

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "LA SAPIENZA"

FACOLTA' DI FARMACIA

DIPARTIMENTO DI STUDI FARMACEUTICI

TESI DI DOTTORATO IN SCIENZE FARMACEUTICHE

XVIII CICLO

PEPTIDOMIMETICI BIOATTIVI

**Progettazione, sintesi, studi conformazionali e di relazione
struttura attività**

Dottorando

Dr. Adriano Mollica

Tutor

Chiar.mo Prof. Mario Paglialunga Paradisi

INDICE

1. **Introduzione:** Strategie per la progettazione di peptidomimetici a partire dal ligando naturale (parent).
2. **Aminoacidi Chimera**
 - 2.1. *Analoghi del Glutathione contenenti Pro-Glu chimera*
 - 2.2. *Analoghi dell' fMLF-OMe contenenti Pro-Met chimera*
3. **Utilizzazione di β -aminoacidi nella sintesi di α/β peptidi misti**
 - 3.1. *α/β mixed peptides: analoghi dell' fMLF-OMe*
 - 3.2. *β -peptidi contenenti un residuo aminoacidico disostituito $\beta^{2,2}$ e $\beta^{3,3}$*
4. **Studi conformazionali su oligopeptidi**
5. **Peptidi Opioidi**
 - 5.1. *Peptidi opioid dimeri: analoghi della Bifalina*
6. **Elenco delle Pubblicazioni prodotte durante il triennio 2003-2005**
 1. *Peptide backbone folding induced by the C $^{\alpha}$ -tetrasubstituted cyclic α -amino acids 4-amino-1,2-dithiolane-4-carboxylic acid (Adt) and 1-aminocyclopentane-1-carboxylic acid (Ac5c). A joint computational and experimental study.*
Org. Biomol. Chem. **2003**, *1*, 1980-88.
 2. *Conformational properties of beta-residue-containing oligopeptides in apolar solvent.*
J. Mol. Struct. **2005** (available on line).
 3. *Synthesis and biological activity of the first cyclic biphalin analogues.*
Bioorg. Med. Chem Lett. **2006** (available on line).
 4. *Synthesis and biological evaluation of new biphalin analogues with non-hydrazine linkers.*
Bioorg. Med. Chem Lett. **2005**, *15*, 2471-2475.
 5. *Peptides containing 4-amino-1,2-dithiolane-4-carboxylic acid (Adt): conformation of Boc-Adt-Adt-NHMe and NH \cdots S interactions.*
J. Pept. Sci. **2005**, *11*, 104-112

6. *Chemotactic peptides: fMLF-OMe analogues incorporating proline-methionine chimeras as N-terminal residue.*

Bioorg. Med Chem. **2005** (available on line).

7. *Proline-Glutamate Chimeras in Isopeptides. Synthesis and Biological Evaluation of Conformationally Restricted Glutathione analogues.*

Bioorg. Med. Chem. **2003**, *11*, 1977-83.

8. *Hybrid α/β^3 -peptides with proteinogenic side chains. Monosubstituted analogues of the chemotactic tripeptide For-Met-Leu-Phe-OMe.*

J. Pept. Sci. **2004**, *10*, 510-523.

9. *Hybrid α/β peptides: For-Met-Leu-Phe-OMe analogues containing geminally disubstituted $\beta^{2,2}$ - and $\beta^{3,3}$ -amino acids at central position.*

Amino acids, **2005** (accepted on 08 Sept 2005)

1. Introduzione

Strategie per la progettazione di peptidomimetici partire dal ligando naturale

Gli ormoni peptidici, i neurotrasmettitori, le citochine, i fattori di crescita, gli antigeni ecc, costituiscono la gran parte dei ligandi regolatori negli animali superiori, e quindi sono stati oggetto di ricerca e sviluppo per molti anni. Uno dei principali obiettivi di queste ricerche e' stato quello di determinare le proprietà strutturali, conformazionali, topografiche e dinamiche dei ligandi peptidici che determinano la loro attività (cioè la delucidazione della conformazione bioattiva del farmacoforo) ¹.

Negli ultimi 30 anni, si è iniziato a sviluppare un valido metodo di progettazione razionale di peptidomimetici, con particolare attenzione alle metodologie per bloccare le catene peptidiche dei residui aminoacidici chiave, nella conformazione bio-attiva.

Gli studi pionieristici sugli effetti conformazionali dell' uso della β -dimetil cisteina (penicillamina) in peptidi ciclici con ponte disolfuro e la possibilità di isomeria cis e trans intorno al legame R-CO-N- all' azoto prolinico, dimostrarono l' importanza di usare una conformazione ristretta nella progettazione di ligandi peptidici. Allo stesso tempo iniziò ad essere evidente che il target per questi ligandi erano le proteine di membrana e sia i ligandi che i loro recettori, oggi comunemente noti come recettori accoppiati a una proteina G (GPCRs) controllano e/o modulano molti dei processi biologici cruciali dell' uomo (come: sensazione di appetito e di paura, pigmentazione,

assuefazione, comportamenti sessuali, risposta allo stress, funzione cardiovascolare, apprendimento e processi cognitivi).

Oggi è noto che più del 50 % dei farmaci disponibili esplicano la loro attività attraverso l'interazione con recettori di membrana.

Successivamente Ramachandran e collaboratori, studiarono lo spazio conformazionale accessibile al backbone peptidico, che è definito da tre angoli torsionali ϕ , ψ , e ω . Usando semplici metodi computazionali, essi dimostrarono che solo certe conformazioni spaziali limitate sono disponibili per la maggior parte degli α -aminoacidi (eccetto la glicina) e che le conformazioni accessibili a bassa energia erano, le α eliche, i β sheets, altre strutture estese, γ e β turns. Più tardi sono stati applicati campi di forza più sofisticati e calcoli quanto-meccanici, ma le conclusioni di base rimangono le stesse, e ulteriori studi cristallografici con x-ray hanno verificato significativamente gli studi di Ramachandran².

La tabella 1 fornisce un riassunto dei più importanti approcci che sono stati sviluppati per la modifica di peptidi bioattivi.

Tab. 1 Approccio schematico alla progettazione di peptidomimetici.

- 1) Identificazione del Lead Compound Bioattivo: (da prodotti naturali, o da uno screening ad ampio spettro di librerie di prodotti).
 - 2) Determinazione degli aminoacidi critici o essenziali per la bioattività: scan dell' alanina, scan con D-amino acidi, troncamenti e eliminazione di residui aminoacidici.
 - 3) Identificazione del farmacoforo lineare ed eventualmente differenziazione tra sequenze che determinano l' attivita' e sequenze che determinano la selettivita'.
 - 4) Identificazione della conformazione bioattiva: Costrizioni locali, costrizioni globali mediante l' uso di ciclizzazioni, aminoacidi chimera, aminoacidi topograficamente costretti e templati.
 - 5) Valutazione di diversi scaffold non peptidici per il posizionamento degli elementi chiave del farmacoforo.
 - 6) Progettazione e sintesi di peptidomimetici non peptidici.
-

Sebbene i peptidi naturali attivi abbiano un grande potenziale di applicazione medica, essi richiedono spesso di essere modificati per bypassare i problemi inerenti le strategie moderne del rilascio farmaceutico. Tra le proprietà desiderate (spesso non presenti o non ottimizzate nel ligando naturale) abbiamo: selettività accettore/recettore; alta potenza; stabilità contro l' inattivazione proteolitica, appropriata biodistribuzione e biodisponibilità.

La ricerca sui peptidomimetici è drammaticamente avanzata nelle ultime 2 decenni e quello che si è evoluto un approccio gerarchico alla progettazione razionale dei peptidomimetici³.

Una volta che la struttura naturale è stata delucidata, la prima fase di questo approccio razionale è costituita dall' identificazione degli aminoacidi chiave necessari al

riconoscimento recettoriale. Simultaneamente, vengono create costrizioni locali sul backbone del ligando (per fissare valori degli angoli ϕ , φ , ω) per favorirne il riconoscimento molecolare.

Alternativamente, si può introdurre una costrizione globale per formare un template rigido che porta tutti gli elementi strutturali che compongono il farmacoforo. Sono così prodotti peptidi con una conformazione rigida o semirigida e le strutture più attive possono essere selezionate per studiare le relazioni conformazione-attività.

La terza fase è l'analisi attenta dell'arrangiamento 3D delle catene laterali responsabili dell'attività. Questi studi necessitano di esperimenti spesso complessi di spettroscopia NMR, Raggi X e, se possibile, misure di dicroismo circolare e metodi computazionali (calcoli di dinamica e meccanica molecolare).

In molti casi, studi simili possono portare a farmaci candidati, altamente potenti, efficaci e selettivi, che saranno poi il punto di partenza per futuri studi mirati al design di peptido-mimetici non peptidici. In questo ultimo caso, il lavoro più difficile è quello di trovare altre molecole non peptidiche che possano rimpiazzare lo scaffold peptidico e posizionare gli elementi cruciali per il riconoscimento col recettore, nelle posizioni corrette.

Bibliografia

1. (a) Hruby, V. J. and Slate C. A. *Advances in Amino Acid Mimetics and Peptidomimetics* **1999**, 2, 191-220 and Refs. cited therein. (b) Hruby, V. J. and Mosberg, H. I. *Peptides*, **1982**, 3, 329-336 and Refs. cited therein.
2. Hruby, V. J. And Balse, P. M. *Current med. Chem.* **2000**, 7, 945-970 and Refs. cited therein.
3. Cowell, S. M.; Lee, Y. S.; Cain, J. P. and Hruby V. J. *Current Med. Chem.* **2004**, 11, 2785-2798 and Refs. cited therein.

2. Aminoacidi chimera ¹

In letteratura sono presenti numerosi lavori che riguardano la 4-idrossiprolina (Figura 1) come punto di partenza per la sintesi di nuovi aminoacidi chimera, non proteinogenici, che sono mimetici a conformazione ristretta di altri aminoacidi. In particolare, nel nostro laboratorio abbiamo deciso di sfruttare l' analogia strutturale della 4-carbossi-prolina con l' acido glutammico e della 4-thiometil-prolina con la metionina.

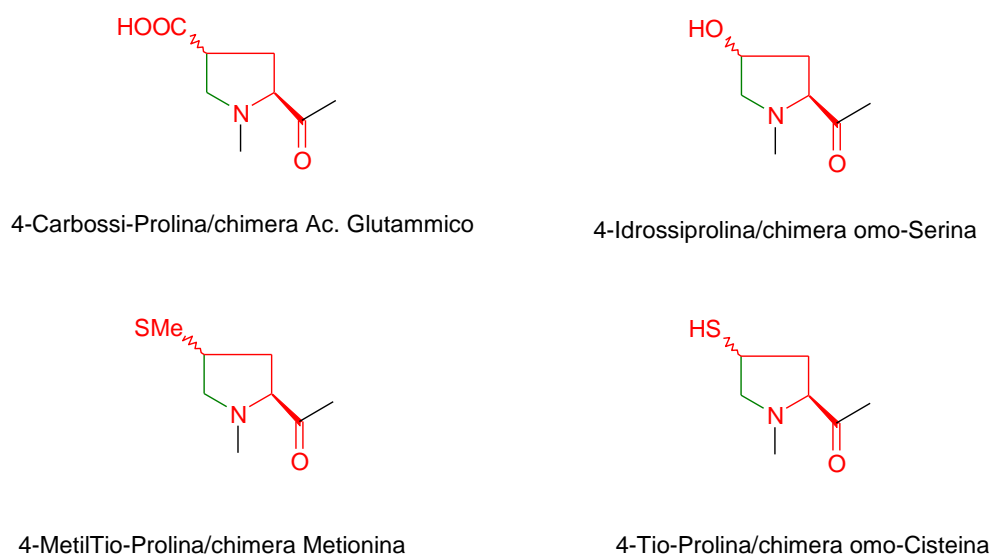


Figura 1. Alcuni aminoacidi chimera della prolina

Bibliografia

1. See: R. Sharma and W.D. Lubell. *J. Org. Chem.* 61 (1996), pp. 202–209 and Refs. 1–7 cited therein .

2.1 Prolina-Glutammato. Sintesi ed attività biologica di analoghi del glutatione conformazionalmente ristretta

Il glutatione nella sua forma ridotta (GSH) è il tripeptide γ - L-glutammil- L-cisteinilglicina; esiste soprattutto come GSH ma è anche presente come dimero disolfuro (GSSG)

Gli aspetti chimici più interessanti di questo composto sono la presenza di un gruppo SH libero e di un legame γ -glutammil isopeptidico fra il carbossile della catena laterale del glutammico e il gruppo amminico della cisteina, lasciando così l'altro carbossile vicino al gruppo amminico terminale. La natura isopeptidica del legame glutammilico lo rende resistente alla scissione da parte della maggior parte delle peptidasi. La struttura elettronica dell'atomo di zolfo (disponibilità di orbitali-d che permettono l'overlap durante la formazione dello stato di transizione e la dissipazione di elettroni trasferiti da radicali) è responsabile dell'alta reattività del solfidrile nei riguardi dell'addizione nucleofila, reazioni di ossidoriduzione (attraverso meccanismo ionico o radicalico) e chelazione di metalli. Tutte queste proprietà sono connesse con gli effetti antiossidanti e detossificanti di composti naturali contenenti il gruppo SH.

I ruoli rilevanti e multifunzionali giocati dal glutatione in una varietà di processi biologici, fra cui detossificazione xenobiotica e protezione contro le radiazioni-continua a stimolare studi teorici e sperimentali.¹⁻⁸ Inoltre, la semplicità strutturale ed il basso peso molecolare rende la molecola del GSH un obiettivo attraente per modificazioni chimiche; così, un gran numero di analoghi strutturali sono stati progettati e sintetizzati.^{9,10} Come risultato di queste ricerche si è ottenuta una miglior

comprensione delle interazioni con i siti catalitici dell'enzima e sono stati sviluppati inibitori più potenti, stabili e selettivi.

Come estensione di questi studi, abbiamo progettato gli analoghi **1** e **2** in cui l'intera unità γ -glutammilica è sostituita dal residuo della *cis* e *trans* 4-carbossi-L-prolina, rispettivamente (Fig. 1).

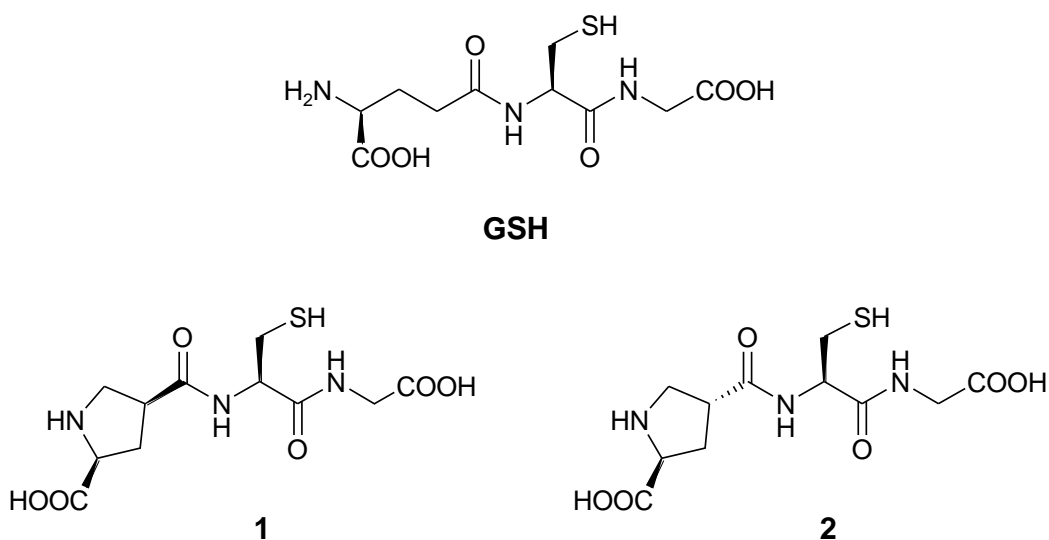


Figura 1. GSH e suoi analoghi contenenti un residuo di Pro/Glu chimera *cis* (**1**) o *trans* (**2**)

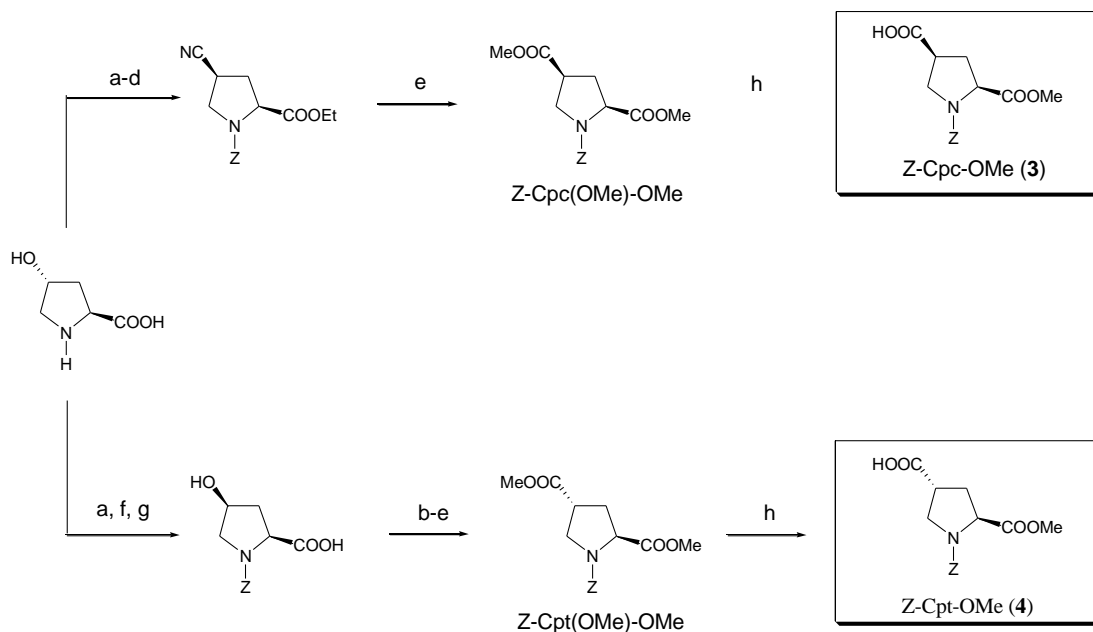
La prolina è il solo amminoacido proteinogenico che possiede una conformazione naturalmente ristretta, caratterizzata dalla presenza di un anello pirrolidinico in cui il legame N-C α è inserito; così, l'uso dell'anello prolinico chirale e completamente rigido come templatò per supportare funzionalità tipiche di altri amminoacidi (vale a dire chimere prolina-amminoacido) è un approccio attivamente seguito per ottenere peptidomimetici dotati di specifiche restrizioni locali e migliorata stabilità metabolica.^{11,12} Per quanto concerne chimere prolina-glutammato, un esame

della letteratura mostra che, mentre *cis*-e *trans*- 4-carbossi-L-proline sono state sintetizzate ed esaminate per la loro attività in processi della neurotrasmissione come mimici del conformero glutammato,¹³ la loro incorporazione in peptidi biologicamente attivi è molto limitata e non ci sono dati riguardanti l'uso della prolina come template del residuo glutammilico.¹⁴ Così i composti **1** e **2** rappresentano i primi esempi riportati di analoghi isopeptidici in cui è stata applicata questa strategia di modifica. Infine, si può osservare che entrambi i nuovi analoghi mantengono, se confrontati con il GSH nativo, tutti i gruppi funzionali capaci di stabilire efficienti interazioni non leganti; l'unica differenza, riguardo a queste proprietà, è infatti rappresentata dalla presenza di un gruppo amminico secondario al posto di quello primario alla parte N-terminale della molecola. Inoltre, la rilevante restrizione conformazionale imposta sul backbone dall'anello pirrolidinico come pure l'opposta orientazione spaziale del carbonile- γ ammidico nei due analoghi può influenzare profondamente la reattività verso enzimi dipendenti dal GSH e rendere **1** e **2** utili strumenti per ottenere informazioni sulle caratteristiche strutturali dei siti attivi coinvolti.

