



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

ESTUDIS ESTRUCTURALS DE MODELITZACIÓ MOLECULAR

CAPÍTOL 2. ESTUDI ESTRUCTURAL PER MODELITZACIÓ MOLECULAR.

Tal com s'ha comentat a la introducció, per validar el plantejament d'aquest treball i poder visualitzar quines són les modificacions estructurals concretes que induïm en introduir els lactams dipeptídics a la cadena del pèptid model, hem dut a terme uns estudis estructurals teòrics mitjançant modelització molecular.

Existeix una gran diversitat de tècniques computacionals en funció de la propietat que es vol estudiar. Per als nostres objectius varem decidir emprar un "simulació de temprat iteratiu" (*Iterative simulated Annealing*, ISA). Aquesta tècnica és de les anomenades "tècniques clàssiques", que no consideren els electrons, si no que consideren que els àtoms que componen un model material es poden descriure com un conjunt de partícules que interaccionen entre si d'acord amb les lleis de la Mecànica Clàssica. Com que no es consideren explícitament els graus de llibertat electrònics, són tècniques computacionalment molt menys costoses, fet que permet la seva aplicació fins i tot a l'estudi dinàmic de sistemes grans, estudis que no es poden fer amb tècniques quàntiques.

2.1. Tècniques clàssiques

A continuació es resumeixen les característiques de les quatre "tècniques clàssiques" més emprades.

2.1.1. Temprat Simulat ("Simulated Annealing")⁹⁸

Aquesta tècnica es va descobrir com un mètode per a resoldre el problema d'optimització de les funcions on la millor solució s'ha de trobar entre un gran nombre de possibilitats. La seva aplicació en la cerca de l'espai conformacional consisteix en iniciar la simulació portant l'estructura optimitzada a una temperatura elevada i anar disminuint-la fins a arribar a una temperatura suficientment baixa com per que el sistema estigui en un mínim. La velocitat de descens de la temperatura ha de ser suficientment lenta com per a permetre un estat de semiequilibri termodinàmic en cada etapa. El procés es pot implementar per servir el mètode de Monte Carlo, o bé

⁹⁸ Tesis doctoral de Josep Cantó Silva, "Utilització i desenvolupament metodològic d'eines basades en la dinàmica molecular aplicades a l'estudi estructural de pèptids", Departament d'Enginyeria Química, Universitat Politècnica de Catalunya 1999.

directament sobre les trajectòries de Dinàmica Molecular, tot i que, en qualsevol dels dos casos, existeix una dependència crítica front a la velocitat de refredament. Per tenir la seguretat de trobar un mínim global, es necessitaria un descens de la temperatura molt lent i unes etapes a temperatura constant suficientment llargues en el temps per a poder arribar a l'equilibri termodinàmic.

2.1.2. Temprat Simulat Iteratiu ("Iterative Simulated Annealing")

El temprat simulat iteratiu consisteix en acoblar al final de cada procés de refredament un altre d'escalfament molt més ràpid, de forma que s'obté un procés cíclic. Cada cicle origina una estructura. Aquesta estructura és la inicial del cicle següent i es minimitza de manera paral·lela. Un cop minimitzada l'estructura, aquesta passa a formar part del conjunt d'estructures finals que seran analitzades. L'escalfament del sistema es realitza de manera més ràpida que el refredament per augmentar, així, de manera brusca, l'energia del sistema i afavorir el pas a una zona diferent de l'espai conformacional.

2.1.3. Dinàmica molecular

Aquesta metodologia es basa en l'aplicació directa de les equacions de moviment de Newton o Langeyn per descriure l'evolució temporal d'un sistema. La idea essencial es que el camp de forces aplicat permet avaluar no tan sols l'energia per una configuració nuclear, sinó també la força que actua sobre cada partícula a partir del gradient de l'energia potencial. Emprant les lleis de la Mecànica Clàssica es poden predir, la posició que ocuparà i la velocitat que tindrà cadascuna de les partícules en un temps determinat. Analitzant successivament en el temps la força sobre cada partícula i fent una estimació de la seva posició i velocitat futures, es poden obtenir un conjunt d'estructures que representen l'evolució temporal del sistema a una temperatura determinada.

