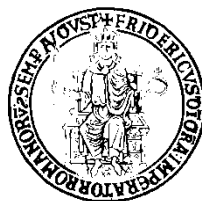


UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"



FACOLTA' DI FARMACIA

Dottorato di Ricerca in Scienza del Farmaco

XX Ciclo

**LIGANDI DEL RECETTORE UT
DELL'UROTENSINA II**

Tutor:

Chiar.mo Prof. Paolo Grieco

Candidato:

Dott.ssa Marina Sala

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Maria Valeria D'Auria

1. Introduzione

1.1 L'Ipertensione

L'Ipertensione è la più comune delle malattie cardiovascolari nonché il più alto fattore di rischio per le malattie coronariche e l'insufficienza cardiaca. Numerosi studi epidemiologici, infatti, hanno indicato che all'aumentare della pressione sanguigna, sistolica o diastolica, aumenta la probabilità degli eventi coronari e della mortalità da malattia dell'arteria coronaria. Gli effetti vascolari dovuti ad un'elevata pressione sanguigna promuovono la malattia aterotrombotica con conseguenti disfunzioni cardiache, cerebrali e renali.

L'Ipertensione, inoltre, è causa di due specifiche anomalie, connesse alla crescita vascolare: il rimodellamento ipertrofico e l'aterosclerosi, che sembrano essere caratterizzate da lesioni patologiche simili ma che hanno composizione e distribuzione anatomica molto diverse. Il rimodellamento ipertrofico comporta un aumento nel numero di cellule (iperplasia) e nella dimensione (ipertrofia), depositi extracellulari fibrillari e non fibrillari. L'aterosclerosi, invece, è caratterizzata da un nucleo di lipidi, noto come ateroma, che si deposita nell'intima di arterie di grandi e medie dimensioni. Il progredire poi a lesione avanzata, con la formazione di placche fibrose, è dipendente dalle forze emodinamiche, quali ipertensione e presenza nel plasma di LDL ossidate. Nei modelli animali di ipertensione, infatti, è stata evidenziata una ridotta presenza di ossigeno, questa ipossia può condurre alla produzione di specie ossigeno reattive (ROS) ed al danneggiamento tissutale, che a loro volta possono amplificare il livello di infiltrazione delle LDL. Lo stress ossidativo, inoltre, converte LDL in LDL ossidata nella parete dell'arteria. Queste LDL ossidate interagiscono con gli agenti vasoattivi, quale angiotensina II, endothelin-1, e serotonina, nell'induzione dell'iperplasia delle

cellule vascolari della muscolatura liscia (VSMC). L' Ipertensione quindi, è associata sia ad uno stato prematuro che avanzato dell'aterosclerosi.

Tuttavia, i meccanismi molecolari che legano l'ipertensione allo sviluppo e alla progressione dell'aterosclerosi resta poco chiaro. Nel collegare, però, una predisposizione per l'aterosclerosi con l'ipertensione, è importante considerare non solo gli effetti meccanici di un'elevata pressione arteriosa ma anche il cluster di caratteristiche cliniche conosciuta come sindrome metabolica. Una diminuita sensibilità all'insulina è caratteristica dell'ipertensione essenziale, anche in soggetti non obesi, e viene ulteriormente aggravata dall'obesità. Nella sindrome metabolica l'insulino resistenza può contribuire all'ipertensione e alla predisposizione a sviluppare il diabete mellito di tipo 2. Ciascuna di queste caratteristiche è aterogena e può aumentare il rischio di malattie cardiovascolari.

L'ipertensione cronica, inoltre, determina una disfunzione endoteliale, che si manifesta con azioni sugli agenti vasoattivi e sulle citochine, effetti sull'afflusso del sodio, cambiamenti nella reologia del sangue, ed alterazioni nella composizione vascolare della parete.