Risultati e Discussione

E' stata presa in considerazione come una conveniente via agli analoghi del GSH **1** e **2** l'incorporazione dei residui di *cis*-e *trans*- 4-carbossi-L-proline (Cpc e Cpt, rispettivamente) nel frammento Cys-Gly. Così sono stati sintetizzati i due *cis*-e *trans*-N-(benzilossicarbonil)-4-carbossi-L-prolina-1-metilesteri Z-Cpc-OMe **3** e Z-Cpt-OMe **4** come intermedi chiave (Schema 1). In accordo con la procedura precedentemente riportata da Bridges ed altri¹⁷ la *trans*-4-idrossi-L-prolina commercialmente disponibile

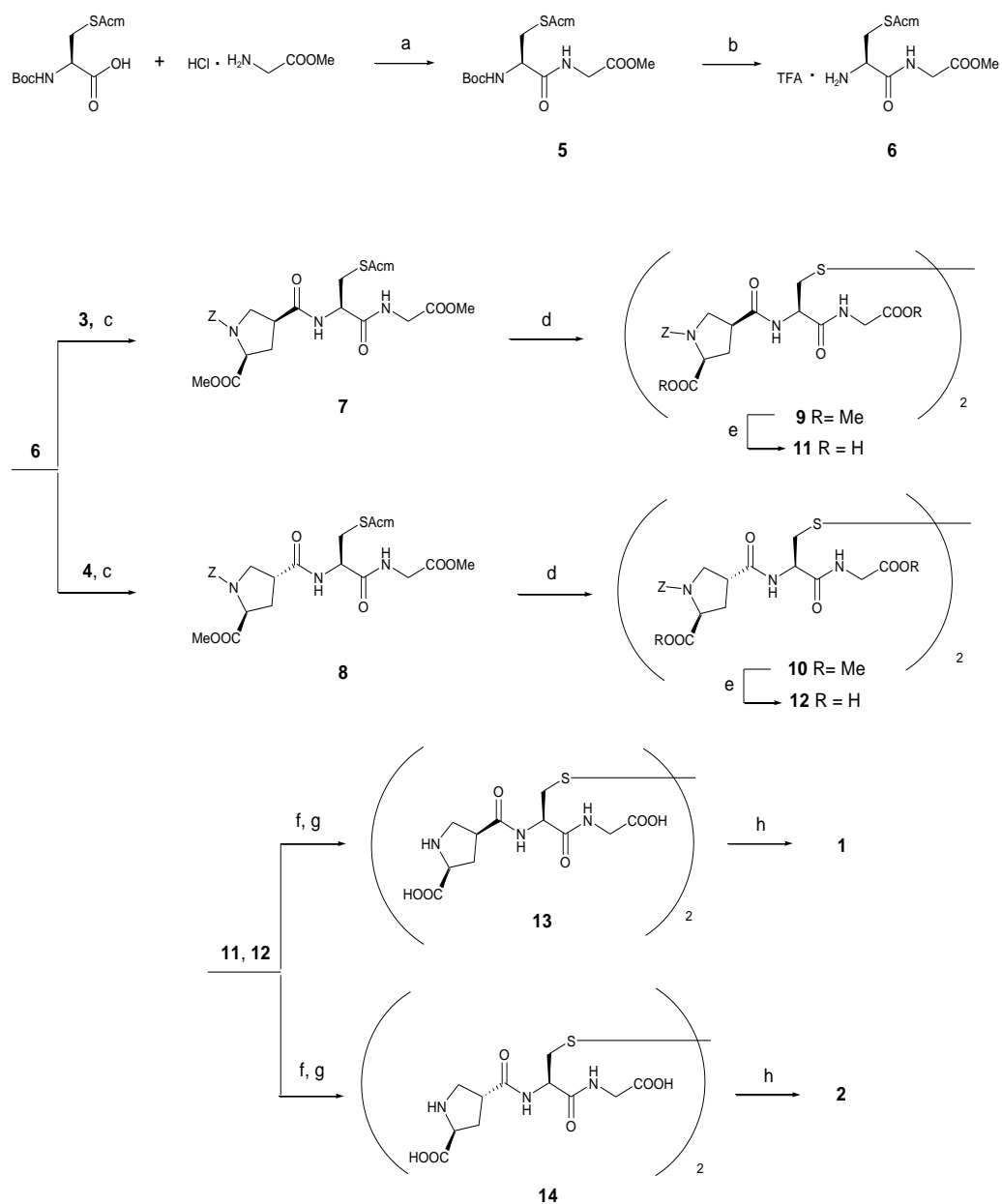
è stata usata come materiale di partenza per sintetizzare entrambi i diesteri Z-Cpc(OMe)-OMe e Z-Cpt(OMe)-OMe (Schema 1). La successiva idrolisi regioselettiva del gruppo estereo al C-4 rappresenta un passaggio critico. Dopo diversi tentativi abbiamo trovato che si può ottenere un'alta selettività accompagnata da buone rese di entrambi gli isomeri *cis* e *trans* **3** e **4** quando i corrispondenti dimetil esteri vengono trattati con una quantità equimolare di NaOH 1N in tetraidrofurano acquoso (Schema 1).



Schema 1. Reagenti e condizioni (vedi anche rif. 17): (a) ClCO₂CH₂Ph, NaHCO₃, H₂O, PhCH₃, 16 h, rt; (b) EtOH, *p*-TsOH, 16 h, reflux; (c) TsCl, py, 72 h, rt; (d) NaCN, DMSO, 80 °C, 4 h; (e) HCl, MeOH, 84 h, rt; (f) Jones reagent, acetone, 10 min, -5 °C then 2.5 h, rt; (g) NaBH₄, MeOH, 20 h, -5 °C; (h) THF, NaOH 1 N, 0.5 equiv., 30 min, 0 °C then 1 h, rt.

La struttura come anche la stereochimica dei monometil esteri **3** e **4** sono in chiaro accordo con i loro spettri ^1H NMR. Così quando si esamina lo spettro del *cis* monometilestere **3** e si confronta con quelli dei relativi dimetil esteri, il singoletto corrispondente al gruppo -OMe al C-4 è assente e si può osservare solo la coppia di singoletti che sono tipici del gruppo OMe al C-1 e sono dovuti, come aspettato, alla ristretta rotazione intorno al legame CO-N della prolina. Inoltre i diversi patterns di risonanza esibiti dai monoesteri *cis* e *trans* permette l'esclusione di una cross-contaminazione dovuta all'epimerizzazione ad uno dei due centri chirali durante l'idrolisi. Analoghe considerazioni, dedotte dall'analisi degli spettri ^1H NMR, sono state fatte a proposito della stereochimica del *trans* monometil estere **4**.

La sintesi dei due analoghi del GSH conformazionalmente ristretti **1** e **2** è stata condotta secondo lo schema 2. In vista delle blande condizioni di reazione per la protezione, si è scelto il gruppo acetammidometil (Acm) per proteggere la funzione tiolica della cisteina. Quindi, gli Acm-derivati **7** e **8** sono stati sintetizzati condensando Z-Cpc-OMe o Z-Cpt-OMe **3** e **4**, rispettivamente, con il Cys(Acm)-Gly-OMe trifluoroacetato **6** (Schema 2) seguendo le metodologie della chimica dei peptidi in soluzione.



Scheme 2. Reagenti e condizioni: (a) DCCI, NMM, THF, 0 °C, 3 h then 5 °C, 16 h; (b) TFA, 1 h, rt; (c) isobutyl chloroformate, TEA, THF, -15 °C, 15 min then 0 °C, 2 h and 5 °C, 16 h; (d) I₂, MeOH, 4 h, rt; (e) NaOH 1 N, THF, 0 °C, 30 min then 16 h, rt; (f) HBr/CH₃COOH, 5 h, rt; (g) 2 N aq. ammonia, rt, 30 min; (h) (*n*-But)₃P, *n*-PrOH-H₂O, 3 h, rt.

Spettri ¹H NMR dei due tripeptidi **7** e **8** non evidenziano la presenza di specie diastereomeriche, confermando così l'integrità stereochimica dei monoesteri di partenza **3** e **4**. La rimozione selettiva (I₂ in MeOH a temperatura ambiente) del gruppo

proteggente Acm ha permesso la conversione diretta di **7** e **8** nei disolfuri simmetrici *N*-protetti **9** e **10**. La successiva rimozione in due tappe di tutti i gruppi protettivi, seguita da trattamento dei risultanti bromidati con ammoniaca acquosa ha portato agli analoghi del GSSG **13** e **14** completamente deprotetti, con buone rese. I desiderati analoghi del GSH **1** e **2** in forma tiolica sono stati ottenuti per scissione riduttiva del legame disolfuro con tri-*n*-butilfosfina (1,2 equivalenti) in soluzione di acqua/*n*-propanolo, operando a pH 8.5 (ammoniaca acquosa). Spettri di massa di **1** e **2** mostrano i picchi più abbondanti corrispondenti alle specie M^+1 (320 *m/z*). Le strutture assegnate agli analoghi del GSH **1** e **2** sono in accordo con le loro proprietà spettroscopiche (vedi parte sperimentale). Un aspetto caratteristico dello spettro ^{13}C di **1** e **2** è rappresentato dalla risonanza del carbonio β della cisteina che è sciftato a campo più alto (32,45 e 25,43 ppm) se confrontato con i corrispondenti atomi nei precursori disolfuro **13** e **14** (38.90 e 38.87 ppm, rispettivamente). Questo aspetto negli spettri ^{13}C rappresenta, come recentemente notato,¹⁶ un'attendibile caratteristica diagnostica che permette di distinguere fra forme contenenti cisteina o cistina.

Conclusioni

Questi analoghi rappresentano i primi modelli in cui la libertà conformazionale del nativo GSH è stata ridotta con l'introduzione di un equivalente ciclico del residuo glutammato.

Come precedentemente descritto, l'attività biologica degli analoghi **1** e **2** è stata testata sulla γ -GT e sulla GST. I composti **1** e **2** non sono né substrati né inibitori della

γ -GT; questi risultati mostrano chiaramente che il backbone conformazionalmente ristretto di questi analoghi non sembra compatibile con il binding al sito donatore della γ -GT rendendo così questi modelli resistenti alla degradazione enzimatica da parte di questo enzima.

È ben noto che il residuo γ -glutammilico è il principale determinante di binding per l'interazione GSH-GST, dando interazioni polari multiple con specifici residui della proteina, che sono Asp98, Gln64 e Ser65.¹⁷ I risultati qui riportati indicano che l'arrangiamento spaziale transoide che coinvolge i gruppi carbossilici legati al C $^{\alpha}$ e al C $^{\gamma}$ pirrolidinici, presente nell'analogo **2**, rappresenta la conformazione favorita per il binding al sito attivo della GST. Comunque, altre indagini sono necessarie al fine di definire quali delle caratteristiche strutturali e conformazionali che distinguono gli analoghi **1** e **2** dal GSH nativo sono specificamente responsabili della selettività di binding al sito attivo dell'enzima.

Si dovrebbe a questo punto ricordare che la superfamiglia delle GSTs può giocare un ruolo importante nella resistenza cellulare alle tossine elettrofile estranee come pure a molti farmaci anticancro che hanno anch'essi una natura elettrofila.¹⁸ In particolare, l'isoforma hGST P1-1 rappresenta un attraente bersaglio dal momento che si è trovato che è sovra espresso in alcuni tumori solidi, diminuendo così l'efficacia di farmaci citotossici.¹⁹ Di conseguenza la versatilità dell'approccio sintetico descritto nella presente tesi, che si fonda sull'utilizzazione di uno scheletro della 4-carbossiprolina chirale come mimico conformero del glutammato potrebbe dare origine a nuovi interessanti stabili inibitori GSH della peptidasi portando ad un potenziamento dei convenzionali agenti antineoplastici nella terapia contro i tumori.

Bibliografia

1. Lyon, R. P.; Atkins, W. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4408.
2. Rauk, A.; Armstrong, D. A.; Berges, J. *Can. J. Chem.* **2001**, *79*, 405.
3. Diaz, S.; Gonzáles, A.; Gonzáles de Riancho, S.; Rodríguez, A. *J. Organomet. Chem.* **2000**, *610*, 25.
4. Duckert, J. F.; Balas, L.; Rossi, J. C. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 3709.
5. Cavero, M.; Hobbs, A.; Madge, D.; Motherwell, W. B.; Selwood, D.; Potier, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 641.
6. Burg, D.; Filippov, D. V.; Hermanns, R.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H.; Mulder, G. J. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 195.
7. Burg, D.; Hameetman, L.; Filippov, D. V.; van der Marel, G. A.; Mulder, G. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1579.
8. Li, Y.; Carter, D. E.; Mash, E. A. *Synthetic Commun.* **2002**, *32*, 1579.
9. Douglas, K.T. In *Offprints from Glutathione: Chemical, Biochemical and Medical Aspects*; Dolphin, D.; Poulson, R.; Avramovic, O. Eds.; Wiley & Sons, Inc. New York, 1989, Part A, pp. 243.
10. Lucente, G.; Luisi, G.; Pinnen, F. *Il Farmaco* **1998**, *53*, 721.
11. Sharma, R.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 202, and references therein.
12. Kitas, E. A.; Loeffler, B. M.; Daetwyler, S.; Dehmlow, H.; Aebi, J. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1727.
13. Bridges, R. J.; Stanley, M. S.; Anderson, M. W.; Cotman, C. W.; Chamberlin, A. R. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 717.
14. Herman, J. P. Eur. Patent 0 334 244 A2, 1989; *Chem. Abstr.* **1990**, *112*, 119449.
15. Kamber, B. *Helv. Chim. Acta* **1971**, *54*, 927-930.
16. Sharma, D.; Rajarathnam, K. *J. Biomol. NMR* **2000**, *18*, 165.
17. Oakley, A. J.; Lo Bello, M.; Battistoni, A.; Ricci, G.; Rossjohn, J.; Villar, H. O.; Parker, M. W. *J. Mol. Chem.* **1997**, *274*, 84-100.
18. Salinas, A. M.; Wong, M. G. *Curr. Med. Chem.* **1999**, *6*, 279 and references therein.
19. O'Brien, M. L., Tew, K. D. *Eur. J. Cancer* **1996**, *32A*, 967.

2.2 Analoghi dell' fMLF-OMe contenenti un residuo N-terminale Prolina-Metionina chimera

Fin dalla prima scoperta che i peptidi contenenti formil-methionina erano potenti agonisti per i recettori chemotattici dei neutrofili, il peptide fMLF e il suo metilestere sono stati scelti come molecole di riferimento per una ricerca sistematica sui meccanismi biochimici e le relazioni struttura attività [1,2]. I risultati di questi studi stabiliscono con chiarezza l' importanza della catena laterale contenente il gruppo tioetere presente nella catena laterale della methionina, è essenziale per il riconoscimento molecolare che per l' attività biologica. Infatti, sebbene sono ben tollerate, profonde alterazioni sul residuo della leucina e della fenilalanina, le modificazioni sulla metionina sono piu' critiche [3,4] e portano, eccetto rare eccezioni [2-4] alla perdita dell' attività.

Per spiegare questa situazione, e' stato proposto un modello recettoriale, dove e' presente un' area che porta una carica positiva che interagisce con l' atomo di zolfo della catena laterale della metionina [2]. Un accurato esame della letteratura rivela che le modificazioni relative al residuo della metionina sono molto scarse [5-7].

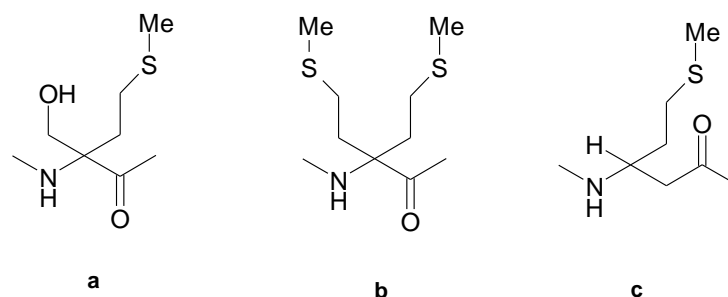


Figure 1. Aminoacid residues, containing the γ -methylthio functionality, used to replace the native methionine in synthetic fMLF analogues: (a) C $^{\alpha}$ -Hydroxymethyl methionine (HmMet); (b) 2-[2'-(methylthio)ethyl]methionine (BisMet); (c) β^3 -HMet.

E' quindi sembrato interessante esaminare un nuovo analogo dell' fMLF-OMe che incorporasse un residuo *N* terminale mimetico della metionina, ma che avesse delle ristrezioni conformazionali relativamente all' orientazione della catena laterale (angoli χ^1 e χ^2) (figura 2).

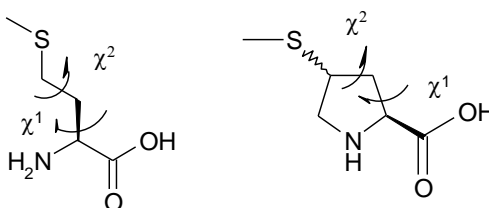


Figura 2. χ -space

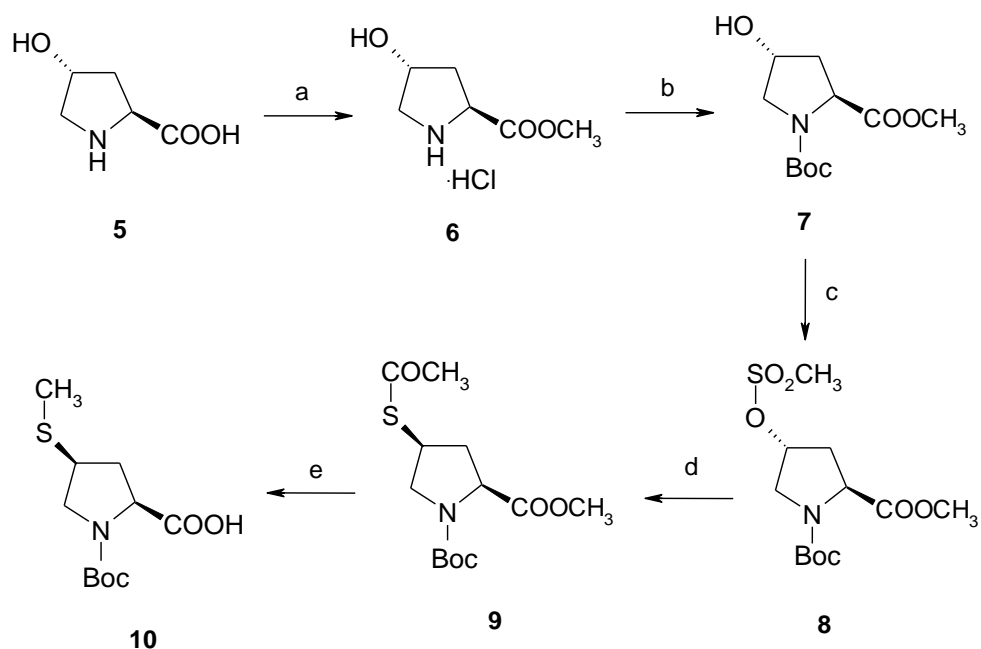
Questo aminoacido, infatti, sembra essere adatto a dare informazioni relative all' orientamento spaziale della catena laterale della metionina e le sue relazioni con l' attivita' biologica.

L' aminoacido Chimera Pro-Metionina, nelle sue 2 forme stereoisomeriche cis e trans e' stato quindi usato per la sintesi di 2 analoghi dell' fMLF-OMe e dei relativi Boc derivati.