Per a iniciar una Dinàmica Molecular (DM) s'ha d'indicar unes coordenades i unes velocitats inicials. Les coordenades es poden obtenir, per exemple, d'una estructura minimitzada, mentre que les velocitats es calculen aleatòriament, seguint una distribució de Maxwell, a la temperatura de referència. S'han proposat nombrosos algorismes per a la integració de les equacions de la DM. El més conegut és el mètode de la diferència finita proposat per Verlet, en el qual medeix les posicions atòmiques a temps $t+\Delta t$ a partir de les forces i posicions a temps anteriors. Aquest mètode és

relativament ràpid donat que requereix només una avaluació de la força per cada pas, essent aquesta avaluació la que més temps de càlcul requereix.

Un punt clau per a que es pugui aplicar en la pràctica aquesta metodologia, és l'elecció del temps d'integració, donat que això implica l'ús de càlculs numèrics, així que aquests han de ser petits. Aquest temps ve determinat per l'escala temporal dels moviments més ràpids en la simulació, que corresponen a l'streching dels enllaços. Això implica que el temps d'integració sigui de l'ordre de femtosegons. Com a conseqüència, l'escala de temps real que es pot aconseguir en la simulació és de l'ordre de nanosegons, tenint en compte que la durada de la simulació comporta la realització de milers de càlculs per a avaluar l'energia potencial de les diferents conformacions.

En la simulació de una Dinàmica Molecular, un aspecte important és el tipus de contorn que s'utilitza. Existeixen tres situacions generals a emular: a) sistema en el buit, no existeix cap dissolvent implícit i les interaccions es produeixen únicament entre els àtoms del sistema. L'efecte d'apantallament del dissolvent es representa mitjançant una constant dielèctrica, b) sistema rodejat per una esfera de solvatació, i c) sistema en condicions de contorn periòdiques.

En funció de les condicions inicials el sistema efectuarà una exploració diferent de l'espai conformacional accessible. Malgrat aquesta consideració, la Dinàmica Molecular és una tècnica enormement valuosa per a determinar un conjunt de conformacions representatives del sistema molecular. Això és possible degut a que el sistema pot, teòricament, travessar barreres energètiques, fet que permet l'estudi conformacional de molècules. El coneixement de l'espai conformacional accessible d'un pèptid permet definir amb precisió els seus patrons de reconeixement farmacofòrics al llarg del temps. A més, pot emprar-se per a corroborar les estructures tridimensionals determinades per ressonància magnètica nuclear.

2.1.4. Monte Carlo

Aquesta tècnica, a diferència de la Dinàmica Molecular, considera el temps com una variable. Es basa fonamentalment en la llei de Boltzmann, segons la qual, les conformacions energèticament més estables són les que estaran ocupades per un nombre més gran de molècules. Així, aquest mètode genera de forma aleatòria una sèrie de conformacions per les partícules que componen el sistema molecular. L'energia de cada conformació s'avalua a partir del camp de forces. Si l'energia és menor que la corresponent a la de la conformació original, és acceptada com a

conformació de mínima energia. En cas contrari, encara existeix una certa possibilitat que aquesta molècula sigui considerada com a representativa del sistema, essent aquesta probabilitat més gran quan menor sigui la diferència energètica de la nova conformació respecte a la conformació original.

És important remarcar que, malgrat les diferències en el formalisme dels mètodes de Dinàmica Molecular i de Monte Carlo, l'exploració de l'espai conformacional de sistemes en equilibri proporcionada per ambdues tècniques es idèntica en el cas de que el mostreig sigui prou llarg. Els sistemes d'aplicació i la informació que es pot obtenir del mètode de Monte Carlo és molt semblant a les explicades per una Dinàmica Molecular suficientment llarga. El fet que no es consideri el temps com a variable fa que la Dinàmica Molecular sigui més adient quan l'interès es centra en l'evolució dinàmica d'una propietat del sistema. D'altra banda, els mètodes de Monte Carlo permeten establir un control més directe de les variables conformacionals que defineixen el sistema. Així, aquests dos mètodes han resultat ser molt vàlids per a l'estudi de molècules petites o bé amb un elevat grau de rigidesa estructural.