Tutti questi fattori quindi causati dall'ipertensione portano ad una progressione dell'ipertensione stessa (Figura 1).¹

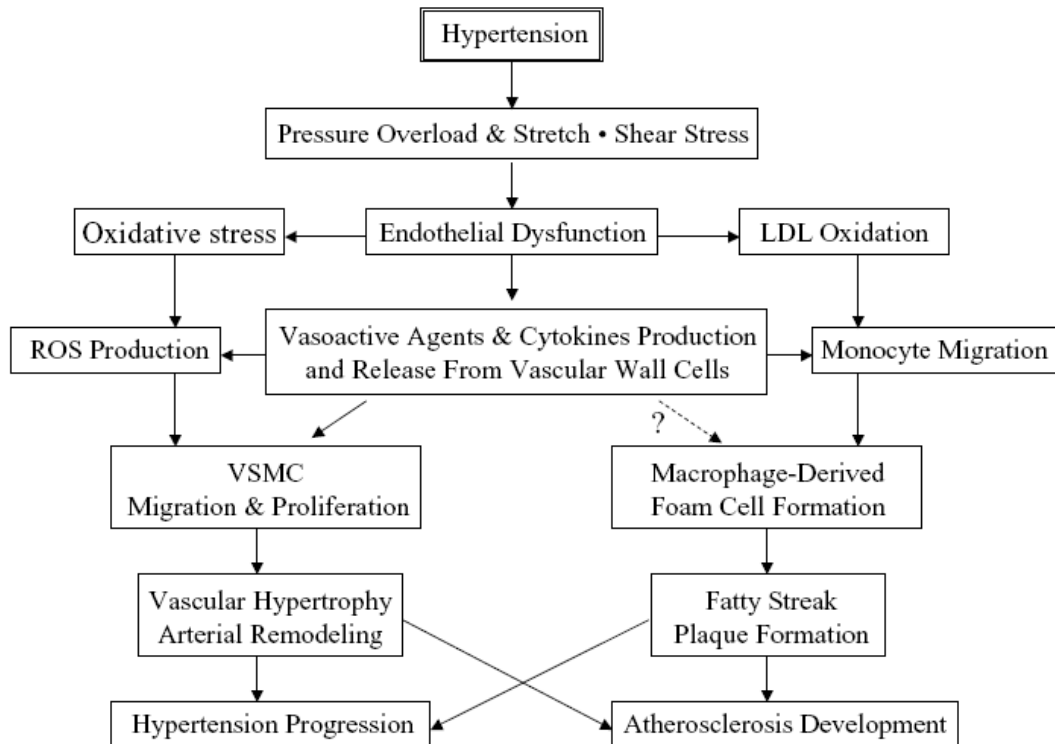


Figura 1. Relazione tra ipertensione, rimodellamento vascolare e aterosclerosi (ROS, specie ossigeno reattive, LDL, lipoproteine a bassa densità, VSMC, cellule vascolari della muscolatura liscia).

Nella maggior parte dei casi l'ipertensione, può essere trattata in maniera soddisfacente con la terapia farmacologica. Poiché la pressione arteriosa è data dal prodotto della gittata cardiaca e della resistenza vascolare periferica, essa può essere ridotta per azione farmacologica su uno di questi due parametri o su entrambi. Un farmaco può diminuire la gittata cardiaca per inibizione della contrattilità miocardica o per riduzione della pressione di riempimento ventricolare. Quest'ultima può essere ottenuta per azione sul tono venoso o, per effetto sui reni, sul volume ematico. Un farmaco può ridurre le resistenze periferiche agendo sulla muscolatura liscia e determinando un rilassamento dei vasi di resistenza o interferendo con l'attività di

sistemi che producono contrazione dei vasi di resistenza (per es. sistema nervoso simpatico). L'impiego simultaneo di farmaci con un meccanismo d'azione diverso rappresenta una strategia comunemente usata per ottenere un controllo efficace della pressione arteriosa riducendo al minimo gli effetti collaterali.²

Negli ultimi anni, il mondo scientifico ha rivolto sempre maggiore interesse verso i meccanismi fisiopatologici che regolano la normale omeostasi pressoria. In questo senso, le conoscenze acquisite riguardanti le alterazioni cellulari e molecolari che sono alla base dei disturbi della funzione contrattile, emodinamica e neuroumorale, hanno contribuito all'individuazione di nuovi bersagli biologici utili allo sviluppo di agenti terapeutici innovativi. Tra questi nuovi ligandi, particolarmente interessante è l'Urotensina, neuropeptide individuato per la prima volta negli anni 80, coinvolta in numerosi processi metabolici.