Questi nuovi ligandi, mantengono la funzione tiometil-etero della methionina nativa, ma essendo legata covalentemente all' anello pirrolidinico della prolina gli angoli χ^1 e χ^2 vengono a trovarsi gia' fissati. Inoltre al fine di valutare l' effettiva validita' dei modelli ed escludere la possibilita' che l' attivita' dipendesse dalla presenza della prolina in prima posizione, sono stati sintetizzati e testati anche gli analoghi contenenti Pro non sostituita.

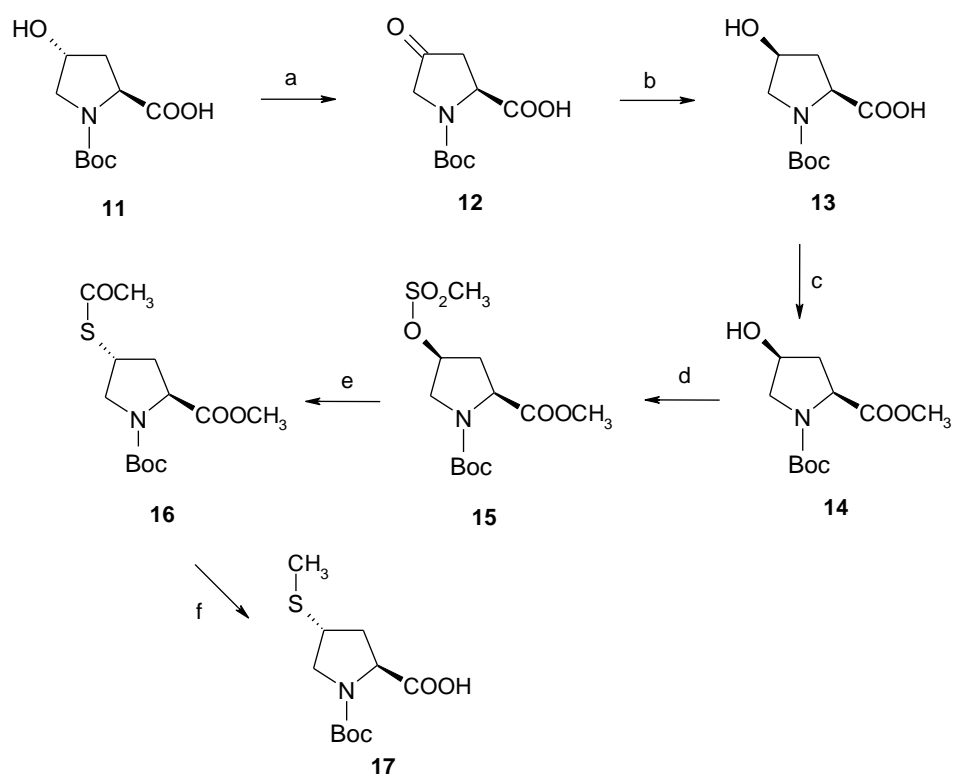
Sintesi

In letteratura, la sintesi degli aminoacidi 4-cis e 4-trans-SMe-Pro, e' stata affrontata da diversi autori [8-11]. Sebbene gli stereoisomeri 4S, 2S e 4S, 2S non erano stati ancora sintetizzati, la maggior parte delle sintesi pubblicate sfruttavano la reazione di Mitsunobu per trasformare il gruppo alcolico dell' idrossiprolina con gruppo tiolico. Noi abbiamo usato un approccio differente, e per certi aspetti (economici e pratici) migliore (vedi schema 1).

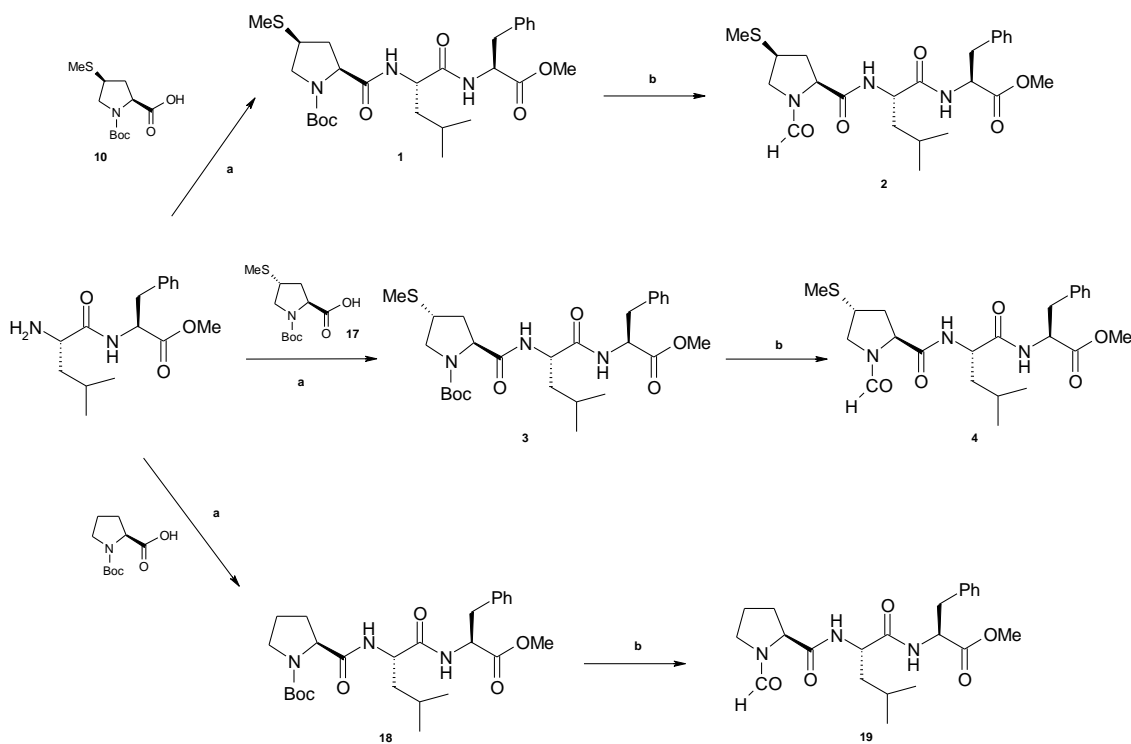


Scheme 1. Reagents and conditions: (a) $\text{SOCl}_2/\text{MeOH}$ 2 h at rt, then 4 h at 45 °C (b) Boc_2O , Dioxane/ Na_2CO_3 ; (c) MsCl , TEA, CH_2Cl_2 , 20 min at 0 °C; (d) $\text{KSCOCH}_3/\text{DMF}$, 4 h at 65 °C; (e) 1N NaOH and MeO_2SO_2 30 min at rt, then 1N NaOH , 3 h at rt.

L' analogo **10** N-Boc-Cis e' stato ottenuto a partire dalla 4-trans-idrossi prolina, che e' stato trasformato del corrispondente mesilato **8**, che tramite sostituzione nucleofila con potassio tioacetate ha dato luogo al relativo thioestere **9** con inversione di configurazione in posizione **4**. Il thioestere e' stato poi saponificato in condizioni blande e il gruppo tiolico cosi' ottenuto e' stato metilato. Il residuo trans **17**, e' stato sintetizzato a partire dalla Boc bidrossiprolina, secondo lo schema 2. La riduzione stereoselettiva mediante NaBH_4 [12] dell' intermedio chetonico **12**, ha fornito la Boc-cis idrossiprolina, dalla quale poi tramite la via precedentemente illustrata per l' isomero cis, ha permesso di arrivare all' isomero trans (doppia inversione di configurazione). I residui di Pro-met chimera cosi' ottenuti, sono stati poi condensati con il dipeptide H-Leu-Phe-OMe, e successivamente i 2 tripeptidi cosi' ottenuti sono stati formilati secondo la procedura di Lajoe-Kraus (schema 3).



Scheme 2. Reagents and conditions: (a) CrO_3/Py , 30 min at $0\text{ }^\circ\text{C}$, then 90 min at rt; (b) $\text{NaBH}_4/\text{H}_2\text{O}$, MeOH , 1 h at $0\text{ }^\circ\text{C}$ and 15 h at $4\text{ }^\circ\text{C}$; (c) Diazomethane/ MeOH ; (d) MsCl , TEA , CH_2Cl_2 , 20 min at $0\text{ }^\circ\text{C}$; (e) KSCOCH_3 , DMF , 4 h at $65\text{ }^\circ\text{C}$; (f) 1N NaOH and $(\text{MeO})_2\text{SO}_2$, 30 min at rt, then 1N NaOH 3 mmol, 3 h at rt.



Scheme 3. Synthesis of *N*-protected tripeptides **1-4** and **18-19**. (a): *i*-BuOCOCrI, NMM; (b): HCOOH, EEDQ.

Studi conformazionali NMR

Allo scopo di capire quali fossero gli arrangiamenti spaziali dei 2 peptidi chemotattici, e capire l' influenza del residuo prolina-methionina chimera sulla struttura tridimensionale, sono stati fatti degli studi NMR in soluzione. Dagli spettri NOESY, possiamo ricavare le interazioni spaziali dei diversi atomi di idrogeno (vedi tabella 1).

Table 1. Observed nuclear Overhauser effects (NOEs) in the NOESY spectra of HCO-*cis*-4-mercaptomethyl-Pro-Leu-Phe-OMe (**2**) and HCO-*trans*-4-mercaptomethyl-Pro-Leu-Phe-OMe (**4**)

NOEs		Compounds ^a		NOEs		Compounds	
		2	4			2	4
Pro C ^α H Leu NH	s	s	Leu C ^α H Leu NH	m	m
Pro C ⁵ H _A H-CO	m	m	Leu C ^α H Phe NH	s	s
Pro C ^α H Pro C ⁴ H	w	--	Leu NH Phe NH	w	w
Pro C ⁵ H _A Pro C ⁴ H	m	--	Phe C ^α H Phe NH	m	m
Pro C ⁵ H _B Pro C ⁴ H	--	m	Pro C ⁵ H _A Pro SCH ₃	--	w

^a s = strong; m = medium; w = weak.

In particolare, i Noe diagnostici per l' interpretazione della conformazione sono ProC^αH...leuNH and LeuC^αH...PheNH. Questi NOEs successivi (C^α_i...N_{i+1}H) sono indicativi di un ripiegamenti a doppio γ -turn (c7)¹³.

Ulteriori informazioni sono state ottenute dallo studio dei legami idrogeno intramolecolari. I legami idrogeno intramolecolari, possono essere messi in evidenza in soluzione, attraverso l' analisi degli shift NMR dei segnali dei protoni ammidici, in presenza di quatità cresenti di DMSO-d6 alla soluzione 10mM del peptide in CDCl3. Vedi fig 1.

I dati di titolazione indicano che gli NH dei residui della Leu e della Phe sono piuttosto schermati dall'effetto elettron donatore del DMSO e quindi possiamo affermare che sono impegnati in un legame idrogeno intramolecolare.

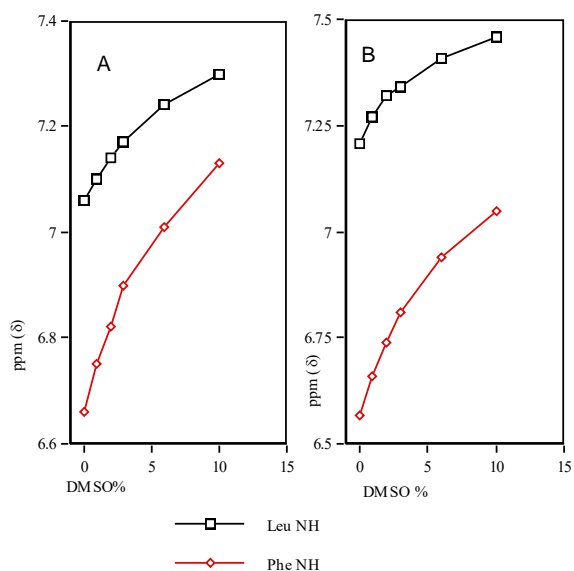


Figure 2. Plots of NH proton chemical shifts in the ^1H NMR spectra of dipeptide derivatives **2** (A) and **4** (B) as a function of increasing amounts of DMSO- d_6 (v/v) added to the CDCl_3 solution (peptide concentration 10 mM).

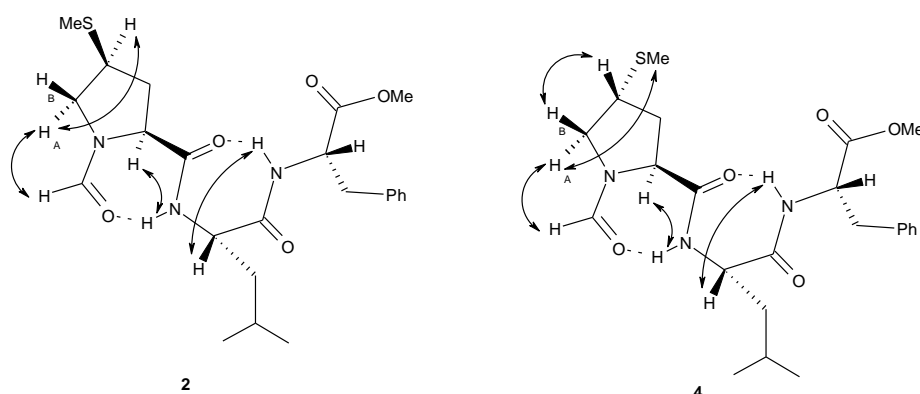


Figure 3. The double γ -turn conformation of the tripeptides **2** and **4** containing *cis* and *trans* 4-mercaptopomethyl-L-proline, respectively. Bold arrows indicate the diagnostic NOEs, dotted lines the intramolecular 1 \leftarrow 3 H-bonds.

Attività biologica

L'attività biologica è stata valutata sui formil derivati e i Boc derivati **1-4** e inoltre sugli analoghi contenenti prolina **18-19**. I risultati sono mostrati in figura 4, 5, e 6. Al contrario di quanto avviene normalmente, i peptidi (i peptidi N-formilati sono agonisti e i peptidi Boc protetti sono antagonisti) N-Boc protetti si sono dimostrati efficaci chemotattici, mentre i formil derivati non sono stati trovati attivi.

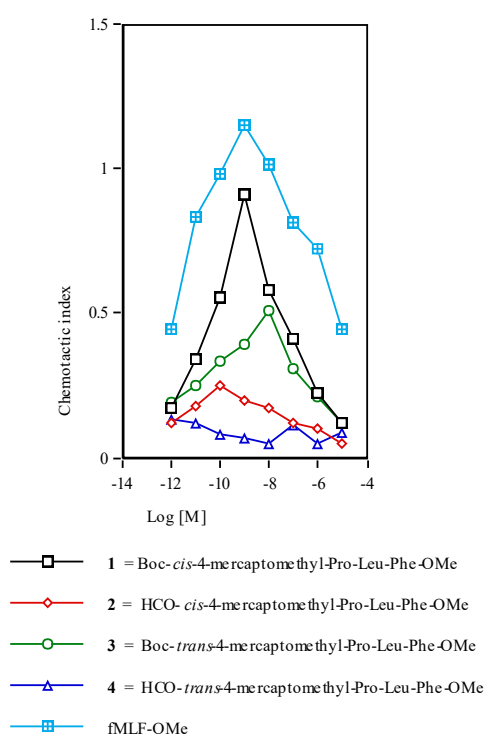


Figure 4. Chemotactic activity of tripeptide derivatives **1-4**

Questa particolare inversione dell'attività è certamente correlabile alla presenza dell'anello pirrolidinico che orienta la catena laterale della metionina in posizione non usuale. I peptidi contenenti Pro in prima posizione si sono rivelati entrambi inattivi,

dimostrando così l'importanza della catena laterale della metionina, ma escludendo anche che la particolare e inusuale attività dei Boc derivati fosse dovuta alla prolina.

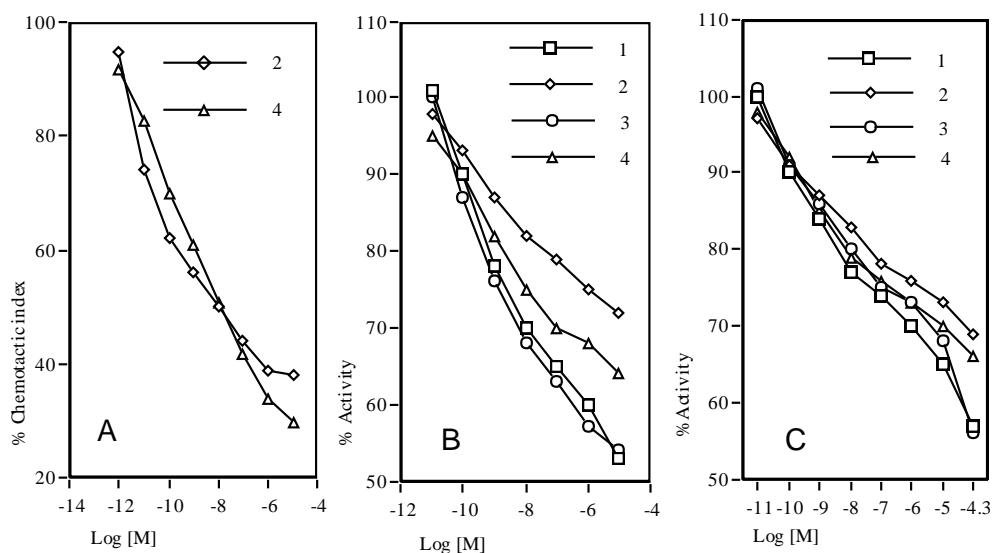


Figure 5. Effect of *N*-Boc-protected tripeptides **1-4** on the neutrophil activities triggered by fMLF-OMe. (A) Chemotactic activity; (B) superoxide anion production; (C) release of neutrophil granule enzymes evaluated by determining lysozyme activity.

Riguardo la produzione di anione superossido e rilascio di lisozima, i prodotti sono scarsamente attivi.

In conclusione, gli analoghi descritti in questo lavoro, forniscono nuove e interessanti informazioni sulle relazioni struttura-attività dei peptidi chemotattici e su come questi peptidi interagiscono con la tasca del recettore chemotattico.

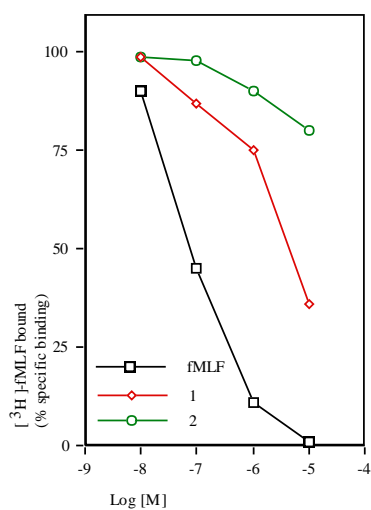


Figure 6. Competition curves of specific [³H]-fMLF binding to human neutrophils of compound **1** and **2**. Curves are representative of a single experiment taken from a series of three independent experiments. Non specific binding was determined in the presence of 100 μM fMLF.