2.2. Precedents

A la literatura es troba descrita l'anàlisi estructural de l'**MT2**. Així Hruby *et al.*¹⁰⁰ demostraren que l'heptaciclopèptid conté un gir de tipus beta-II format pels aminoàcids Asp⁵-His⁶-D-Phe⁷-Arg⁸, i consideraren que el lloc actiu de **MT2** era precisament aquest gir beta-II. Igualment, consideraren molt important per l'activitat un π -stacking que observaren entre l'anell benzènic de la D-Phe⁷ i l'imidazole de la His⁶.⁹⁹

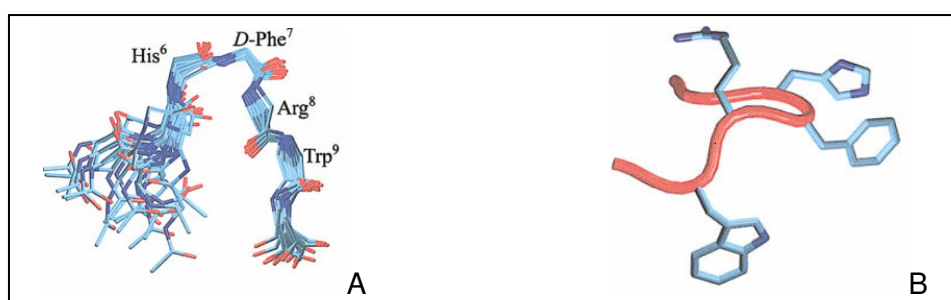


Figura 2.1. Estudi conformacional de **MT2** descrit per Hruby *et al.*¹⁰⁰

- A.** Superposició de conformacions que mostra el gir beta centrat en els residus His-D-Phe.
- B.** Conformació que mostra la disposició paral·lela a l'espai dels anells aromàtics de His i de D-Phe.

⁹⁹ Cálculs realitzats amb "Torsion-angle-dynamics" (TAD) simulated annealing.

¹⁰⁰ Ying, J.; Kövér, K. E.; Gu, X.; Han, G.; Trivedi, D. B.; Kavarana, M. J.; Hruby, V. J., *Biopolymers*, **2003**, 71, 696-716.

Per realitzar els càlculs, Hruby *et al.*, fan servir el mètode TAD (Torsion-angle-dynamics) conjuntament amb un mètode específic de “simulated annealing” descrit per Nilges *et al.*¹⁰¹ usant el software ARIA (Ambiguous Restraint for Iterative Assignment) en el programa CNS. Fan servir dades de ressonància magnètica nuclear per restringir distàncies i angles.¹⁰⁰

Malgrat tot, s’han descrit estudis estructurals sobre derivats de l’**MT2** que no coincideixen en el tipus de gir beta existent. Entre ells, cal destacar els estudis fets per Nikiforovich *et al.*¹⁰² sobre α -MSH i anàlegs cíclics d’aquesta en que proposa un model conformacional per la unió amb el receptor i transducció del senyal, en que les cadenes laterals de His⁶, L/D-Phe⁷ i Trp⁹ formen una superfície hidrofòbica i la cadena lateral d’Arg⁸ estaria orientada lluny d’aquesta. Aquest caràcter anfífilic al voltant de la “seqüència missatge” en α -MSH va ser també observat per Pettitt *et al.*¹⁰³ en les seves simulacions de dinamització molecular. En aquests estudis, s’observava un gir beta de tipus I centrat en els residus de His⁶-Phe⁷ per l’ α -MSH.

Estudis d’anàlegs lineals de l’**MT2** que contenen substitucions en la posició 6, van mostrar un gir beta de tipus I per Asp⁵-His⁶-D-Phe⁷-Arg⁸ i de tipus I’ per Asp⁵-Gln⁶-D-Phe⁷-Arg⁸. Més recentment, un estudi per ressonància magnètica nuclear i modelització molecular van mostrar un possible gir en forma de V al voltant dels residus Nal⁷/Phe⁷-Arg⁸-Trp⁹ en anàlegs cíclics d’ α -MSH en metanol.¹⁰⁴ Per tant, en la majoria d’estudis esmentats es recolza la teoria d’un gir revers en la regió de la seqüència activa d’ α -MSH, encara que poden diferir en el tipus de gir i la posició exacta d’aquest.

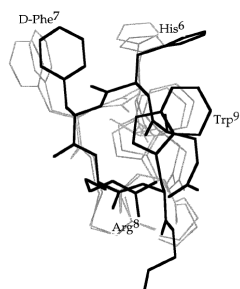


Figura 2.2.A. Superposició de diverses conformacions d’ α -MSH amb possible gir beta de tipus I.

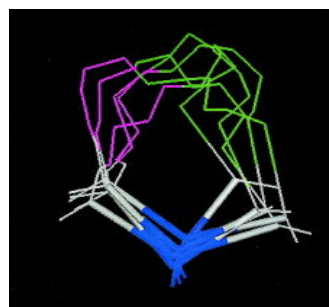


Figura 2.2.B. Possible gir en forma de V centrat en els residus D-Phe⁷-Arg⁸-Trp⁹.