1.2 Urotensina II: struttura, recettore e attività biologica

L'Urotensina II (U-II) è un neuropeptide ciclico, isolato originariamente nell'urofisi del pesce Teleosto (*Gillichthys mirabilis*).^{3,4}

L'urofisi è un organo neurosecretore, localizzato nell'asse caudale-spinale del pesce molto simile funzionalmente al sistema ipotalamo-pituitario umano.⁵ L'Urotensina, così chiamata per la sua attività di stimolare la muscolatura liscia, è un peptide-ormone, simile alla somatostatina, con un potente effetto vasocostrittore, e quindi coinvolto nella regolazione dei parametri cardiovascolari.⁶ Deriva da processi post-traslazionali di 2 distinti precursori, pro-UT-1 e pro-UT-2. Non è ancora ben chiaro se questi precursori producano ulteriori peptidi (bioattivi o no) attraverso processi alternativi. Inoltre le

precise proteasi responsabili del cleavage di questi precursori e la conseguente attivazione dell'Urotensina non sono stati ancora chiariti.

Fino ad oggi sono state isolate, in differenti specie di pesci e anfibi, isoforme strutturali dell'U-II, osservando variazioni ricorrenti dal quinto al settimo residuo N-terminale e ed una sequenza cicloesapeptidica C-terminale con incluso un ponte disolfuro, che risulta essere estremamente conservata (Tabella 1).⁷

Peptide	Residui	Sequenza
U-II Pesce	12	Ala-Gly-Thr-Ala-Asp-c(Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys)-Val
U-II Trota	12	Gly-Gly-Asn-Ser-Glu-c(Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys)-Val
U-II Rana	13	Ala-Gly-Asn-Leu-Ser-Glu-c(Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys)-Val
U-II Ratto	14	Gln-His-Gly-Thr-Ala-Pro-Glu-c(Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys)-Ile
U-II Topo	14	Gln-His-Gly-Ala-Ala-Pro-Glu-c(Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys)-Ile
U-II Umana	11	Gln-Thr-Pro-Asp-c(Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys)-Val
Ocreotide	8	D Phe -c(Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys)-Thr
Somatostatina	14	Ala-Gly c(Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys)

Tabella 1. Sequenza aminoacidica delle isoforme dell' U-II, isolate da diverse specie, paragonate alla somatostatina e all'ocreatide.

In particolare la sequenza **FWK**, presente in tutte le isoforme, è simile a quella presente nella somatostatina e i in peptidi somatostatino-simili. Recentemente è stato isolato nel ratto un nuovo peptide, di cui è stata definita anche la struttura, e che presenta la stessa porzione C-terminale dell' U-II umana e del ratto (ACFWKYCV). Questo peptide è stato denominato URP (*Urotensin Related Peptide*), ha un'alta affinità nei confronti del recettore dell'Urotensina umana ed ha la stessa attività biologica

dell'U-II.⁸ L'isoforma umana dell'U-II (hU-II) è costituita da 11 aminoacidi ed ha una potenza vasocostrittoria di un ordine di magnitudine più grande dell'Endotelina-1, e ciò rende tale peptide il più potente vasocostrittore ad oggi noto.^{9,10}

Per tale motivo esiste un continuo interesse nell'esplorare la reale potenzialità dell'Urotensina II e di suoi analoghi come possibili target nei riguardi dell'ipertensione.