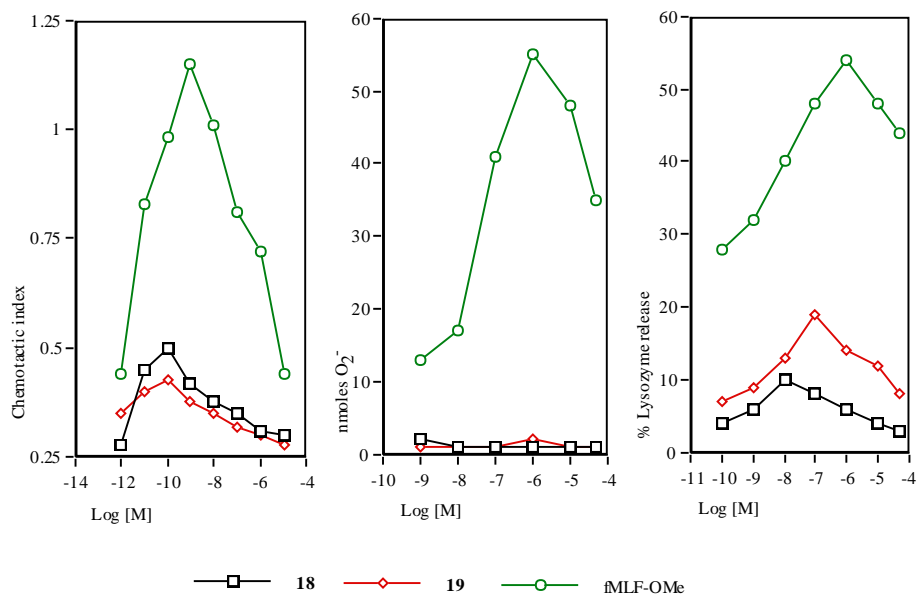


Figure 7. Biological activity of tripeptide **18** and **19**. (A) Chemotactic activity; (B) superoxide anion production; (C) release of neutrophil granule enzymes evaluated by determining lysozyme activity.

Bibliografia

1. Freer, R. J.; Day, A. R.; Radding, J. A.; Schiffmann, E.; Aswanikumar, S.; Showell, H. J.; Becker, E. L. *Biochemistry* **1980**, *19*, 2404-2410.
2. Freer, R. J.; Day, A. R.; Muthukumaraswamy, N.; Pinon, D.; Wu, A.; Showell, H. J.; Becker, E. L. *Biochemistry* **1982**, *21*, 257-263.
3. Torrini, I.; Pagani Zecchini, G.; Paglialunga Paradisi, M.; Lucente, G.; Gavuzzo, E.; Mazza, F.; Pochetti, G.; Traniello, S.; Spisani, S. *Biopolymers*, **1994**, *34*, 1-9.
4. Houston, M. E.; Harvath, L.; Honek, F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 3007-3012.
5. Torrini, I.; Paglialunga Paradisi, M.; Pagani Zecchini, G.; Lucente, G.; Gavuzzo, E.; Mazza, F.; Pochetti, G.; Traniello, S.; Spisani, S. *Biopolymers* **1997**, *42*, 415-426.
6. Witkowska, R.; Zabrocki, J.; Spisani, S.; Falzarano, M. S.; Toniolo, C.; Formaggio, F. *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 354-360.
7. Giordano, C.; Lucente, G.; Mollica, A.; Nalli, M.; Pagani Zecchini, G.; Paglialunga Paradisi, M.; Gavuzzo, E.; Mazza, F.; Spisani S. *J. Peptide Sci.* **2004**, *10*, 510-523.
8. Smith, E. M.; Swiss, G. F.; Neustadt, B. R.; Gold, E. H.; Sommer, J. A.; Brown, A. D.; Chiu, P. J. S.; Moran, R.; Sybertz, E. J.; Baum, T. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 875-885.
9. Krapcho, J.; Turk, C.; Cushman, D. W.; Powell, J. R.; DeForrest, J. M.; Spitzmiller, E. R.; Karanewsky, D. S.; Duggan, M.; Rovnvak, G.; Schwartz, J.; Natarajan, S.; Godfrey, J. D.; Ryono, D. E.; Neubeck, R.; Atwal, K. S.; Petrillo, Jr., E. P. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1148-1160.
10. Karanewsky, D.S.; Badia, M. C.; Cushman, D. W.; DeForrest, J. M.; Dejneka, T.; Lee, V. G.; Loots, M. J.; Petrillo, E. W. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1459-1469. sintesi tioPro
11. Kolodziej, S. A.; Nikiforovich, G. V.; Skeeane, R.; Lignon, M-F.; Martinez, J.; Marshall, G. R. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 137-149.
12. Decicco, C., P.; Grover, P. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 3534-3541.
13. Millet, R.; Goossen, L.; Chavatte, P.; Bertrand-Caumont, K.; Houssin, R.; Henichart, J-P. *J. Pept. Sci.* **2001**, *7*, 323-330.

3. Utilizzazione di β -aminoacidi nella sintesi di α/β peptidi ibridi

Nell'ambito delle nostre ricerche sulle relazioni struttura-attività nel campo dei peptidi chemotattici correlati al fMLF-OMe il nostro gruppo ha recentemente iniziato a lavorare su un programma centrato sull'esame delle conseguenze biochimiche dell'introduzione di residui di ω -amminoacidi achirali (fra cui la β -alanina), nella posizione centrale del ligando di riferimento fMLF-OMe [1,2].

3.1 Peptidi ibridi α/β con catene laterali proteinogeniche. Analoghi monosostituiti del peptide chemotattico f-MLF-OMe

Tenendo conto del crescente interesse verso peptidomimetici ottenuti per sostituzione degli α -residui nativi con β -amminoacidi con catene laterali proteinogeniche [3-6], abbiamo prodotto uno studio su tre peptidi misti α/β^3 , analoghi del fMLF-OMe: [β^3 -HMet¹]fMLF-OMe (**1b**), [β^3 -HLeu²]fMLF-OMe (**2b**) e [β^3 -HPhe³]fMLF-OMe (**3b**) (Figura 1). I corrispondenti *N*-Boc derivati **1a-3a**, ottenuti come intermedi durante la sintesi dei sopra menzionati *N*-For peptidi, sono stati anche esaminati per la loro attività come antagonisti chemotattici. E' stata anche determinata la

conformazione adottata allo stato solido dall' analogo Boc- β^3 -HMet¹-Leu-Phe-OMe (**1a**).

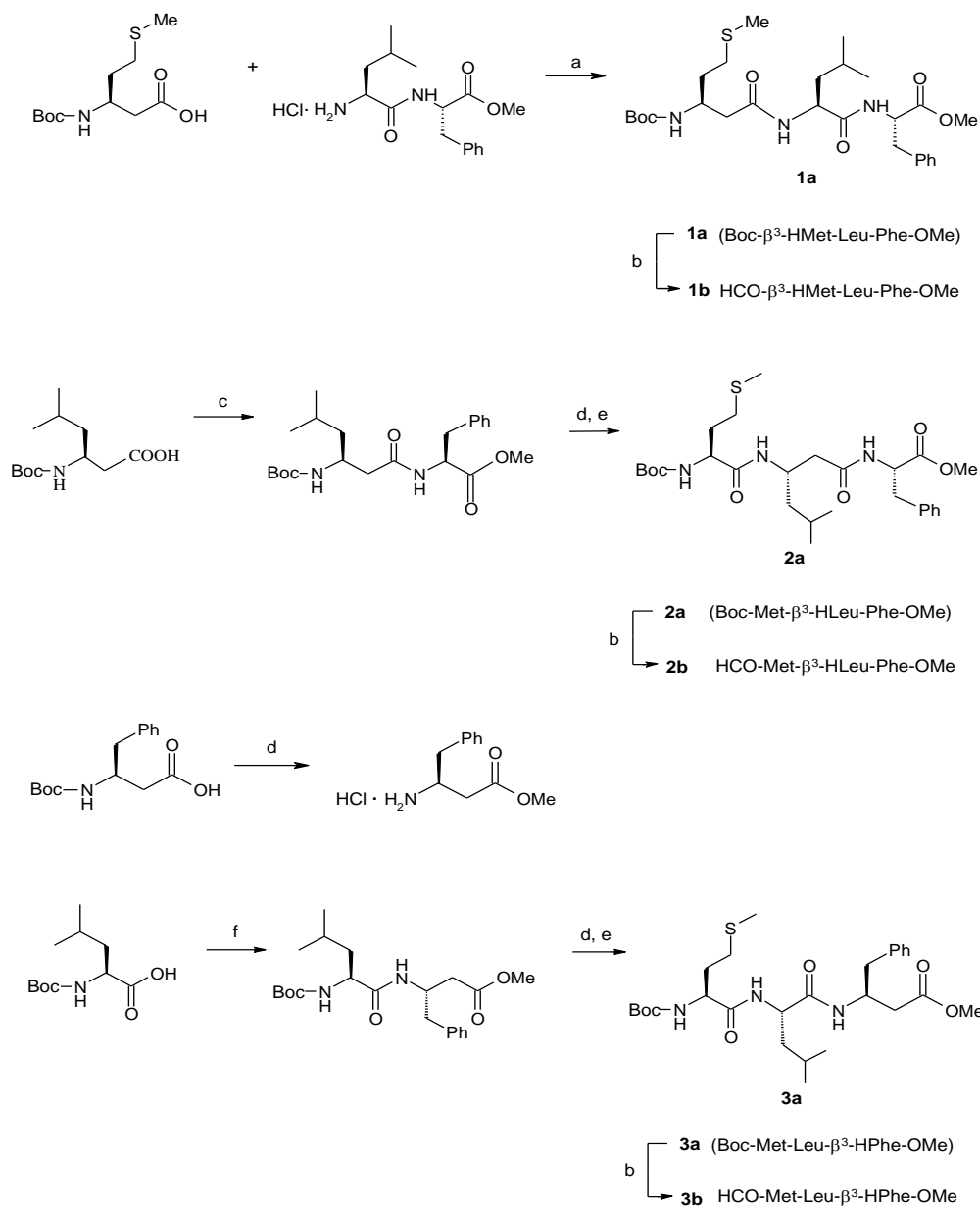


Figura 1. Metodi di sintesi dei tripeptidi misti *N*-protetti **1-3**. a: *i*-BuOCOC₁, NMM; b: HCOOH, EEDQ; c: *i*-BuOCOC₁, NMM; HCl·H-Phe-OMe; d: SOCl₂, MeOH; e: Boc-Met-OH, *i*-BuOCOC₁, NMM; f: *i*-BuOCOC₁, NMM; HCl·NH₂- β^3 -HPhe-OMe.

Benché peptidi composti solo da β -amminoacidi (β -peptidi) sono stati studiati a fondo ed è ben stabilita la loro tendenza ad adottare definite strutture secondarie [3-6], gli eterooligomeri costituiti sia da α - che da β -amminoacidi hanno ricevuto una attenzione considerevolmente minore [7-14]. Questi ultimi composti posseggono, comunque, un significativo potenziale nella progettazione di peptidomimetici bioattivi. Questa proprietà è essenzialmente dovuta alla loro tendenza ad adottare strutture secondarie caratteristiche anche di corti oligomeri e alla loro aumentata stabilità verso le peptidasi dei mammiferi [15-17].

Anche se *N*-formilpeptidi chemotattici contenenti il residuo achirale della β -alanina sono stati precedentemente descritti [2,18], i composti **1a-3a** e **1b-3b** rappresentano i primi analoghi del fMLF-OMe ottenuti seguendo l'approccio α/β^3 - peptide.

Attività biologica

Le attività biologiche dei nuovi analoghi **1-3**, determinate nei riguardi dei neutrofilii umani, sono state confrontate con quelle del ligando di riferimento fMLF-OMe. Sono state misurate la migrazione diretta (chemotassi), la produzione di anioni superossido ed il rilascio di lisozima (Fig. 2). L'analisi della figura 2A rivela chiaramente che tutti i tre *N*-Boc derivati **1a-3a** sono, come previsto, praticamente inattivi come agonisti [20]. Per quanto riguarda l'attività chemotattica mostrata dagli *N*-formil derivati **1b-3b** si può vedere che la sostituzione di ciascun residuo di α -amminoacido con il corrispondente β^3 -amminoacido porta ad analoghi con un picco di attività simile che è comunque inferiore a quello mostrato dal fMLF-OMe. I composti **1b** e **3b**, caratterizzati dalla sostituzione alle due posizioni esterne, sono entrambi più potenti ed efficienti di **2b**

caratterizzato dalla sostituzione al residuo centrale. Così, la sostituzione della leucina centrale, confrontata con quella dei residui della metionina e della fenilalanina, risulta la meno tollerata.

Comunque, se si considera la completa inattività, precedentemente riportata [2], dell' analogo del fMLF-OMe contenente un residuo di β -alanina in posizione centrale, l'attività mostrata dal derivato [β^3 -HLeu²]fMLF-OMe (**2b**) conferma il ruolo cruciale esercitato sull'attività dalla catena laterale idrofobica della Leu centrale e suggerisce che **2b** mantiene una sistemazione complessivamente buona nella tasca recettoriale e che l'addizionale gruppo CH₂ nel *backbone* non impedisce un' interazione produttiva, anche se non ottimale, della catena isobutilica con il sito idrofobico del recettore corrispondente alla leucina nativa.

Come mostrato nelle figure 2B e 2C, i tripeptidi **1b-3b** sono stati esaminati per le attività di produzione di anioni superossido e di rilascio di lisozima. Si può vedere che, come già trovato nel caso dell'attività chemotattica, la modifica meno favorevole è quella effettuata nella posizione centrale; l'analogo [β^3 -HLeu²]fMLF-OMe (**2b**) è risultato infatti il meno attivo in tutti gli esperimenti. D' altro canto, l' introduzione del β^3 -residuo in posizione *N*-terminale o *C*-terminale ha portato a ligandi molto attivi (vedi **1b** e **3b** rispettivamente per la produzione di anioni superossido e rilascio di lisozima). Dal momento che questi composti sono solo parzialmente attivi come chemoattrattanti, il loro comportamento selettivo appare interessante e può rappresentare la base per ulteriori indagini. Tutti i tre *N*-Boc derivati **1a-3a** sono praticamente inattivi come agonisti nelle tre funzioni esaminate (Figura 2).

E' sembrato quindi interessante testare la loro attività come antagonisti. L'antagonismo è stato determinato misurando la capacità di inibire l'attività stimolata

dal fMLF-OMe sui neutrofilo umani (Figura 3). In Figura 3A è mostrata l'influenza di una concentrazione crescente di **1a-3a** sulla chemotassi indotta da fMLF-OMe 10 nM, che è la dose ottimale per l'attivazione della chemotassi. Si è osservata una significativa inibizione dose-dipendente dell'indice chemotattico per tutti i tre composti, e l'inibizione diventa significativa ($p < 0.05$) a 10^{-10} M.

Per quanto riguarda la produzione di anioni superossido (Figura 3B), solo l'analogo β^3 -HMet¹, il cui corrispondente *N*-formil analogo **1b** ha la più alta attività come agonista nello stesso test (Figura 2B), esercita una inibizione statisticamente significativa ($p < 0.05$) sull'attività indotta da fMLF-OMe a partire da 10^{-7} M. Nel caso del rilascio di lisozima (Figura 3C) è stata riscontrata solo una debole azione inibitrice, che raggiunge valori statisticamente significanti ($p = 0.05$) solo ad alta concentrazione, per gli analoghi β^3 -HMet¹ e β^3 -HLeu² **1a** e **2a**.

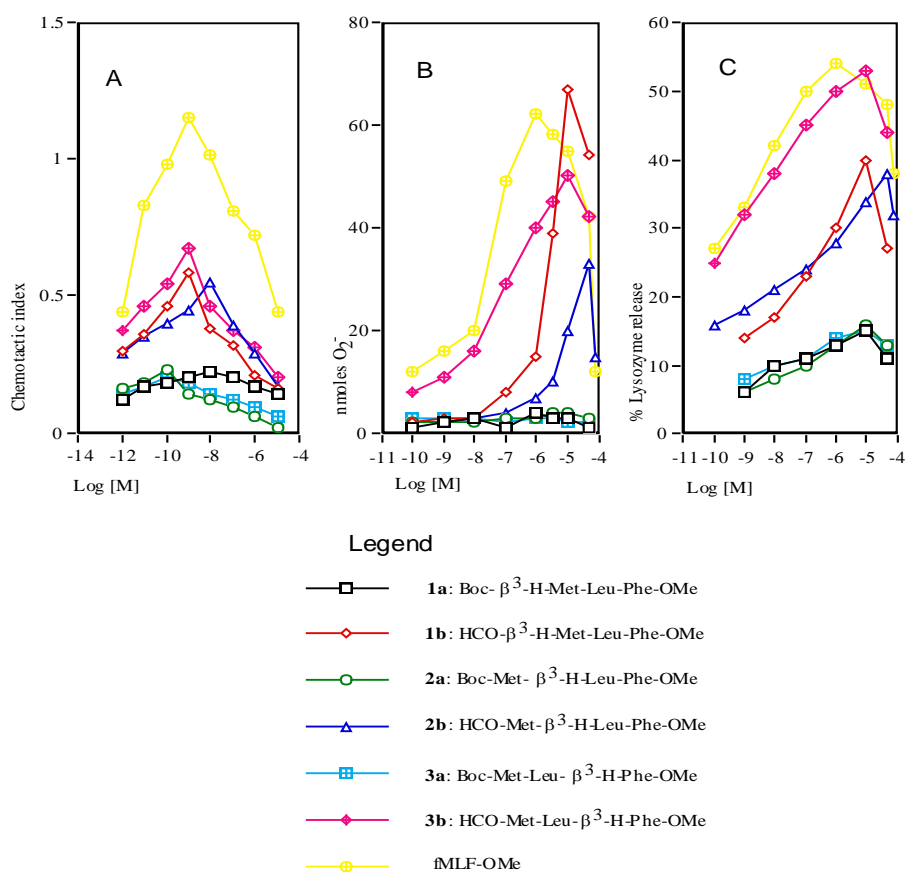


Figura 2. Attività biologica dei derivati tripeptidici **1a,b-3a,b**. (A) Attività chemotattica; (B) produzione di anioni superossido; (C) rilascio di lisozima.

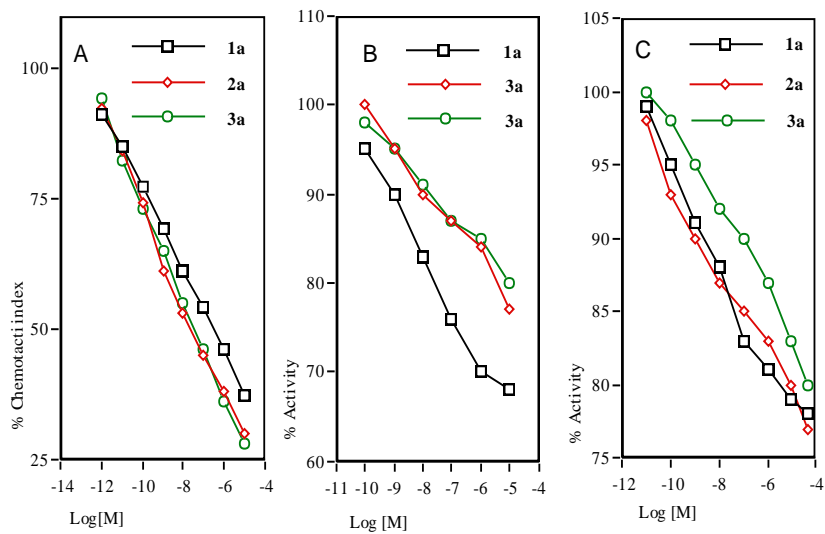


Figura 3. Effetto dei tripeptidi N-Boc-protetti **1a-3a** sull'attività dei neutrofilo stimolata da fMLP-OMe. (A) attività chemotattica; (B) produzione di anione superossido; (C) rilascio di lisozima.

Conformazione in soluzione

Diversi autori hanno esaminato le preferenze conformazionali sia dello stato cristallino che in soluzione esibite da piccoli peptidi lineari incorporanti uno o due residui di β -amminoacidi [7-14]. Anche se è difficile riassumere i risultati di queste ricerche a causa della diversa natura dei modelli esaminati ed anche delle metodologie usate, uno sguardo d' assieme prova chiaramente la capacità dei β -residui di consentire un vasto spettro di strutture sia ripiegate che estese che sono fortemente influenzate dalla natura dei sostituenti sul legame C^α - C^β e dai "constraints" imposti dai residui adiacenti [21-30].