¹⁰¹ Nilges, M.; Macias, M. J.; O’Donoghue, S. I.; Oschkinat, H., *J. Mol. Biol.*, **1997**, *269*, 408-422.

¹⁰² Nikiforovich, G. V.; Sharma, S. D.; Hadley, M. E.; Hruby, V. J., *Biopolymers*, **1998**, *46*, 155-167.

¹⁰³ Prabhu, N. V.; Perkyins, J. S.; Pettitt, B. M.; Hruby, V. J., *Biopolymers* **1999**, *50*, 255-272

¹⁰⁴ Elipe, M. V. S.; Mosley, R. T.; Bednarek, M. A.; Arison, B. H., *Biopolymers*, **2003**, *68*, 512-527.

Així, encara que empren substrats una mica diferents, es posa de manifest una certa discrepància en la categorització del tipus de gir.

2.3. Plantejament

Els estudis que altres autors han dut a terme fins al present s'han centrat principalment en modificacions sobre la porció del gir beta de la molècula, ja que és el centre actiu. D'aquests estudis i de forma molt resumida, se'n desprèn que modificacions de la D-Phe⁷, l'Arg⁸ i el Trp⁹ no són útils degut a que modifiquen l'activitat, mentres que substitucions de la His⁶ per altres residus mostren que el grup imidazole de la His⁶ no és necessari per a l'activitat del pèptid.¹⁰⁵

La modificació de D-Phe⁷ per altres residus aromàtics voluminosos, com per exemple D-Nal(2')⁷ transforma compostos agonistes en antagonistes sobre els receptors MC3R i MC4R.⁷¹ En el cas de l'antagonista **SHU-9119**, els anells d'His⁶ i de D-Nal⁷ no presenten el π -stacking que presentaven els compostos amb D-Phe⁷ i hi ha algunes desviacions en els angles dihedres respecte els estàndards de tipus beta-II.¹⁰⁰ Aquestes diferències estructurals, poden ser atribuïdes a unes interaccions hidrofòbiques més fortes entre les cadenes laterals dels residus de Nle⁴ i D-Nal(2')⁷ en el **SHU-9119**.¹⁰⁰ La introducció de D-Nal(2')⁹ en lloc del Trp⁹ a l'agonista **SHU-9119** fa que aquest sigui antagonista selectiu de MC5R.

Nosaltres hem considerat que la modificació de la part flexible de la molècula també és rellevant, ja que orienta el gir beta a l'espai, i per tant pot ser responsable de l'especificitat del compost per un o altre receptor. Així, de les modificacions que ens plantegem sobre l'**MT2**, vàrem decidir començar per {Trp} i {Lys}. Per això també vàrem iniciar els estudis de modelització observant què passaria quan introduíssim els nostres substituïts de la porció Trp.

Per dur a terme els càlculs, en primer lloc calia validar el nostre mètode de càlcul, la qual cosa vàrem fer duent a terme una cerca conformacional sobre el model ja descrit **MT2**. Un cop validat el mètode procedírem a fer les cerques conformacionals dels pseudo-melanotans més representatius, que en aquest màster és el compost Ac-Nle-c[Asp-His-D-Phe-Arg-{Trp-Gly}Lys]-NH₂.

¹⁰⁵ Grieco, P., Balse-Srinivasan, P., Han, G., Weinberg, D., MacNeil, T., Van der Ploeg, L. H. T., Hruby, V. J., *J. Peptide Res.*, **2003**, *62*, 199-206.

2.4. Resultats

L'estudi conformational de l'**MT2** i del seu derivat **20**, s'ha dut a terme per "*iterative simulated annealing*", és a dir per mecànica molecular, emprant el camp de forces AMBER que proporciona el programa Discover. Aquest camp de forces se sol emprar per molècules peptídiques ja que té molt ben parametrizats els aminoàcids. Els càlculs s'han fet al buit, considerant una constant dielèctrica de 4 ϵ i un "cutoff" de 20Å.

En primer lloc es fa una minimització energètica que es fa servir d'estructura de partida pels cicles d'escalfament i refredament successius en els quals s'obtenen les conformacions de mínima energia. Pels nostres estudis vàrem realitzar 4 cicles de 120 iteracions cadascuna on es van obtenir diverses estructures de baixa energia.