L'interesse verso l'isoforma umana dell'U-II è enormemente cresciuto negli ultimi anni in seguito all'identificazione di uno specifico recettore umano omologo al GPR14,¹¹ un recettore orfano appartenente alla famiglia dei GPCRs (G protein coupled receptors)¹² individuato già nel 1999 da Ames e collaboratori nel ratto e strutturalmente simile a quello della Somatostatina, degli oppioidi e della Galantina.¹³ Tale recettore, accoppiato ad una proteina G è stato denominato successivamente recettore UT (UTR).

Sebbene l'U-II e la somatostatina siano strutturalmente simili, UTR è selettivo solo per l'U-II. Concentrazioni micromolari di somatostatina, vasopressina, angiotensina, neuropeptide-Y e calcitonina non competono per il legame con il recettore né stimolano la mobilizzazione del calcio in cellule esprimenti l'UTR.

Il recettore UT umano è stato subclonato in un vettore d'espressione di mammifero e transfettato in cellule HEK-293, le quali, successivamente, sono state utilizzate nell'individuazione del ligando endogeno naturale.¹⁴ Il recettore dell' hU-II appartiene quindi alla famiglia dei recettori accoppiati alle proteine G ed è caratterizzato da un motivo a 7 eliche transmembrana; la sua sequenza è costituita da 389 residui amminoacidici; nel primo e secondo loop extracellulare sono presenti residui di Cys che potrebbero essere cruciali nel determinarne la struttura terziaria (Figura 2).

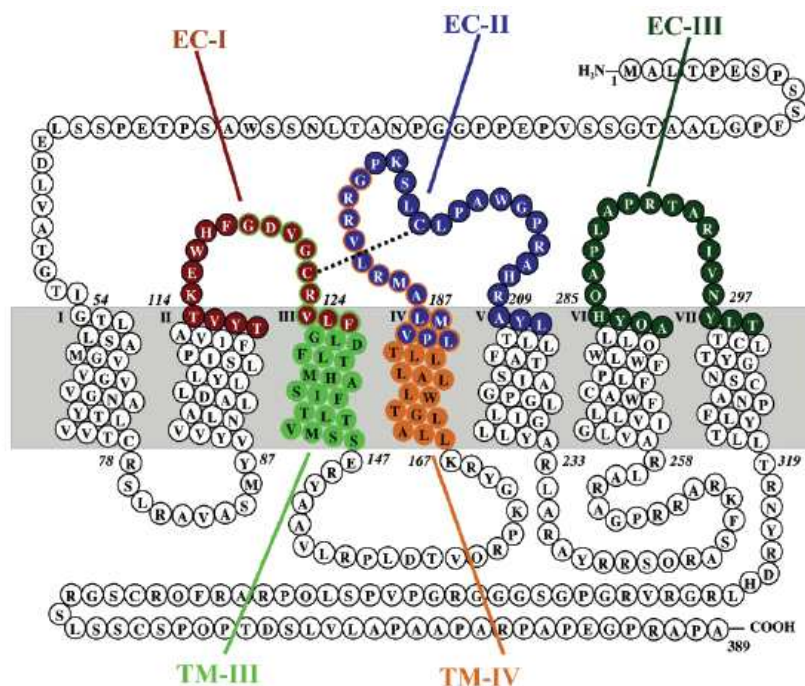


Figura 2. Sequenza del recettore UT.

Il recettore presenta inoltre due siti di glicosilazione nel dominio N-terminale, Asn²⁹ e Asn³³, importanti per il suo corretto posizionamento nella cellula, e due residui di Cys nella porzione N-terminale.¹⁵

Sia l' U-II che il suo recettore sono espressi ubiquitariamente in diversi tessuti, la loro presenza è stata individuata in modo più abbondante a livello del tessuto cardiaco (miociti atriali e ventricolari, fibroblasti, vascolatura periferica), arteriolare (aorta), nelle cellule endoteliali (arteria coronaria e vena ombelicale) e nelle cellule della muscolatura liscia dei vasi venosi (epitelio del tubulo e del dotto, capillari renali e cellule dell'endotelio glomerulare). U-II mRNA è espresso anche nel fegato, nel rene e nel tessuto endocrino.