Informazioni sulle preferenze conformazionali dei modelli tripeptidici misti α/β^3 studiati sono state ottenute esaminando il coinvolgimento dei gruppi NH in legami idrogeno intramolecolari tramite esperimenti ^1H NMR. In Figura 4 è descritta la dipendenza dei *chemical shifts* dei protoni NH dalle concentrazioni crescenti di DMSO- d_6 in una soluzione di CDCl_3 10 mM. Nella Tabella 1 è riportata l'accessibilità al solvente espressa come differenza ($\Delta\delta$, ppm) fra i valori dei *chemical shifts* dei protoni NH osservati in CDCl_3 puro ed in una soluzione di CDCl_3 contenente il 10% di DMSO.

Tabella 1. Accessibilità al solvente da parte dei gruppi NH. Differenze tra i valori ($\Delta\delta$, ppm) di *chemical shifts* dei protoni NH, osservati in una soluzione al 10% di DMSO-d₆ in CDCl₃ e in CDCl₃ puro.

Composto	NH N-terminale	NH centrale	NH C-Terminale
Boc- β^3 -HMet-Leu-Phe-OMe	0.42	1.08	0.62
HCO- β^3 -HMet-Leu-Phe-OMe	0.48	1.25	0.67
HCO-Met- β^3 -HLeu-Phe-OMe	0.80	0.36	1.04
HCO-Met-Leu β^3 -HPhe-OMe	0.84	0.51	0.33
Boc- β -Ala-Phe-OMe	0.14		1.13
HCO- β -Ala-Phe-OMe	0.50		1.30
Boc- β -Ala-Amp	0.19		1.05

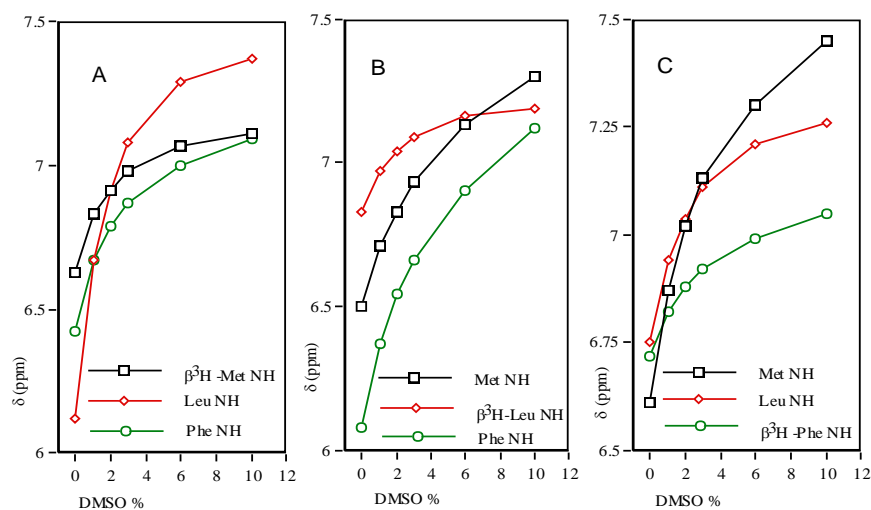


Figura 4. Grafici degli ¹H NMR *chemical Shifts* relativi ai gruppi NH dei formil-peptidi **1b** (A), **2b** (B) e **3b** (C), in funzione di una percentuale crescente di DMSO-d₆ (v/v) aggiunto alla soluzione di CDCl₃ (concentrazione del peptide 10mM).

E' evidente che i *chemical shifts* di tutti i tre protoni in ciascun modello sono piuttosto sensibili all' aggiunta di DMSO, indicando così l' assenza di alte concentrazioni di ben definite conformazioni ripiegate, stabilizzate da legami idrogeno intramolecolari.

Comunque si deve notare che in tutti i tre peptidi il gruppo NH del residuo β^3 , indipendentemente dalla posizione centrale od esterna occupata nella sequenza, mostra la più bassa accessibilità al solvente. Questo effetto è più pronunciato nel caso dei due modelli **2b** e **3b** in cui il β^3 -residuo non occupa la posizione *N*-terminale.

Anche se gli esperimenti di titolazione NMR permettono solo di identificare gruppi NH potenzialmente impegnati in legami idrogeno intramolecolari, senza fornire alcuna informazione sui carbonili accettori, il comportamento sopra riportato dei gruppi NH dei residui β^3 suggerisce la presenza, in aggiunta ad una elevata quantità di conformazioni "unfolded", di una certa popolazione di conformeri localmente "folded" centrati ai β^3 -residui attraverso un ciclo a 6 termini intraresiduo (conformazione C_6) [31-33].

Comunque, gli spettri di assorbimento IR in soluzione di CHCl_3 dei tripeptidi **1b-3b** non esibiscono significativi assorbimenti nella regione $3400\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$ dove comunemente assorbono gruppi NH intramolecolarmente "H-bonded". Alla luce dei recenti studi teorici su modelli dipeptidici [32,33], questi ultimi dati non appaiono in disaccordo con la presenza prima suggerita di un *folding* locale C_6 . Infatti, i calcoli indicano che queste piccole strutture cicliche sono i conformeri più stabili e mettono in rilievo, nello stesso tempo, la debole stabilizzazione prodotta dal legame idrogeno intraresiduo a causa di sfavorevoli parametri geometrici. Così, ci si può aspettare che questo tipo di *folding*, che sembra essere meglio associato ad un' interazione

dipolo...dipolo, abbia una scarsa influenza sullo *stretching* N-H osservabile negli spettri IR, e sul *chemical shift* NMR [32].

In questi tripeptidi si è ottenuta una prova indiretta della presenza di una popolazione di conformeri C_6 attraverso l'esame dei due derivati dipeptidici Boc- β -Ala-Phe-OMe (**4a**) [2] e For- β -Ala-Phe-OMe. Come mostrato in Figura 5 e in Tabella 1 il protone del gruppo NH della β -Ala è più schermato al solvente di quello della Phe in entrambi i composti. Inoltre non si sono osservate significative bande di assorbimento IR nella regione al di sotto di 3400 cm^{-1} .

Al fine di escludere il coinvolgimento del carbonile dell'estere come accettore di legame idrogeno, è stato sintetizzato il modello (*S*)-Boc- β -Ala-NHCH(CH₂C₆H₅)CH₃ (**5**) sostituendo il residuo della fenilalanina con quello dell'amfetamina. Ancora, come mostrato in Tabella 1, il protone del gruppo NH della β -Ala di **5** presenta la più bassa accessibilità al solvente. Inoltre, non si è osservata alcuna banda di *stretching* del gruppo NH nella regione di assorbimento IR 3400-3300.

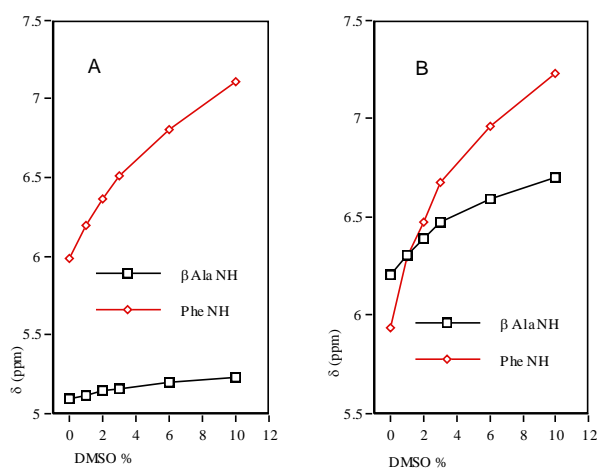


Figura 5. Grafici, degli ^1H NMR *chemical Shifts* relativi ai gruppi NH dei dipeptidi **4a** (A), **4b** (B), in funzione di una percentuale crescente di DMSO- d_6 (v/v) aggiunto alla soluzione di CDCl_3 (concentrazione del peptide 10mM).

Conclusioni

I risultati riportati nella presente tesi danno in primo luogo informazioni sulle conseguenze dell' incorporazione di un residuo di β^3 -amminoacido in analoghi del potente tripeptide chemotattico fMLF-OMe. Ciascun analogo, contenente un β^3 -residuo e due α -residui, mantiene le stesse catene laterali e la stessa stereochimica presenti nel ligando nativo. I nostri risultati indicano che le sostituzioni α/β^3 hanno una diversa e selettiva influenza sulle tre funzioni biochimiche esaminate e di conseguenza sulla capacità di analoghi α/β^3 di interagire efficacemente con gli appropriati recettori sulla membrana dei neutrofili. L'unico effetto comune riguarda la sostituzione Leu/ β^3 -HLeu nella posizione centrale che in ogni caso è svantaggiosa. La sostituzione del residuo *N*-terminale della metionina, la cui presenza è critica per l'attività degli analoghi del fMLF-OMe, porta a ligandi selettivi: il composto **1b** è infatti un modesto chemoattrattante ma un buon ligando per la produzione di anioni superossido. Considerazioni analoghe possono essere applicate allo scambio Phe/ β^3 -HPhe alla posizione *C*-terminale, che porta ad un composto molto attivo nel rilascio di lisozima ma solo ad un modesto agonista per le altre funzioni biochimiche (composto **3b**).

Per quanto riguarda la conformazione adottata in soluzione dai nuovi analoghi del fMLF-OMe, gli esperimenti di titolazione ^1H NMR indicano sulla base della accessibilità al solvente esibita dai protoni NH che le conformazioni sono essenzialmente estese, con un contributo di *folding* locale C_6 , in particolare nel caso dei composti **2b** e **3b**. Questa conclusione è in accordo con i risultati ottenuti esaminando i modelli più semplici **4** e **5**, e con dati di letteratura che indicano che il *folding* C_6 è probabilmente solo in parte stabilizzato da legame idrogeno e non è facilmente

rivelabile dagli spettri di assorbimento IR [32]. Così gli esperimenti di titolazione ^1H NMR dovrebbero rappresentare il metodo di scelta per rivelare la presenza in soluzione di questo elusivo tipo di *folding*.

Come mostrato in Figura 6, il modello **1a** contenente la β^3 -HMet adotta, allo stato cristallino, una conformazione che è estesa al residuo β . Gli angoli di torsione sono da $\varphi_1 = -87^\circ$, $\theta_1 = 172^\circ$, $\psi_1 = 126$ corrispondenti a conformazioni *skew⁻*, *trans⁺* e *skew⁺*, rispettivamente. Questi valori sono simili a quelli adottati allo stato cristallino da una delle due molecole indipendenti di Boc- β -Ala-Aib-OMe dove la forma estesa coesiste con la conformazione *folded* presa dall' altra molecola [26]. La conformazione adottata da **1a** nel cristallo è in accordo con la conformazione preferita trovata in soluzione, dove tutti i tre gruppi NH sono essenzialmente liberi di interagire con il solvente, con la più alta accessibilità ($\Delta\delta = 1.08$ ppm) mostrata dal protone NH della leucina centrale e la più bassa ($\Delta\delta = 0.42$ ppm) dal protone NH della β^3 -HMet *N*-terminale. Questo ultimo valore suggerisce che in soluzione di CDCl_3 può essere presente una popolazione di conformeri che adottano un folding C_6 .

BIBLIOGRAFIA

1. Pagani Zecchini G, Morera E, Nalli M, Paglialunga Paradisi M, Lucente G, Spisani S. Synthesis and activity on human neutrophil functions of fMLF-OMe analogs containing alkyl spacers at the central positions. *Il Farmaco* 2001; **56**: 851-858.
2. Giordano C, Lucente G, Nalli M, Pagani Zecchini G, Paglialunga Paradisi M, Varani K, Spisani S. Synthesis and activity of HCO-Met-Leu-Phe OMe analogues containing β -alanine or taurine at the central positions. *Il farmaco* 2003; **58**: 1121-1130.
3. Seebach D, Matthews JL. β -Peptides: a surprise at every turn. *Chem. Commun.* 1997; 2015-2022.
4. Gellman SH: Foldamers: a manifesto. *Acc. Chem. Res.* 1988; **31**: 173-180.
5. Gademann K, Hintermann T, Schreiber JV. β -Peptides: Twisting and turning. *Curr. Med. Chem.* 1999; **6**: 905-925.
6. De Grado WF, Schneider JP, Hamuro Y. The twists and turns of β -peptides. *J. Pept. Res.* 1999; **54**: 206-217.
7. Hill DJ, Moi MJ, Prince RB, Hughes TS, Moore JS. A field guide to foldamers. *Chem. Rev.* 2001; **101**:3893-4011.
8. Schumann F, Muller A, Kokschi M, Muller G, Sewald N. Are β -amino acids γ -turn mimetics? Exploring a new design principle for bioactive cyclopeptides. *J. Am. Chem. Soc.* 2000; **122**: 12009-12010.
9. Gaedemann K, Kimmerlin T, Hoyer D, Seebach D. Peptide folding induces high and selective affinity of a linear and small β -peptide to the human somatostatin receptor 4. *J. Med. Chem.* 2001; **44**: 2460-2468.
10. Kimmerlin T, Seebach D, Hilvert D, Synthesis of β^3 -peptides and mixed α/β^3 -peptides by thioligation. *Helv Chim. Acta* 2002; **85**: 1812-1826.
11. Gopi HN, Roy RS, Raghothama SR, Karle IL, Balaram P. β -Hairpins generated from hybrid peptide sequences containing both α - and β - amino acids. *Helv. Chim. Acta* 2002; **85**: 3313-3330.

12. Sagan S, Milcent T, Ponsinet R, Convert O, Tasseau O, Chassaing G, Lavielle S, Lequin O. Structural and biological effects of a β^2 - or β^3 -amino acid insertion in a peptide. Application to molecular recognition of substance P by neurokinin-1 receptor. *Eur.J.Biochem.* 2003; **270**: 939-949.
13. Gung BW, Zou D, Miyahara Y. Synthesis of a hybride peptide with both α - and β -amino acid residues: toward a new β -sheet nucleator. *Tetrahedron* 2000; **56**: 9739-9746.
14. Romanelli A, Garella I, Menchise V, Iacovino R, Saviano M, Montesarchio D, Didierjean C, Di Lello P, Rossi F, Benedetti E. Crystal-state conformation of $C^{\alpha,\alpha}$ -dialkylated peptides containig chiral β -homo-residues. *J. Pept. Sci.* 2001; **7**: 15-26.
15. Seebach D, Abele S, Schreiber JV, Martinoni B, Nussbaum AK, Schild H, Schulz H, Hnecke H, Woessner R, Bitsch F. Biological and pharmacokinetic studies with β -peptides. *Chimia* 1998; **52**: 734-739.
16. Steer DL, Lew RA, Perlmutter P, Smith AJ, Aguilar MI. Design and syntehesis of inhibitors incorporating β -amino acids of metalloendopeptidase EC 3.4.24.15. *J. Pept. Sci.* 2000; **6**: 470-477.
17. Frackenpohl J, Arvidsson PI, Schreiber JV, Seebach D. The outstanding biological stability of β - and γ -peptides toward proteolytic enzymes: an *in vitro* investigation with fifteen peptidases. *ChemBioChem.* 2001; **2**: 445-455.
18. Falcomer C, Vertuani G, Boggian M, Scatturin A. Formyl peptide chemoattractants. Synthesis and chemotattic activity. *Il Farmaco-Ed. Sc.* 1987; **42**: 815-822.
19. Seki M, Matsumoto K. A facile synthesis of (R)-3-amino-4-phenylbutyric acid from L-aspartic acid. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1996; **60**: 916-917.
20. Burla Mc, Camalli L, Carrozzini B, Cascarano GL, Giacobazzo C, Polidori G, Spagna R. Sir 2002: the program. *J. Appl. Crystallogr.* 2003; **36**: 1103.
21. Zigmond SH, Hirsch JG. Leukocyte locomotion and chemotaxis. New methods for evaluaton and demonstration of cell derived chemotactic factor. *J. Exp. Med.* 1973; **137**: 387-410.
22. Freer Rj, Day AR, Radding JA, Schiffmann E, Aswanikumar S, Showell HJ, Becker EL. Further studies on the structural requirements for synthetic peptide chemoattractans. *Biochemistry* 1980; **19**: 2404-2410.

23. Dado Gp, Gellman H. Intramolecular hydrogen bonding in derivatives of β -alanine and γ -amino butyric acid: model studies for the folding of unnatural polypeptide backbones. *J. Am. Chem.* 1994; **116**: 1054-1062
24. Gung BW, MacKay JA, Zou D. Substituent effect on intramolecular hydrogen bonding in β -amino acid containing polyamides. *J. Org. Chem.* 1999; **64**: 700-706.
25. Thakur AK, Kishore R. Stabilization of a novel β -turn-like motif by nonconventional intramolecular hydrogen-bonding interactions in a model peptide incorporating β -alanine. *Biopolymers* 2000; **53**: 447-454.
26. Thakur AK, Venugopalan P, Kishore R. Collateral existence of folded and extended conformations of the β -Ala moiety in a model peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; **273**: 492-498.
27. Thakur AK, Kishore R. Influence of hydrophobic interactions on the conformational adaptability of the β -Ala residue. *J. Pept. Res.* 2001; **57**: 455-461.
28. Maji SK, Haldar D, Bhattacharyya D, Banerjee A. Conformational Heterogeneity of a turn mimetic pseudo-peptide: comparison of crystal state, solution and theoretically derived structures. *J. Mol. Struct.* 2003; **646**: 111-123.
29. Gunther R, Hofmann HJ. Theoretical prediction of substituent effects on the intrinsic folding properties of β -peptides. *Helv. Chim. Acta* 2002; **85**: 2149-2168.
30. Martinek TA, Fulop F. Side chain control of β -peptide secondary structures. *Eur. J. Biochem.* 2003; **270**: 3657-3666.
31. Valle G, Bonora GM, Toniolo C. Linear oligopeptides. CV. Preferred conformations and modes of self-association of the *N-tert*-butyloxycarbonyl derivatives of glycine and β -alanine. *Gazz. Chim. Ital.* 1984; **114**: 341-347.
32. Wu Y-D, Wang D-P. Theoretical studies of β -peptides models. *J. Am. Chem. Soc.* 1998; **120**: 13485-13493.
33. Mohle K, Gunther R, Thormann M, Sewald N, Hofmann H-J. Basic conformers in β -peptides. *Biopolymers* 1999; **50**: 167-184.

3.2. α/β peptidi ibridi: analoghi della fMLF-OMe contenenti in posizione centrale aminoacidi disostituiti $\beta^{2,2}$ e $\beta^{3,3}$

Introduzione

Un gran numero di studi struttura attività sono stati condotti sui peptidi chemotattici. Una trasformazione molto interessante e' stata la sostituzione dell' aminoacido centrale Leu. In particolare le modificazioni che hanno portato alla sostituzione del residuo centrale, con aminoacidi α,α disostituiti, che possono essere definiti come analoghi disostituiti della glicina. In particolare, i derivati ciclici a 5 e 6 termini Ac_{5c} e Ac_{6c} rispettivamente, sono stati introdotti nel peptide standard chemotattico fMLF-OMe, i prodotti sintetizzati esibiscono un' alta attività chemotattica e strutturalmente, una caratteristica forma ripiegata stabilizzata da legami idrogeno¹.

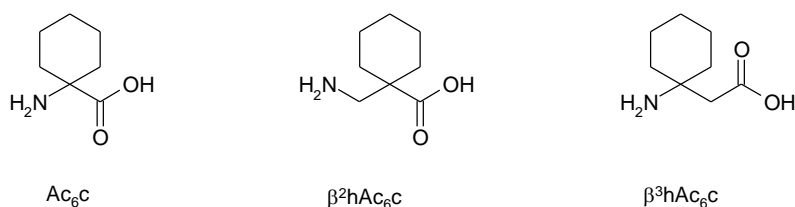


Figure 1. Strutture rilevanti presenti nel capitolo.