2.4.1. Anàlisi conformational del model **MT2**

En primer lloc es va fer una anàlisi d'**MT2** sense imposar cap tipus de restricció conformational. El càlcul va donar lloc a nombroses conformacions. Això ens demostrava que malgrat que l'**MT2** és un anell força petit, la molècula és molt flexible. A la figura 2.2.A es mostra la superposició d'onze de les conformacions de baixa energia que es van trobar. Quan s'observa aquesta superposició de conformacions es pot apreciar com l'orientació a l'espai de les cadenes laterals del pèptid és molt variada. No obstant això, també es pot apreciar que l'esquelet peptídic manté una conformació plegada en una zona de la cadena, que justament correspon a la zona del gir beta. A la figura 2.2.B es mostra la superposició de només tres conformacions, on es veu més clarament la zona del gir beta.

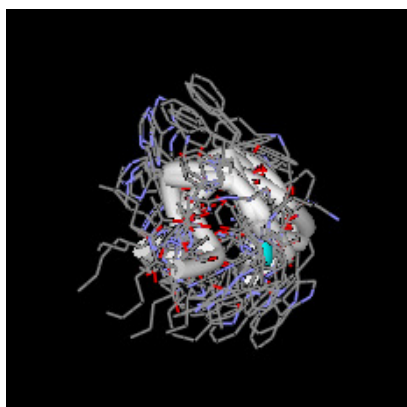


Figura 2.2.A. Superposició de 11 conformacions d'**MT2** (càlculs sense restriccions)

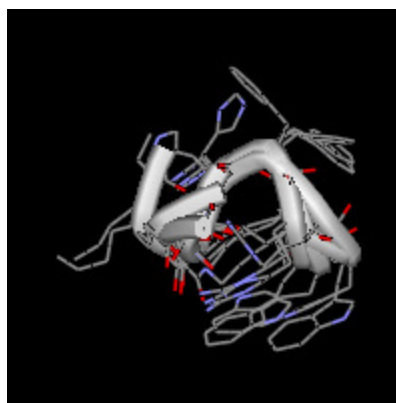


Figura 2.2.B. Superposició de 3 conformacions d'**MT2**. S'observa la conservació de la zona de gir beta.

Malgrat que en les superposicions globals nosaltres no observem conservació de la orientació a l'espai dels anells aromàtics de la His⁶ i de la D-Phe⁷ que segons el que està descrit estan paral·leles, sí que en alguna de les conformacions s'aprecia aquesta disposició de π -stacking. No obstant això, era curiós que en el nostre cas únicament hi havia 4 estructures de les 13 de mínima energia que presentaven el π -stacking descrit.

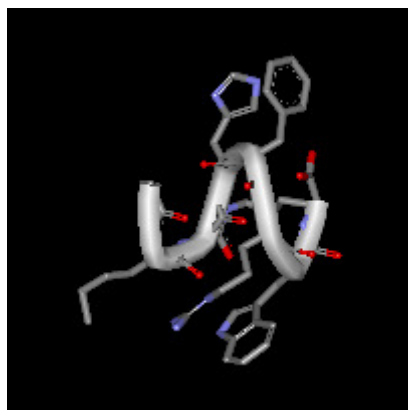


Figura 2.3. Conformació que mostra el π -stacking imidazole-benzè

Aquest primer estudi ens va permetre validar el nostre mètode de càlcul, i a més, comparant-lo amb els resultats descrits a la literatura, vàrem comprendre que hi hagués algunes discrepàncies. Així, es posa de manifest que no hi ha una sola família de conformacions, la qual cosa pot dificultar les interpretacions de les relacions estructura-activitat.

Quan vàrem fer els càlculs en els que posàvem com a restricció els angles corresponents a gir beta tipus II, només 2 de les 11 conformacions de mínima energia que vàrem obtenir presentaven el π -stacking proposat per Hruby.

2.4.2. Anàlisi conformacional del ψ -melanotan (121a-b)

Un cop establert el mètode, vàrem doncs iniciar l'estudi dels pseudo-melanotans que incorporen l'anell lactàmic com a dipèptid de conformació restringida.

