., Gantz, I., *J. Med. Chem.*, **1997**, *40*, 1738-1748.

1.6. Objectius

L'objectiu de la present tesi doctoral és l'obtenció d'una família de pseudopèptids derivats d'**MT2**, amb la intenció, de trobar algun compost que millori la selectivitat dels compostos ja existents.

Les modificacions es pretenen dur a terme emprant pseudodipèptids rígids que s'han de preparar previament en dissolució. Aquests dipèptids tenen estructura lactàmica o de diazanorbornà.

La farmacomodulació de l'**MT2** amb els nostres pseudopèptids es pot fer en tres zones de la molècula. En uns casos s'afecta directament la zona del gir β que es produeix en la conformació activa i en altres es pot modificar la part més flexible de l'anell i d'aquesta manera es pot orientar de manera diferent la disposició espacial de la regió activa.

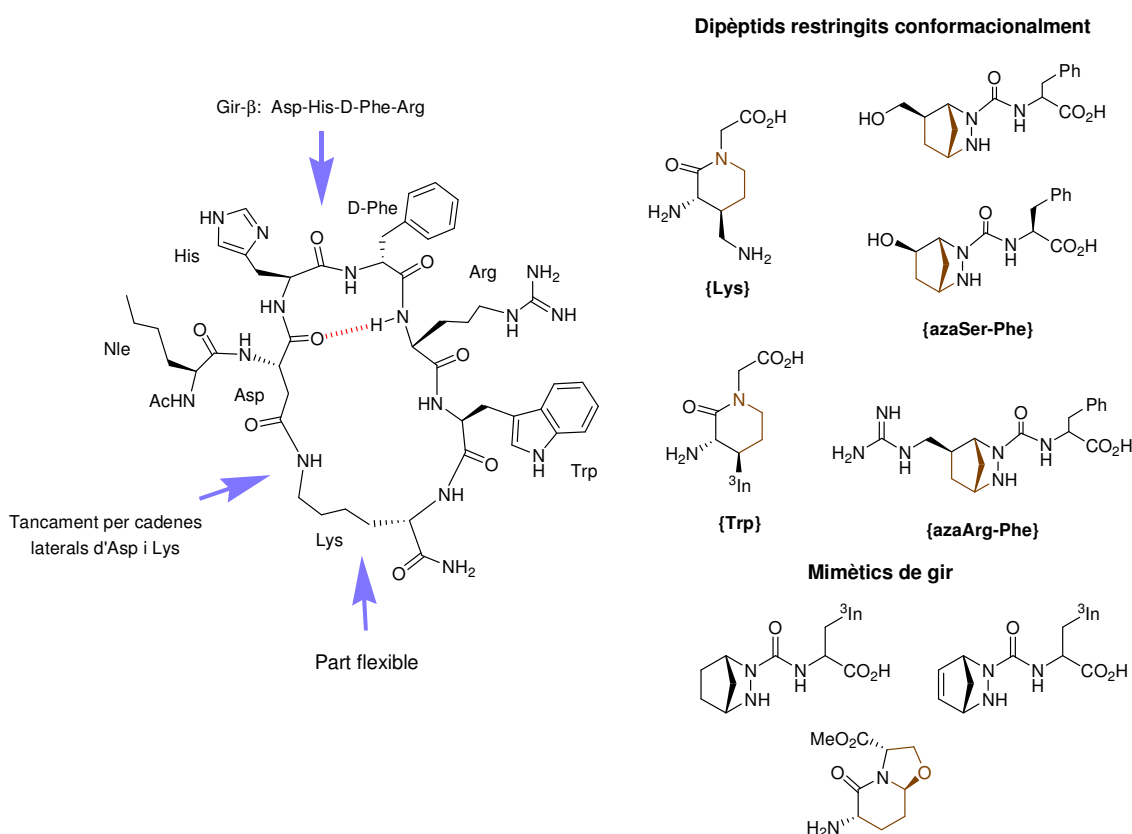


Figura 1.19. Pseudopèptids amb els que modificarem les diferents regions de l'**MT2**.

El pla de treball consta de quatre fases: disseny, síntesi dels pseudosipèptids rígids, síntesi dels pseudomelanotans i estudis conformacional per RMN.

1.6.1. Disseny

El primer que s'estudiarà és la validesa d'aquest plantejament, i quines són les modificacions estructurals que induïm amb els nostres ψ -melanotans, mitjançant càlculs teòrics de modelització molecular. Donat que l'estructura de l'**MT2** ja ha estat estudiada, podem superposar els nostres derivats per avaluar les modificacions estructurals que induiran.

1.6.2. Síntesi dels dipeptids conformacionalment restringits

El segon pas consisteix en la obtenció dels pseudodipeptids rígids necessaris per a la síntesi de la quimioteca. En un treball anterior, tal com s'ha comentat, ja havíem preparat un anàleg restringit del triptofan {Trp-Gly}.⁴⁵ En aquest cas farem servir {Trp-Gly}, però també volem preparar {Trp-Lys}, compost que presenta un centre estereogènic en α respecte al nitrogen lactàmic, la qual cosa farà que el plantejament sintètic sigui molt diferent.

També prepararan pseudodipeptids rígids amb estructura de diazanorbornà. Concretament es sintetitzaran anàlegs de la Ser i de l'Arg. Aquests es prepararan per desimetrització de bicicles meso, mitjançant una reacció d'hidroboració enantioselectiva.

Donat que les modificacions del centre actiu han estat ampliament estudiades,⁷² nosaltres començarem per la modificació de la zona flexible de la molècula, ja que aquesta pot ser responsable de la selectivitat per un o altre receptor en orientar el gir beta d'una o una altra manera a l'espai. Així doncs, s'estudiaran, en primer lloc, les síntesis de {Trp} i de {Lys}. Posteriorment, amb els derivats {azaArg} es modificarà la part activa de la molècula i els derivats {azaSer} substituiran a la Lys o bé s'incorporaran en el lloc de l'His ja que aquesta no es imprescindible per l'activitat.

Finalment es sintetitzaran compostos mimètics de gir, bé amb estructura d'oxazolopiperidona o amb estructura de diazanorbornà. Amb aquests compostos es preten rigidificar la part flexible de la molècula reemplaçant el residu de Lys.

1.6.3. Síntesi de la quimioteca

Un cop es s'hagin obtingut els pseudodipeptids, s'iniciarà la síntesi de la quimioteca pseudopeptídica. Igualment es prepararà l'**MT2**, ja que per una banda el necessitarem com a patró en els posteriors assaigs biològics, i per altra, la seva preparació servirà

per establir el mètode per la posterior síntesi de la quimioteca.

1.6.4. Estudi conformacional per RMN

Finalment es comprovarà la disposició dels pèptids en l'espai quan aquests incorporen els pseudodipèptids o els mimètics de gir i es compararà amb la molècula de referència, l'**MT2**.

L'estudi es durà a terme realitzant espectres bidimensionals de correlació ^1H - ^1H TOCSY i NOESY. Un cop assignats tots els protons dels pseudomelanotans, es faran servir les dades com a restriccions per càlculs teòrics de dinàmica molecular.