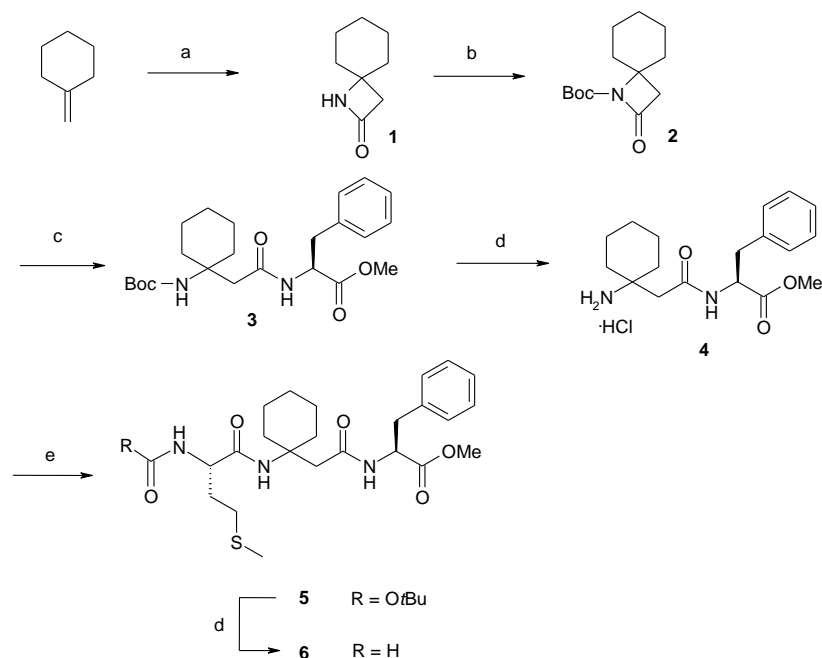
Tenendo presente questi studi, e la nostra esperienza nei beta peptidi chemotattici, abbiamo progettato 2 peptidi chemotattici, dove al posto della Leu nativa sono stati sostituiti 2 beta aminoacidi, contenente la $\beta^{2,2}$ homo-Ac_{6c} e la $\beta^{3,3}$ homo-Ac_{6c}. Entrambi gli aminoacidi erano già noti in letteratura e sono stati usati da Seebach per sintetizzare oligo β -peptidi²⁻⁴.

Si deve inoltre notare che la sintesi di α/β peptid ibridi è un approccio ancora poco utilizzato, se paragonato ai β -petidi oligomeri, e rappresenta un approccio in costante crescita⁵⁻⁷. Le scelte che ci hanno portato a scegliere di introdurre questi due residui all'interno del peptide chemotattico di riferimento fMLF-OMe possono essere così riassunte:

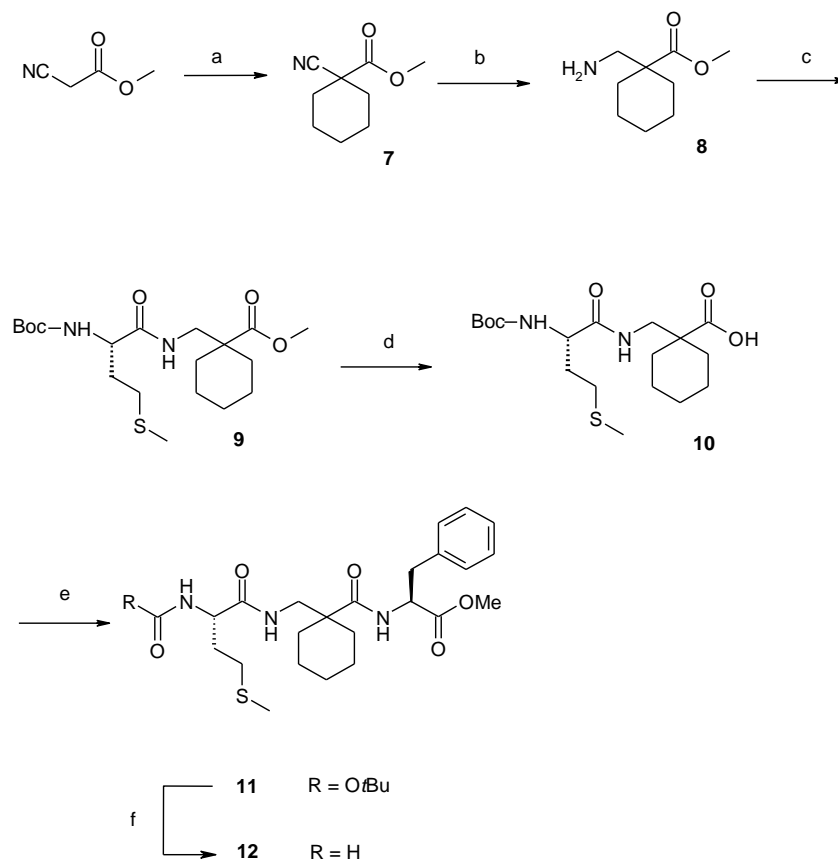
- 1) influenza positiva che la catena alchilica ciclica centrale ha dimostrato verso l'attività chemotattica del peptide fMLF-OMe¹.
- 2) per studiare l'eventuale influenza che potrebbe avere la posizione nello spazio della catena ciclica
- 3) la stabilizzazione di conformazione ripiegate tipica degli aminoacidi C ^{α,α} disostituiti.

Sintesi

Le sintesi di Boc-Met- $\beta^3\text{hAc}_6\text{c}$ -Phe-OMe (**5**) e di Boc-Met- $\beta^2\text{hAc}_6\text{c}$ -Phe-OMe (**11**) sono state fatte seguendo 2 differenti strategie mostrate negli schemi 1 e 2. Una trasformazione diretta dei Boc derivati nei for derivati e' stata fatta seguendo la procedura di Lajoie-Kraus⁸. Il tripeptide **5** contenente $\beta^3\text{hAc}_6\text{c}$ e' stato sintetizzato a partire dal metilencicloesano, usando clorosolfonil isocianato che ha portato allo spirolattame **1**⁹. Mentre, per la sintesi del tripeptide **11** è stata seguita una strategia differente, usando il cianoacetato di metile come reagente chiave per ottenere l' aminoacido $\beta^2\text{hAc}_6\text{c}$ ¹⁰.



Scheme 1. Reagents and conditions: (a) Chlorosulfonyl isocyanate (1.1 eq.), Et₂O (5ml), 10 min at 0 °C, then 25% Na₂SO₄, 1h at r.t. (yield 51%). (b) Boc₂O (1 eq.), DMAP (1 eq.), CH₃CN, 1h at 0 °C then 12h at r.t. (yield 70%). (c) NH₂-Phe-OMe (1.2 eq.), Na₂CO₃, KCN (1eq.), DMF (5ml), 16h at 50 °C. (yield 76%). (d) SOCl₂ (1.2 eq.), MeOH (5ml), 40 min at -15 °C then 3h at 45 °C. (e) Boc-Met-OH (1.1 eq.), *i*BuOCOCl (1.1 eq.), NMM (2.3 eq.), CH₂Cl₂ (5ml), DMF (1 ml), 10 min at -15 °C then at r.t. overnight (yield 65%). (f) formic acid, then EEDQ 97% (1.2 eq.), CHCl₃, 12h at r.t. (yield 55%).



Scheme 2. Reagents and conditions: (a) K_2CO_3 (2 eq.), 1,5-dibromo-pentane (1 eq.), DMF (5 ml), 5h at r.t. (yield 72%). (b) Pd/C 10% (0.1 eq.), 10 N HCl (1 eq.), MeOH (10 ml) under H_2 atmosphere, 4h at r.t. (yield 15%). (c) Boc-Met-OH (1.1 eq.), *i*BuOCOC1 (1.1 eq.), NMM (2.3 eq.), CH_2Cl_2 (5ml), 10 min at -15°C , then r.t. overnight (yield 90%). (d) 1 N LiOH (1.4 eq.), THF:H₂O = 5:1 (3ml), 15 min at 0°C then r.t. overnight (yield 50%). (e) EDC (1.1 eq.), HOBT·H₂O (1.1 eq.), NMM (2.3 eq.), CH_2Cl_2 (10 ml) at r.t. overnight (yield 72%). (f) formic acid, 6h at r.t., then EEDQ 97%, dry CHCl_3 , 12h at r.t. (yield 70%).

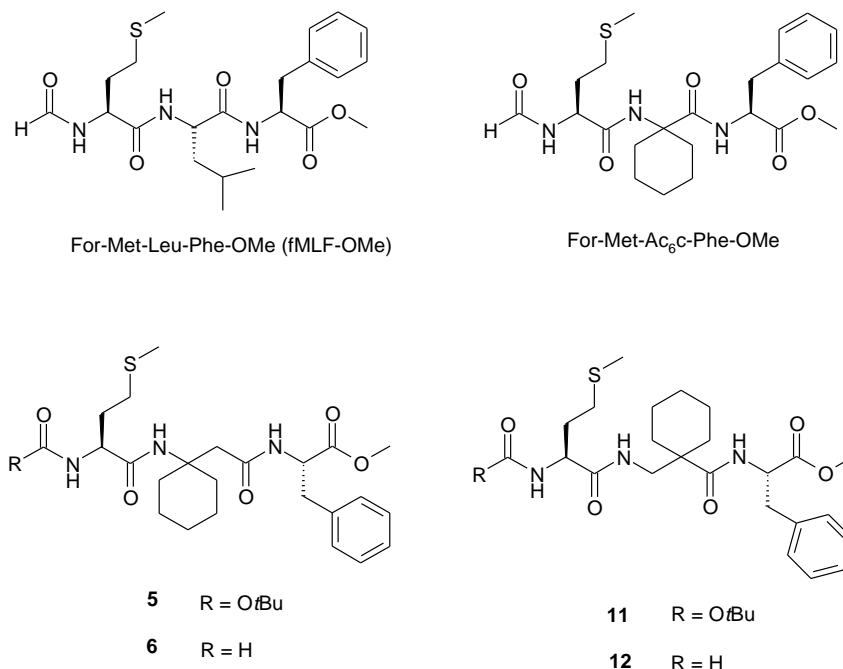


Figura 3. Boc e for tripeptidi.

Risultati Biologici

L- attività' agonista dei nuovi ligandi e' stata determinata sui neutrofili umani e paragonata a quella del tripeptide standard fMLF-OMe.

Eccetto per una modesta attività' mostrata come chemoattrattanti fig 2a e rilascio di lisozima fic 2C, i 2 Boc derivati **5** e **11** sono completamente inattivi nella produzione di anione superossido fig 2b. Al contrario, entrambi i formil tripeptidi **6** e **12** sono stati trovati molto attivi nell' indurre la chemotassi. Mentre nella attivazione dell' anione superossido esibiscono una debole attività (Fig 2b). Inoltre la stimolazione al rilascio di lisozima da parte del peptide contenente β^2 hAc₆c e' notevolmente piu' efficiente dell' isomero contenente β^3 hAc₆c.

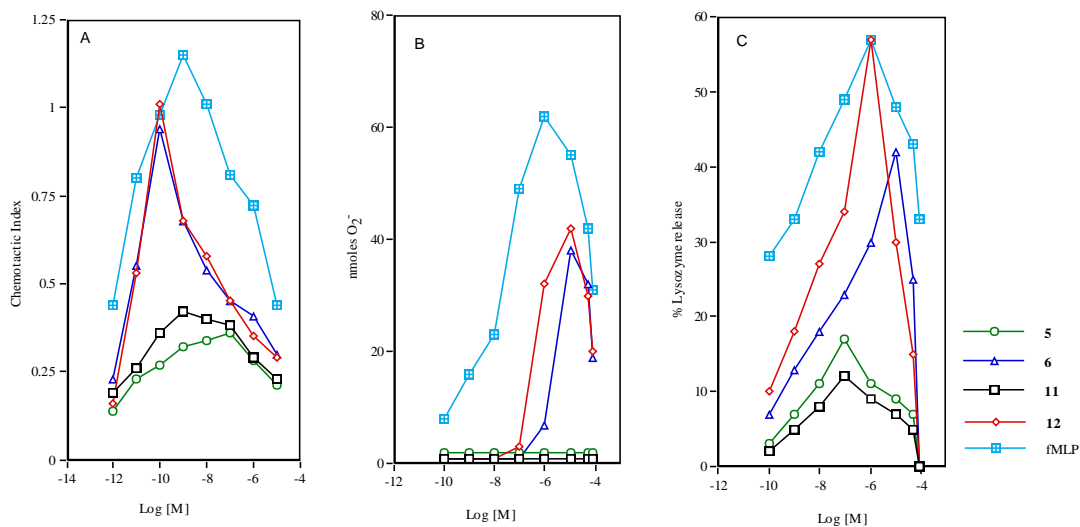


Figure 2. Biological activity of the tripeptides **5-6** and **11-12** compared with the reference ligand fMLF-OMe. (A) Chemotactic activity; (B) superoxide anion production; (C) release of neutrophil granule enzymes evaluated by determining lysozyme activity.

Studi conformazionali

Al fine di accertare il coinvolgimento dei gruppi NH ammidici in legami idrogeno intramolecolari per gli analoghi **6** e **12**, sono stati effettuati esperimenti NMR di titolazione col DMSO-d₆. I chemical Shift dei protoni ammidici sono stati monitorizzati ad ogni aggiunta di DMSO alla soluzione del peptide 10 mM in CDCl₃ fino ad una concentrazione massima di DMSO del 10 %.

Per il peptide **6**, i risultati indicano che (fig. 3a) che i protoni dei 2 residui esterni interagiscono liberamente con il DMSO e quindi non sono impegnati in legami

idrogeno intramolecolari, mentre l' NH del residuo centrale appare parzialmente schermato, quindi impegnato in un debole legame idrogeno intramolecolare. Anche l' esame del suo spettro IR in CDCl_3 dimostra¹¹ che la banda di stretching dei protoni NH coinvolti da legame idrogeno è molto piccola.

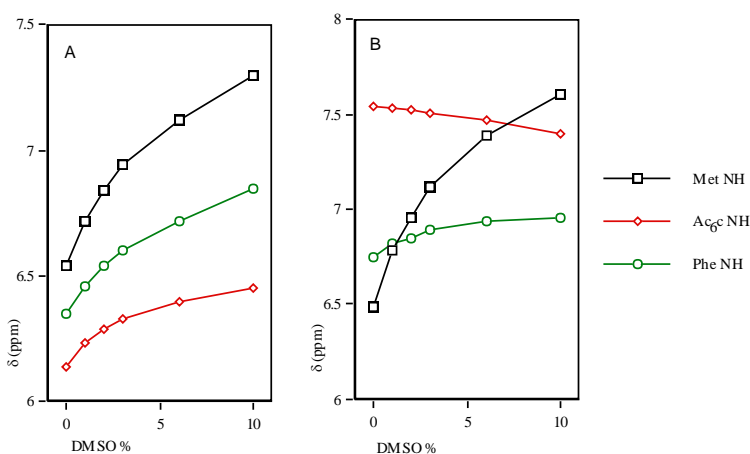


Figure 3. Delineation of hydrogen-bonded NH groups in tripeptides **6** and **12**. Chemical shift dependence of the NH resonances as a function of the $\text{DMSO-}d_6$ concentration (% v/v) in CDCl_3 solution. Peptide concentration 10 mM. (A) HCO-Met- $\beta^3\text{hAc}_6\text{c}$ -Phe-OMe (**6**); (B) HCO-Met- $\beta^2\text{hAc}_6\text{c}$ -Phe-OMe (**12**).

Nel caso del tripeptide **12**, invece troviamo due NH ammidici fortemente coinvolti in legami idrogeno intramolecolari, e anche lo spettro IR lo conferma. Sia l' NH della $\beta^2\text{hAc}_6\text{c}$ che della Phe sono impegnati. Questi dati suggeriscono la presenza di un ripiegamento nel peptide stabilizzato da legami idrogeno. Un' interpretazione ragionevole di questi dati è l' ammissione della presenza di 2 consecutivi folding locali centrati uno sul residuo $\beta^2\text{hAc}_6\text{c}$ (C8, pseudo γ -turn)¹² e l' altro (C7, γ -turn), centrato sul residuo della Met, figura 4.

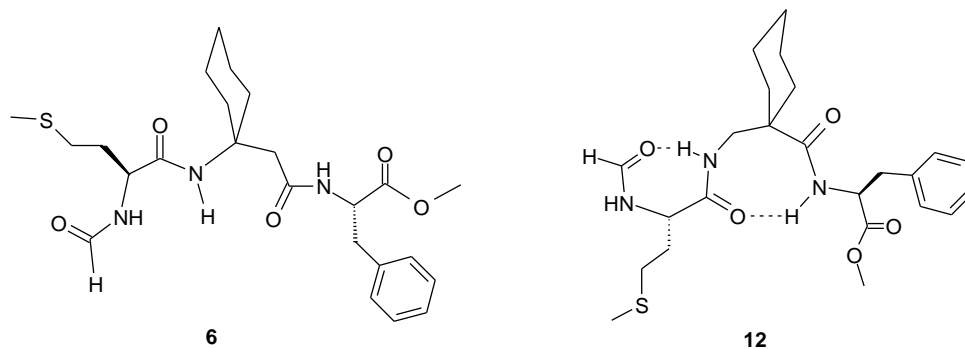


Figura 4. Representation of the molecular structure of the products **6-12**.

Conclusioni

Come precedentemente ricordato, il residuo centrale del peptide chemotattico di riferimento fMLF e' cruciale per l' attivita'. E infatti, la sua sostituzione con residui privi di catena laterale come la glicina o l' alanina portano alla perdita dell' attivita', e anche l' introduzione di un β aminoacido (β^3 hLeu) ha portato ad una perdita significativa dell' attivita'.

Gli isomeri qui sintetizzati, hanno confermato in parte questa teoria, infatti i prodotti contenuti $\beta^{2,2}$, e $\beta^{3,3}$ -hAc₆c al posto della Leucina hanno mostrato un' attivita' buona, ma non superiore a quella del peptide Parent. In particolare, l' isomero $\beta^{2,2}$ e' pi' potente del peptide contenente $\beta^{3,3}$ (fig. 2c) e questo e' sicuramente dovuto anche alla differente conformazione adottata dai 2 tripeptidi in soluzione.