És conegut que els lactams fan que la cadena on s'incorporen es plegui. Concretament solen formar-se girs beta o gamma. En un treball anterior del nostre grup, s'havia dut a terme l'anàlisi conformacional del pseudipèptid Trp-Gly, i s'havia observat que la seqüència Ac-{Trp}-Leu-NH₂ té molta tendència a formar girs de tipus beta-II i girs gamma.⁵

Per tant era d'esperar que la introducció del lactam {Trp} en el ψ -melanotan **120a-b**, provoqués un plegament en aquesta zona. El que també calia determinar, i no es podia preveure, era si aquesta modificació també afectaria la zona del gir beta "His⁶-D-Phe⁷" de l'estructura. Per tant també s'havien de fer els càlculs sense imposar restriccions.

Així doncs, es va procedir a realitzar els càlculs ISA sobre un model minimitzat del compost **121**, seguint el mateix protocol que pel model **MT2** (vegeu part experimental). En aquest cas vàrem obtenir 7 conformacions de baixa energia, la superposició de les quals segueixen mostrant la conservació de la zona del gir beta.

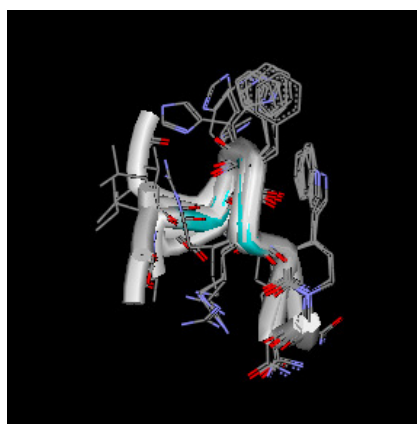


Figura 2.4. Superposició de les 5 conformacions més estables del ψ -melanotan **121**. S'observa una sola família de conformacions.

D'altra banda quan s'analitzen les conformacions, s'observa que la disposició paral·lela dels anells aromàtics de la His⁶ i de la D-Phe⁷ és més freqüent que per l'**MT2**, ja que de 7 conformacions de baixa energia que vàrem obtenir s'observà π -stacking en 5.

També s'observà clarament que en totes les conformacions del compost **20**, la zona que conté el lactam {Trp} efectivament està plegada. A més, en la superposició de les conformacions, aquesta zona de plegament també es troba altament conservada. Finalment s'observa, que la orientació a l'espai de l'indol del Trp també queda restringida, i que el nucli aromàtic s'orienta diferent que en l'**MT2**.

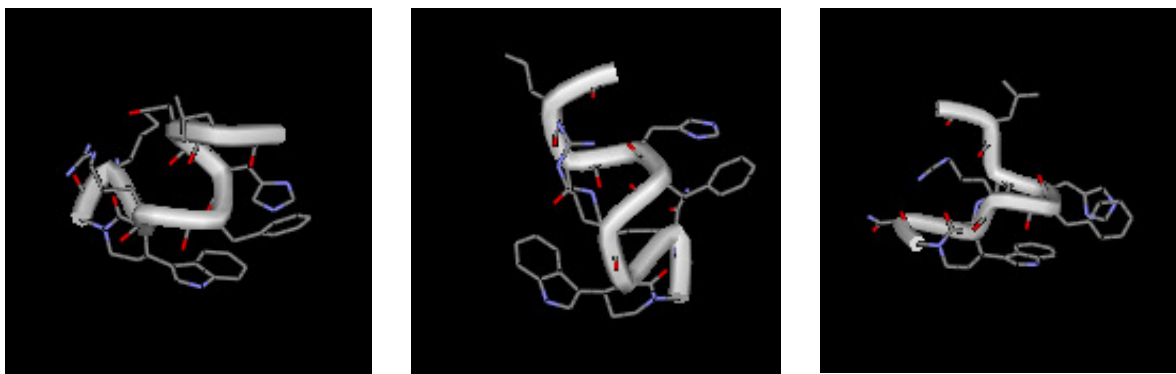


Figura 2.5. Tres conformacions representatives del compost AcNle-*ciclo*(Asp-His-D-Phe-Arg-{Trp}-Lys) (**121**), en les que s'observa el pi-stacking entre His⁶ i D-Phe⁷, el gir beta, i el plegament suplementari a la zona {Trp}.

2.5. Recapitulació

S'ha validat el mètode de càlcul per dur a terme l'anàlisi conformacional dels pseudo-melanotans més representatius, i s'ha aplicat a l'estudi del compost **121**. Aquest compost, mostra que la introducció del lactam {Trp} no afecta la conservació del gir beta del lloc actiu del **MT2** model, en canvi introdueix una restricció conformacional en la molècula, en forma d'un plegament suplementari a la zona flexible, i on l'indole ocupa un espai conformacional molt més restringit que en el model **MT2**.