Bibliografia

1. Prossnitz ER, Ye, RD (1997) The N-formyl peptide receptor: a model for the study of chemoattractant receptor structure and function. *Pharmacol Ther* 74: 73-102
2. Freer RJ, Day AR, Radding JA, Schiffmann E, Aswanikumar S, Showell HJ, Becker EL (1980) Further studies on the structural requirements for synthetic peptide chemoattractants. *Biochemistry* 19: 2404-2410
3. Le Y, Yang Y, Cui Y, Yazawa H, Gong W, Qiu C, Wang JM (2002) Receptors for chemotactic formyl peptides as pharmacological targets. *Int Immunopharmacol* 2: 1-13
4. Freer RJ, Day AR, Muthukumaraswamy N, Pinon D, Wu A, Showell HJ (1982) Formyl peptide chemoattractants: a model of the receptor on rabbit neutrophils. *Biochemistry* 21: 257-263
5. Higgins III JD, Bridger GJ, Derian CK, Beblavy MJ, Hernandez PE, Gaul FE, Abrams MJ, Pike MC, Slomon HF (1996) N-terminus urea-substituted chemotactic peptides: new potent agonists and antagonists toward the neutrophil fMLF receptor. *J Med Chem* 39: 1013-1015
6. Dentino AR, Raj PA, Bhandary KK, Wilson ME, Levine, MJ (1991) Role of peptide backbone conformation on biological activity of chemotactic peptides. *J Biol Chem* 266: 18460-18468
7. Dugas H, Laroche M, Ptak M, Labbè H (1993) Synthesis, biological activity, conformational analysis by NMR and molecular modelling of *N*-formyl-L-Met-L-Pro-L-Phe-OMe, a proline analogue of the chemotactic peptide *N*-formyl-L-Met-L-Leu-L-Phe-OH. *Int J Peptide Protein Res* 41: 595-605
8. Lajoie G, Kraus J-L (1984) Rapid and efficient method for the N-formylation of C-blocked peptides. *Peptides* 5: 653-654
9. (a) Seebach D, Matthews JL (1997) β -Peptides: a surprise at every turn. *J Chem Soc Chem Commun* 21: 2015-2022. (b) Seebach D, Abele S, Sifferlen T, Hänggi M, Gruner S, Seiler P (1998) Preparation and structure of β -peptides consisting of geminally disubstituted $\beta^{2,2}$ - and $\beta^{3,3}$ -amino acids: a turn motif for β -peptides. *Helv Chim Acta* 81: 2218-2243

10. Palomo C, Oiarbide M, Bindi S, (1998) A Concise β -Lactam Route to Short Peptide Segments Containing β,β -Disubstituted β -Amino Acids. *J Org Chem* 63: 2469-2474
11. Wu Y-D, Wang D-P (1998) Theoretical studies of β -peptides models. *J Am Chem Soc* 120: 13485-13493
12. Schumann F, Müller A, Kokschi M, Müller G, Sewald N (2000) Are β -Amino Acids γ -Turn Mimetics? Exploring A New Design Principle for Bioactive Cyclopeptides. *J Am Chem Soc* 122: 12009-12010

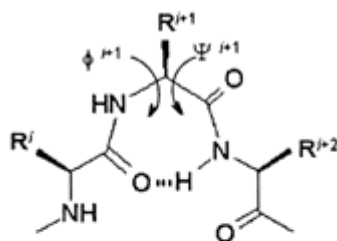
4. Studi di analisi conformazionale di piccoli peptidi bioattivi di interesse farmaceutico

4.1 Induzione di un ripiegamento sullo scheletro peptidico attraverso aminoacidi C^α-tetrasostituiti: acido 4-amino-1,2-dithiolan-4-carbossilico (Adt) e acido 1-amino-ciclopentano-1-carbossilico(Ac5c), come induttori di γ -turn: studi sperimentali e computazionali.¹

Un approccio ben conosciuto per generare modelli peptidici caratterizzati da una certa rigidità conformazionale, allo scopo di esaltare l'alta tendenza ad adottare strutture secondarie predeterminate e migliorare la stabilità metabolica, è l'introduzione di α aminoacidi C^α-tetrasostituiti nel backbone peptidico.² Quando l'importanza biochimica dei peptidi viene considerata insieme al loro potenziale ruolo come agenti terapeutici, è importante utilizzare una metodologia efficiente che sia capace di influenzare la conformazione preferenziale dei peptidi. Basandosi su questo approccio, sono stati progettati ligandi potenti e selettivi e si continuano ad ottenere informazioni circa le relazioni conformazione-attività.³

Sono già stati pubblicati sia studi teorici che sperimentali circa aminoacidi contenenti 2 catene lineari legate all'atomo di carbonio C^α e anche studi sui residui C^α-tetrasostituiti con un carbonio α quaternario che è parte di un ciclo, con particolare riferimento all'acido-1-aminocicloalcano α -carbossilico, Ac_nc, dove n, indica il numero di atomi di carbonio dell'anello del cicloalcanico.⁴ L'interesse di analoghi ciclici contenenti uno o più eteroatomi all'interno di un ciclo è relativamente più recente e

deriva dal potenziale di questi aminoacidi di combinare, quando inseriti in un backbone peptidico, la tendenza di stabilizzare una conformazione ripiegata specifica e stabilire interazioni inter e intra molecolari attraverso la funzionalità presenti nella catena laterale.⁵ La conformazione γ -turn coinvolge tre residui di aminoacidi consecutivi e può essere stabilizzata da legame idrogeno intramolecolare tra il CO del primo residuo i e l' NH del terzo residuo $i+2$ formando un pseudo anello a 7 membri. Come mostrato in figura, il γ -turn e il γ -turn inverso sono caratterizzati da ϕ e Ψ angoli di torsione particolari. Anche se meno frequente del β -turn, il γ -turn come struttura secondaria gioca un ruolo importante nel riconoscimento molecolare e la presenza di γ -turn in soluzione è stata ampiamente dimostrata.⁶



γ -Turn:

$\phi^{i+1} = 75^\circ$ (mean value)

$\Psi^{i+1} = -64^\circ$ (mean value)

Inverse γ -Turn:

$\phi^{i+1} = -79^\circ$ (mean value)

$\Psi^{i+1} = 69^\circ$ (mean value)

Figura 1. Tipi di γ -turn

Come proseguimento degli studi nel campo degli α -aminoacidi eterociclici contenenti un atomo di carbonio quaternario, noi siamo partiti recentemente con lo studio di nuovi gruppi di peptidi sintetici contenenti l' Adt, un residuo achirale correlato alla cisteina,

caratterizzato dalla presenza di un anello a 5 membri che contiene la funzione disolfurica. Sebbene, l' 1-2 ditiolano può essere facilmente ottenibile dal corrispondente 1,3 diolo, la sua reattività chimica si distingue chiaramente da quella degli 1,2-disolfuri lineari o contenuti in anelli con $C > 7$ atomi di carbonio, e rappresenta la caratteristica strutturale che è la chiave per interpretare l' attività biologica di certe molecole come ad esempio l' acido lipoico.⁷ Per questi motivi, lo studio di peptidi sintetici che contengono un residuo di questo tipo sono interessanti da esplorare. Noi abbiamo sintetizzato e studiato le proprietà dell' Ac₅C e Adt come induttori di γ -turn, facendo un confronto di 2 studi separati, uno di tipo sperimentale e uno di tipo teorico.

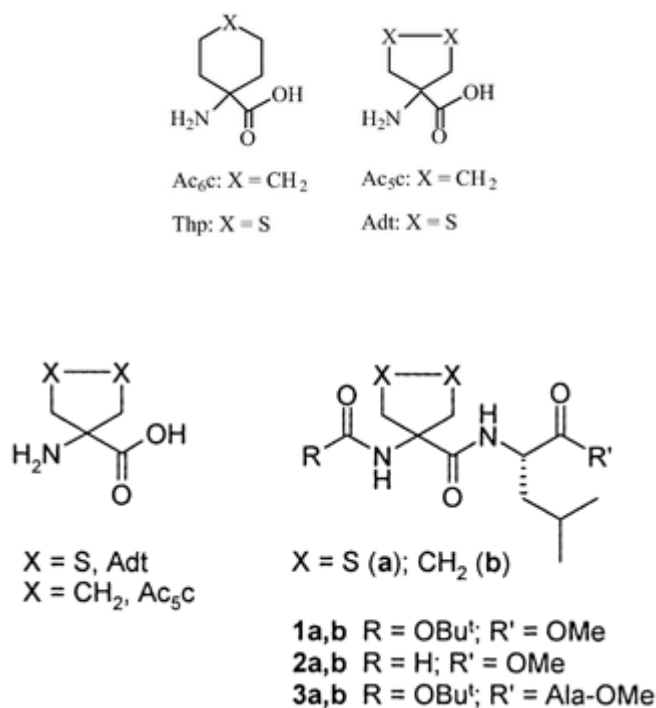


Figura 2. Peptidi modello sintetizzati

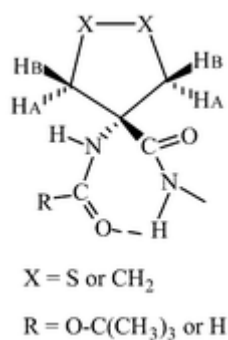
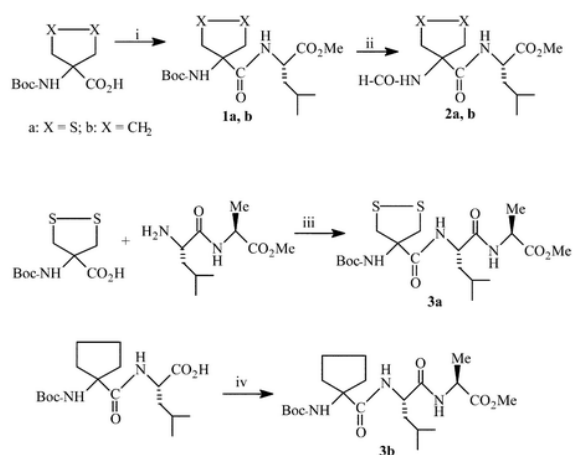


Fig. 6 Intramolecularly H-bonded γ -turn structure of dipeptides **1a**, **2a** ($X = S$) and **1b**, **2b** ($X = CH_2$).



Scheme 1 Reagents and conditions: i: HOBt, EDC, H-Leu-OMe·HCl, DMF; ii: HCOOH, EEDQ; iii: HOBt, EDC, TEA, DMF; iv: HOBt, EDC, H-Ala-OMe, TEA, DMF.

Sintesi

La sintesi dei dipeptidi Boc-Adt-Leu-OMe (**1a**), Boc-Ac_{5c}-Leu-OMe (**1b**), HCO-Adt-Leu-OMe (**2a**) e HCO-Ac_{5c}-Leu-OMe (**2b**), e i tripeptidi Boc-Adt-Leu-Ala-OMe (**3a**) e Boc-Ac_{5c}-Leu-Ala-OMe (**3b**) è stata fatta secondo lo schema 1, **1a** e **1b** sono stati preparati accoppiando la Boc-Ac_{5c}-OH oppure Boc-Adt-OH con la H-Leu-OMe col metodo dell' HOBt-EDC. Il metodo della carbodiimmide è stato usato inoltre per ottenere i tripeptidi **3a** e **3b**, ma con procedure diverse: nel caso del **3a**, il derivato

ditiolanico Boc-Adt-OH fu accoppiato con il dipeptide H-Leu-Ala-OMe, mentre per il **3b**, fu prima preparata la Boc-Ac_{5c}-Leu-OH e fu accoppiata con la H-Ala-OMe.

La trasformazione dei Boc derivati nei rispettivi *N*-formil derivati è stata fatta seguendo la procedura di Lajoie-Kraus,⁸ cioè con trattamento con acido formico e EEDQ.

Studi conformazionali:

Calcoli teorici condotti sui modelli: Ac-Adt-NHMe e Ac-Ac_{5c}-NHMe hanno suggerito che i due residui ciclici inducono nel vuoto e in cloroformio un ripiegamento γ -turn. In soluzione di CDCl₃ studi sperimentali NMR e IR hanno confermato la tendenza dell'Adt e dell'Ac_{5c} ad indurre la conformazione γ -turn che invece non è mantenuta in solventi polari come il DMSO. Sono state eseguite titolazioni di soluzioni dei dipeptidi **1a, b** e **2a, b**, e dei tripeptidi **3a** e **3b** in CDCl₃ con DMSO, che hanno messo in evidenza l'inaccessibilità al solvente del NH della Leu coinvolta nel legame idrogeno intramolecolare. Per confermare la presenza di legame idrogeno sono stati esaminati gli spettri IR in CHCl₃ nella regione dello stretching dell'NH. Come si sa, un NH amidico non legato dà un segnale netto intorno a 3470-3400 cm⁻¹ che viene shiftato nella regione 3400-3300 cm⁻¹ quando è coinvolto in un legame idrogeno.⁹ Nello spettro di **1a** si possono osservare 2 bande a 3306 e 3419 cm⁻¹ che corrispondono all'NH legato e all'NH libero. Il rapporto tra le 2 intensità dell'assorbimento sono indipendenti dalla concentrazione, in un range tra 10mM e 1mM. Quindi, possiamo escludere legami idrogeno intermolecolari, e possiamo assegnare il legame idrogeno all'NH della Leu. Sebbene la posizione dell'assorbimento dell'NH non può essere inequivocabilmente associata al tipo di struttura ripiegata, lo stesso comportamento lo ritroviamo in peptidi

che contengono strutture come HCO-Ac_{6c}-Leu-OMe e HCO-Thp-Leu-OMe che adottano strutture γ -turn. Tutti questi dati sono in accordo con i risultati dei calcoli computazionali che indicano una significativa presenza di conformeri che adottano una conformazione a γ -turn, caratterizzata dal legame idrogeno intramolecolare nel caso dei Boc derivati tra NH Leu e CO uretanico.

Ulteriori informazioni sulla conformazione adottata dagli N-Boc dipeptidi può essere ottenuta dall' esame dei NOE. L' osservazione di cross-peak tra NH...NH corrisponde ad una stretta vicinanza degli NH dei 2 aminoacidi conferma una struttura ripiegata. Le titolazioni con DMSO ripetute anche per i tripeptidi **3a** e **3b** hanno mostrato che l' NH uretanico si muove verso campi bassi con l' aumento della concentrazione del DMSO mentre l' NH-Leu è praticamente fermo. Un comportamento intermedio è osservato per l' NH del residuo centrale. L' esperimento conferma la proprietà dell' Ac_{5c} e Adt di indurre γ -turn e in peptidi in cui è possibile la compartecipazione di β -turn. La sensibilità intermedia al solvente dell' NH-Ala può essere spiegata ammettendo la presenza di una certa popolazione di β -turn o un doppio γ -turn centrato sul residuo Ac_{5c}, e Adt.

Bibliografia

- 1) M. Aschi, G. Lucente, et al. *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, 1, 1980-1988.
- 2) C. Toniolo, M. Crisma, F. Formaggio et al. *Biopolymers (peptide Sciences)*, **2001**, 60, 396-419 e riferimenti contenuti.
- 3) I. Torrini, G. Pagani Zecchini et al., *Biopolymers*, **1996**, 4, 1573-1576.
- 4) C. Toniolo, *Janssen Chim. Acta*, **1993**, 11, 10-16
- 5) E. Morera, M. Nalli et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, 10, 1585-1588 e riferimenti contenuti.

- 6) S. Herrero, M. T. Garcia-López et al., *J.Org.Chem.*, **2002**, 67, 3877-3873 e riferimenti contenuti.
- 7) L. Teuber, *Sulfur Rep.*, **1990**, 9, 257-349 e riferimenti contenuti.
- 8) G . Lajoie, J. L. Kraus, *Peptides*, **1984**, 5, 563.

4.2 Studi conformazionali su peptidi contenenti l' acido 4-amino-1,2-ditiolan-4-carbossilico (Adt)

Come proseguimento della ricerca su aminoacidi C^α-tetrasostituiti contenenti una catena laterale eterociclica e' stato condotto uno studio sulle preferenze conformazionali indotte dall' inserzione dell' acido 4-ammino-1,2-ditiolan-carbossilico (Adt)¹⁻⁴ un backbone peptidico; stato così sintetizzato il dipeptide achirale N-protetto metilammide Boc-Adt-Adt-NHMe (1) ed è stata studiata la sua conformazione allo stato solido ed in soluzione.

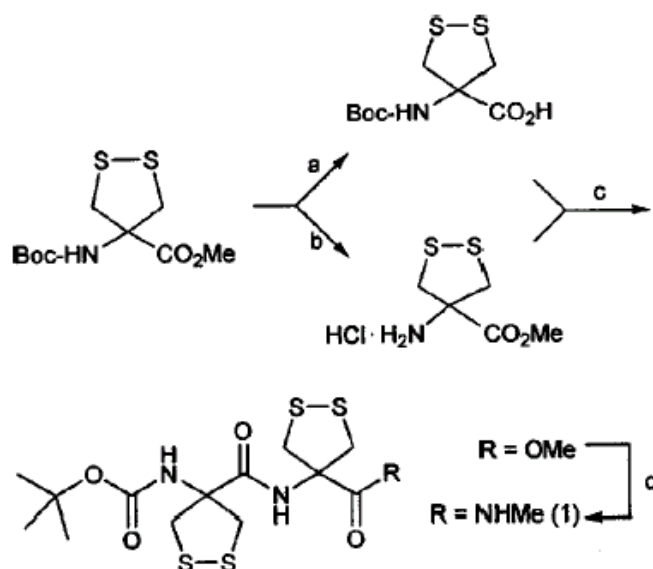


Figure 1 Synthesis of Boc-Adt-Adt-NHMe (**1**). a: NaOH 2 M, MeOH; b: SOCl₂, MeOH; c: HOBt, EDC, TEA, DMF; d: CH₃NH₂, MeOH.

Per acquisire informazioni sulle conformazioni preferite in soluzione del peptide Boc-Adt-Adt-NHMe (**1**) sono stati studiati i chemical shift NMR dei protoni ammidici come illustrato precedentemente, e ulteriori informazioni sono state ottenute con le analisi dello spettro NOE, e IR. Il composto **1** che contiene due residui achirali di Adt, mantiene una struttura ripiegata come già mostrato da parte del suo carba-analogo Boc-Ac₅C-Ac₅C-NHMe⁵.

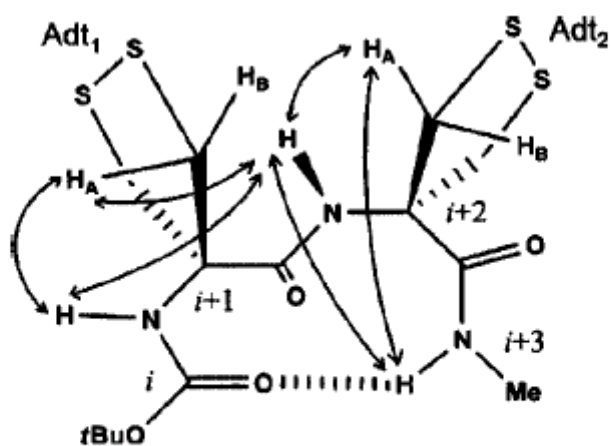


Figure 3 Relevant interproton correlations as deduced by NOESY experiments for Boc-Adt-Adt-NHMe (**1**).

Bibliografia

1. Morera E., Nalli M., Pinnen F., Rossi D., Lucente G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1585-1588 and ref. Cited therein.
2. Morera E., Lucente G., Ortar G., Nalli M., Mazza F., Gavazzo E., Spisani S. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 147-157.
3. Morera E., Pinnen F., Lucente G., *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1139-1142.
4. Aschi M., Lucente G., Mazza F., Mollica A., Morera E., Nalli M., Paglialunga Paradisi M. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 190-1988.
5. Bardi R., Piazzasi A. M., Toniolo C., Sukumar M., Balaram P., *Biopolymers* **1986**, *25*, 1635-1644.

6. Peptidi oppioidi ¹⁻⁴

Introduzione

Il sollievo dal dolore costituisce un tema centrale della ricerca sugli agenti analgesici oppioidi. Il dolore occupa un ruolo vitale nell'economia degli organismi viventi. La sensazione di dolore è un meccanismo d'allarme che ci avverte che esiste una qualche ingiuria interna o esterna o un conflitto di qualche tipo. Frequentemente, comunque la sensazione di dolore persiste chiaramente anche dopo aver adempito alla sua funzione di allerta. Questo dolore inutile è di solito il target delle droghe analgesiche.

La morfina, è l'alcaloide principale dell'oppio, fu isolato nel 1803 da Sarturer, ma la chimica organica era ancora in una forma embrionale e non riuscì a immaginarne l'utilizzo terapeutico. Lo stesso nome di morfina, gli venne attribuito per le sue proprietà sedative, e non per quelle analgesiche. La complessità della struttura ritardò l'assegnazione della corretta struttura per quasi un secolo dal suo isolamento, ma nel frattempo si erano comunque studiate le sue trasformazioni in droghe chimiche come il suo derivato diacetilato, l'eroina, sintetizzata nel 1884. (figura 1) La struttura ora riconosciuta corretta per la morfina fu assegnata nel 1925, proposta da Gulland e Robinson e indipendentemente da Schopt nel 1927. Contrariamente a oggi che le tecniche spettroscopiche ci aiutano ad assegnare le strutture, in quei tempi era richiesta la sintesi totale del composto il che ritardò di molto l'assegnazione.



Figura 1. morfina e diacetil morfina (eroina)

Enkefaline

Un interessante sviluppo negli ultimi anni e' stato quello di capire che molti peptidi, se non tutti, isolati precedentemente da tessuti endocrini, e concepiti classicamente come ormoni, sono invece estensivamente diffusi nei neuroni, la loro funzione e' correlata al trasferimento di un messaggio tra una cellula e un'altra, dove la cellula originatrice puo' essere un neurone o una cellula endocrina e il target un' ampia varieta di cellule incluso un altro neurone. Il metodo di trasporto al target puo' essere variabile, via corrente sanguigna, assoni, dendriti, soma o semplicemente extracellulare per diffusione.

A dominare la scena dei peptidi oppioidi sono le enkephaline, Leu-enkefalina e Met-enkefalina piu' una certa varieta' di precursori e endorfine. (tab. 1) L' isolamento e la caratterizzazione delle enkefaline porto' a una ricerca intensiva mirata a trovare composti con migliore profilo farmacologico. Oltre un migliaio di composti sono stati sintetizzati e testati e sono tuttora soggetti a piu' accurate analisi farmacologiche. L' obiettivo principale e' stato quello di ovviare al problema del metabolismo, del trasporto, assorbimento, attraverso la manipolazione chimica dell' enkefaline.

Precursor	Endogenous peptide	Amino acid sequence
Pro-opiomelanocortin(POMC)	β -Endorphin	YGGFMTSEKSQTPLVTL- FKNAIIKNAYKKGE
Pro-enkephalin	[Met]enkephalin	YGGFM
	[Leu]enkephalin	YGGFL
		YGGFMRF
		YGGFMRGL
	Metorphamide	YGGFMRRV-NH ₂
Pro-dynorphin	Dynorphin A	YGGFLRRIRPKLKWWDNQ
	Dynorphin A(1-8)	YGGFLRRI
	Dynorphin B	YGGFLRRQFKVVT
	α -neoendorphin	YGGFLRKYPK
	β -neoendorphin	YGGFLRKYP
Pro-nociceptin / OFQ	Nociceptin	FGGFTGARKSARKLANQ
Pro-endomorphin*	Endomorphin-1	YPWF-NH ₂
	Endomorphin-2	YPFF-NH ₂

Tabella 1. Ligandi endogeni oppioidi

Uno dei maggiori goals della moderna chimica farmaceutica e' quello di trovare analoghi di potenza uguale o maggiore della morfina dove l' azione analgesica senza dipendenza e assuefazione.

La maggior parte di questi peptidi oppioidi endogeni (enkefaline, deltorfine, ethorphine) derivano dal processo di trascrizione post-traslazionale del gene POMC (propiomelanocortinic gene) dal quale derivano inoltre i peptidi melanocortinici α - β - γ -MSH. Oggi la morfina e' usata per controllare il dolore medio e severo, ottendendo buoni risultati con i malati in fase terminale dove gli effetti collaterali divengono

accettabili, ma altri problemi etici non ne permettono l'uso per il dolore cronico in malati non terminali.

Bibliografia

1. Hruby, V. J.; Agnes, R. S.; Lee, Y.-S.; Davis, P.; Ma, S.-W.; Lai, J.; Porreca, F. *Peptides: The Wave of the Future, Proceedings of the Second International and the Seventeenth American Peptide Symposium, San Diego, CA, United States, June 9-14, 2001*, 969-970.
2. Hruby, V. J.; Matsunaga, T. O. *Synthetic Peptides (2nd Edition)*, **2002**, 292-376.
3. Hruby, V. J.; Li, G.; Qian, X.; Haskell-Luevano, C.; Lung, F. -D. T.; Kover, K.; Misicka, A.; Yamamura, H. I.; Davis, T.; Porreca, F. *Peptides 1994, Proceedings of the European Peptide Symposium, 23rd, Braga, Port., Sept. 4-10, 1994, 1995*, (Meeting Date 1994), 62-64
4. Gulya, K.; Pelton, J. T.; Gehlert, D. R.; Wamsley, J. K.; Duckles, S. P.; Hruby, V. J.; Yamamura, H. I. *Neural Endocr. Pept. Recept., [Annu. Wash. Spring Symp. Health Sci.]*, **5th, 1986**, 567-80.

5.1 Analoghi lineari e ciclici della Bifalina

La “Bifalina” (Biphalin) (Figure 1) e’ un octapeptide opioide con una struttura simmetrica dimerica (palindromo) basata su 2 identiche porzioni derivate delle enkefaline e unite tail to tail da una molecola di idrazina.

Questa particolare struttura esalta l’ attivit  antinocicettiva delle enkefaline, con un meccanismo ancora poco chiaro, basato probabilmente su un binding cooperativo, o sulla sesitenza alle peptidasi.¹ La Bifalina ha un eccellente affinita’ di binding per i recettori opioidi μ e δ con un EC₅₀ di circa 1 - 5 nM verso entrambi i recettori. E’ un potentissimo analgesico, (circa 250 volte la morfina, se somministrata per via intratecale), e potente come l’ etorfina.² La bifalina non mostra nessun significativo effetto collaterale tipico dei peptidi opioidi, come depressione respiratoria, assuefazione e dipendenza.³⁻⁴

Negli ultimi 10 anni ci sono stati molti tentativi di miglioramento di questa molecola al fine di ottenere un prodotto utilizzabile in ambito terapeutico.(e.g.,3-6)

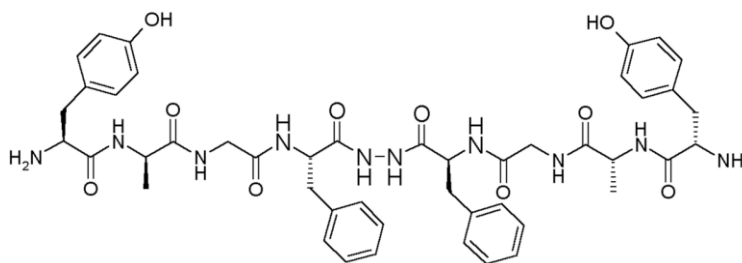


Figura 1. Bifalina

La Figura 2 mostra come il ponte idrazinico e' stato usato come scaffold per il design di altri peptidi oppioidi dove il farmacoforo era formato soltanto Tyr e D-Phe', con parziale overlapping dei 2 farmacofori. Questa molecola, risulta' essere molto attiva, e molto piu' semplice da sintetizzare rispetto alla bifalina.⁸

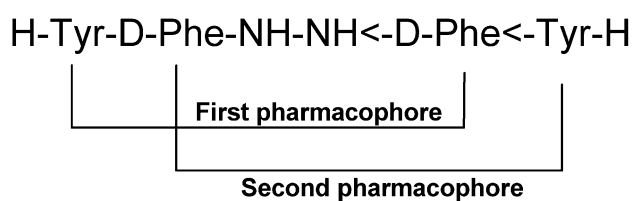


Figura 2. Analogo della bifalina con farmacoforo ridotto

Nel design di nuovi peptidi lineari analoghi della bifalina, **1a-3a** e **1b-3b**, il ponte idrazinico è stato sostituito con 3 differenti diammine, 2 aromatiche cicliche e una secondaria ciclica: 1,4-phenylenediamina, 1,2-phenylenediamina and piperazina rispettivamente. Questo approccio è stato applicato sia alla bifalina come tale, che a suo analogo con farmacoforo semplificato. Figura 3

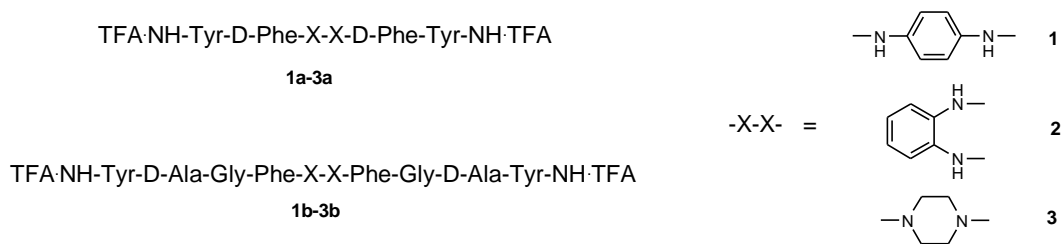


Figura 3. peptidi progettati, analoghi della bifalina con linker nn idrazinico

Alla luce dei dati riportati sopra, e prendendo in considerazione il grande interesse di ottenere peptidi oppioidi con grande selettività, potenza ed efficacia, abbiamo inoltre progettato 2 peptidi ciclici.

Abbiamo così ottenuto 2 analoghi ciclici della bifalina, figura 4, contenente un ponte disolfuro, creato tra 2 residui di cisteina che sostituiscono i residui di D-Ala in posizione 2, 2' della bifalina nativa.

I 2 peptidi ciclici, sono entrambi di 22 membri e si differenziano soltanto per la stereochimica della coppia di residui di Cisteina.

Questi due differenti modelli, sono peptidi ciclici molto diversi rispetto ai peptidi ciclici usuali, infatti al livello del ponte idrazinico presentano una inversione della direzione dei legami amidici.

Risultati

I composti **1a-3a** hanno mostrato tutti uno scarso binding coi recettori oppioidi, che riflettono una simile bassa attività in vitro. La causa della perdita di attività, in questo caso è facilmente imputabile alla grande differenza strutturale dei peptidi di partenza

rispetto al parent. E' infatti noto che l' orientamento e la distanza tra le due catenela laterali aromatiche di Tyr e Phe sono infatti critiche.

Al contrario, i composti **1b-3b** hanno mostrato una eccezionalmente buona affinità di binfing verso i recettori oppioidi mu e delta e una ottima attività in vitro. In particolare, l' analogo **1b** e' confrontabile con la bifalina, e il composto **2b** si lega al recettore 3 - 5 volte meglio della bifalina, e I saggi biologici di attività in vitro riflettono lo stesso pattern.. L' analogo **3b** mostra una selettività 1:10 sui recettori delta, verso mu. Questa selettività e' molto piu' evidente nell' analisi delle bioattività, dove i saggi biologici sono 50 volte più alti verso il recettore delta rispetto al mu. Confrontando questi dati biologici, con quelli della bifalina, si vede come il ridotto grado di libertà tra i 2 farmacofori e la loro posizione reciproca ha influenza sul binding e sull' attività e puo' anche modificare la selettività verso i diversi recettori oppioidi.

La presenza del farmacoforo classico Tyr-D-Ala-Gly-Phe fa' si che I nuovi analoghi mantengano l' alta attività della bifalina e in certi casi sia addirittura aumentata. Inoltre, la grande attività del composto **3b** porta a concludere che l' NH dell' idrazina non partecipa al binding con il recettore, e non sia quindi il responsabile dell' attività.

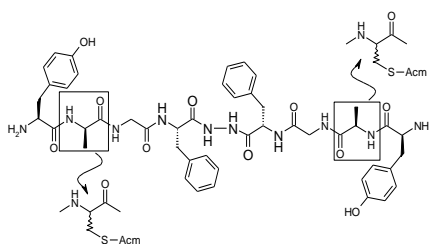


Figura 4. I residui di D-Ala vengono sostituiti con 2 residui di D- Cys (Acm)

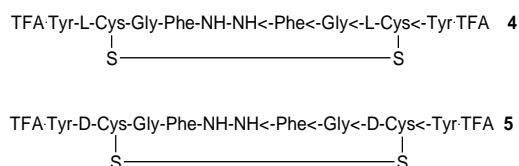


Figura 5. Analoghi ciclici della Bifalina

Dei 2 analoghi ciclici ottenuti, solo l' analogo **5** contenente D-Cys si e' rivelato piu' potente della Bifalina. In particolare, pur monstrandodati di binding e di attivita' in vitro molto simili a quelli della Bifalina, il test del GTP binding, ha rivelato una altissima capacita' da parte di questo analogo, ua volta legatosi al recettore, l' attivazione della proteina G accoppiata ai recettore delta e mu oppioidi.

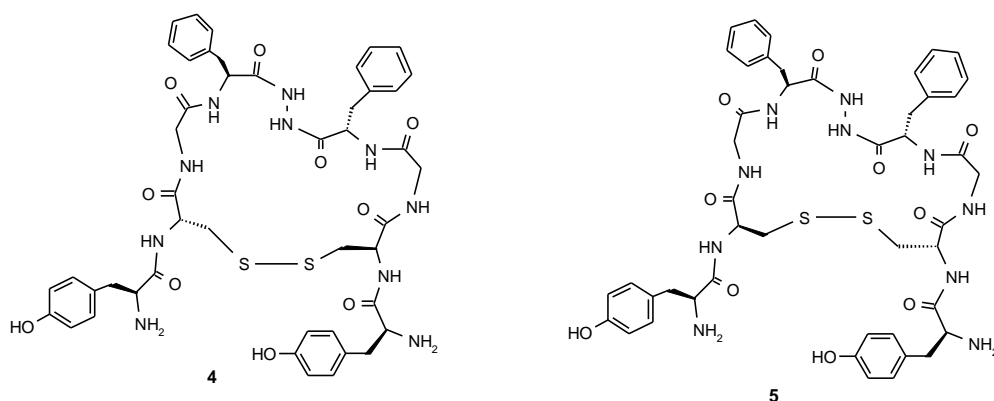


Figura 6. Struttura degli analoghi ciclici della Bifalina **4** e **5**

Bibliografia

1. (a) Hruby, V. J. and Cheryl, A. S. *Advances in Amino Acid Mimetics and Peptidomimetics* **1999**, *2*, 191-220. (b) Hruby, V. J. and Mosberg, I. *Peptides*, **1982**, *3*, 329-336.
2. (a) Hruby, V. J. and Balse, P. M. *Current Medicinal Chemistry* **2000**, *7*, 945-970. (b) Hruby, V. J. J.

Med. Chem. **2003**, *46*, 4215-4231

3. Cowell, S. M.; Lee, Y. S.; Cain J. P. and Hruby V., *J. Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 2785-2798.
4. (a) Li, P. and Roller, P. *Curr. Top. Med Chem* **2002**, *2*, 325-341. (b) Murcko, Ajay and. Murcko, M .A. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4953-4967.
5. (a) Eguchi, M.; Shen, R. Y.; Shea, J. P.; Lee, M. S.; Kahn, M. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1395-1398. (b) Jong, L.; Zaveri, N.; Toll, L. *Bioorg Med Chem Lett.* **2004**, *14*, 181-185.
6. Kaptein, B.; Broxterman, Q. B.; Schoemaker, H. E.; Rutjes, F. P. J. T.; Veerman, J. J. N.; Kamphuis, J.; Peggion, C.; Formaggio, F. and Toniolo, C. *Tetraedron*, **2001**, *57*, 6567-6577.
7. (a) DiMaio, J. and Schiller, P. W. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1980**, *77*, 7162-7166. (b) Mosberg, H. I.; Hurst, R.; Hruby, V. J.; Galligan, J. J.; Burks, T. F.; Gee, K.; Yamamura, H. I. *Biochem. biophys. Res. Com.* **1982**, *106*, 506-512. (c) DiMaio, J.; Nguyen, T. M.; Lemieux, C.; Schiller, P. W. *J. Med. Chem.* **1982**, *25*, 1432-1438. (d) Hruby, V. J.; Bartosz-Bechowski, H.; Davis, P.; Slaninova, J.; Zalewska, T.; Stropova, D.; Porreca, F.; Yamamura, H. I. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3957-3962.
8. (a) Shuldiner, A. R.; Newland, R. J.; Rosenblatt, M. *Archiv. Biochem. Biophys.* **1985**, *238*, 111-117. (b) Richman, S. J.; Goodman, M.; Nguyen, T. M.; Schiller, P. W. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1985**, *25*, 648-662. (c) Bobrova, I. V.; Myshliakova, N. A.; Papsuevich, O. S.; Vosekalna, I. A.; Mekshun, E. I. *Bioorg. Khim.* **1995**, *21*, 275-281 (d) Siemion, I. Z.; Szewczuk, Z.; Herman, Z. S.; and Stachura, Z. *Mol. Cel. Biochem.* **1981**, *34*, 23-29.
9. (a) Lipkowski, A. J.; Koneka, A. M.; Sroczynska, I.; *Peptides* **1982**, *3*, 697-700. (b) Lipkowski, A. W.; Konopka, M.; Osipiak, B.; Gumulka, S. W., *Peptides 1982, Proc. Eur. Pept. Symp.*, 17th, **1983**, de Gruyter, Berlin, 481-486. (c) Horan, P. J.; Mattia, A.; Bilsky, E. J.; Weber, S.J.; Davis, P. T.; Yamamura, H. I., Malatynska, E.; Applyard, S. M.; Slaninova', J.; Misicka, A.; Lipkowski, A. W.; Hruby, V. J.; and Porreca, F. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1993**, *265*, 1446-1454. (d) Lipkowski, A. W.; Misicka, A.; Davis, P.; Stropova, D.; Janders, J.; Lachwa, M.; Porreca, F.; Yamamura, H. I. and Hruby, V. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2763-2766. (e) Misicka, A.; Lipkowski, A. W.; Stropova, D.; Yamamura, H. I.; Davis, P.; Porreca, F., and Hruby, V. J., *Peptide Science*, **1999**, 726-727
10. Han, So-Y. and Kim, Y.-A., *Tetraedron*, **2004**, *60*, 2447-2467.
11. Cuthbertson, A. and Indrevoll, B. *Org. Lett.*, **2003**, *5*, 2955 -2957.
12. (a) Diaz, H.; Espina, J. R. and Kelly, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8316-8318. (b) Basak, A.; Rudra, K. R.; Bag, S. S. and Basak, A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2002**, 1805-1089.

13. Andersen, N. H.; Neidigh, J. W.; Harris, S. M.; Lee, G. M.; Liu, Z. and Tong, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8547-8561.
14. Mohaadi, F.; Richards, N. G. J.; Guida, W. C.; Liskamp, R.; Lipton, M.; Caufield, C; Chang, G.; Hendrickson, T.; Still, W. C. *J. Comput. Chem.* **1990**, *11*, 440-467.
15. (a) Kaminski, G.; Friesner, R. A.; Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W. L.; *J. Phys. Chem.* **2001**, *105*, 6474-6487. (b) Jorgensen, J.; Tirado-Rives, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1657.
16. Qui, D.; Shenkin, P. S.; Hollinger, F. P; Still, W. C.; *J. Phys. Chem. A*, **1997**, *101*, 3005-3014.
17. (a) Kolossvary, I.; Guida, W. C.; *J. Am. Chem Soc.* **1996**, *118*, 5011-50-19 (b) Kolossvary, I.; Guida, W. C. *J. Comp. Chem.* **1999**, *20*, 1671-1684.
18. (a) Shenkin, P. S.; Mcdonald, D. Q. *J. Comp. Chem* **1994**, *15*, 899-916. (b) Parish, C.; Lombardi, R.; Sinclair, K.; Smith, E.; Goldberg. A.; Rappleye, M.; Dure, M. L. *Mol. Graph. Model.* **2002**, *21*, 129-150.
19. Hosohata, K.; Varga, E. V.; Alfaro-Lopez, J.; Tang, X.; Vanderah, R. W.; Porreca, F.; Hruby, V. J.; Roeske, W. R.; Yamamura, H. I. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *304*, 683-688. (b) Wang, A.; Gardell, L. R.; Ossipov, M. H.; Vanderah, T. W.; Brennan, M. B.; Hochgeschwender, U.; Hruby, V. J.; Malan Jr., T. P.; Lai, J.; Porreca, F. *J. Neuroscience* **2001**, *21*, 1779-1786.
20. (a) Polt, R.; Porreca, F.; Szabo, L; Bilsky, E. J.; Davis, T.; Horvath, R.; Abbruscato, T. J.; Yamamura, H. J.; Hruby, V. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 7114-7118. (b) Misicka, A.; Lipkowski, A. W.; Horvath, R.; Davis P.; Kramer, T. H.; Yamamura, H. I.; Hruby, V. J. *Life Sci.* **1992**, *51*, 1025-1032.
21. Kramer, T. H.; Davis, P.; Hruby, V. J.; Burks, T. F.; Porreca, F. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1993**, *266*, 577-584.