Inoltre, grazie a prove di immunoreattività, l'Urotensina è stata individuata anche a livello del sistema nervoso centrale (SNC), nella corteccia cerebrale e del midollo spinale.¹⁶⁻²¹

La vasocostrizione indotta dall'U-II avviene attraverso l'interazione con il recettore UT nelle VSMCs.

Il legame dell'UT al suo recettore porta all'attivazione di una proteina Gq che a sua volta attiva la proteina-chinasi-C (PKC), una proteina tirosina chinasi, la calmodulina, la fosfolipasi C (PLC). La PLC porta alla produzione di inositolo trifosfato (IP₃) e diacilglicerolo (DAG) la cui attivazione determina rilascio di Ca²⁺ dal reticolo sarcoplasmatico, quindi si ha un aumento della concentrazione di Ca²⁺ intracellulare che è responsabile della contrazione muscolare.

Gli effetti vasocostrittori dell'U-II sono mediati anche dalla MLCK (myosin light chain kinase), dalla ERK, una chinasi che regola il segnale extracellulare, e dalla RhoA/Rho chinasi (ROCK).

Inoltre, è stato dimostrato che l'U-II è anche un vasodilatatore endotelio-dipendente, attraverso il rilascio di ossido nitrico (NO), prostaciline (PGI₂), e prostaglandine E₂ (Figura 3).

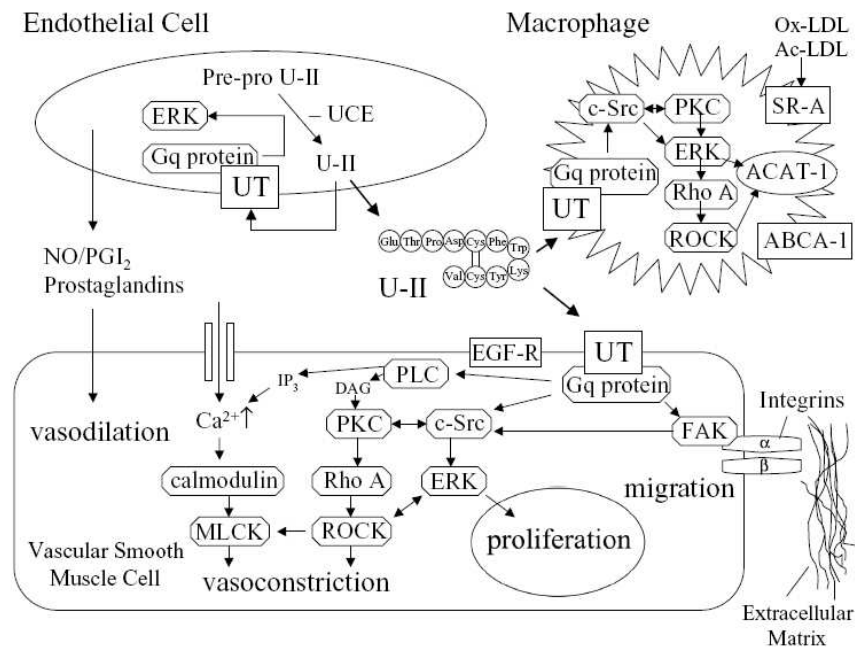


Figura 3: Illustrazione schematica del meccanismo del segnale intracellulare suggerito nelle VSMCs e dell'interazione tra l'Urotensina II e altre molecole vasoattive.

Questi risultati suggeriscono che l'U-II contribuisce alla modulazione dell'omeostasi vascolare.

Inoltre, numerosi studi hanno messo in evidenza che l'U-II è coinvolta nella sindrome metabolica. In pazienti con diabete di tipo 2, infatti, è stata trovata un'elevata concentrazione di U-II sia nel plasma che nelle urine.

Il coinvolgimento dell' Urotensina II nella sindrome metabolica è riassunto in Figura 4.¹

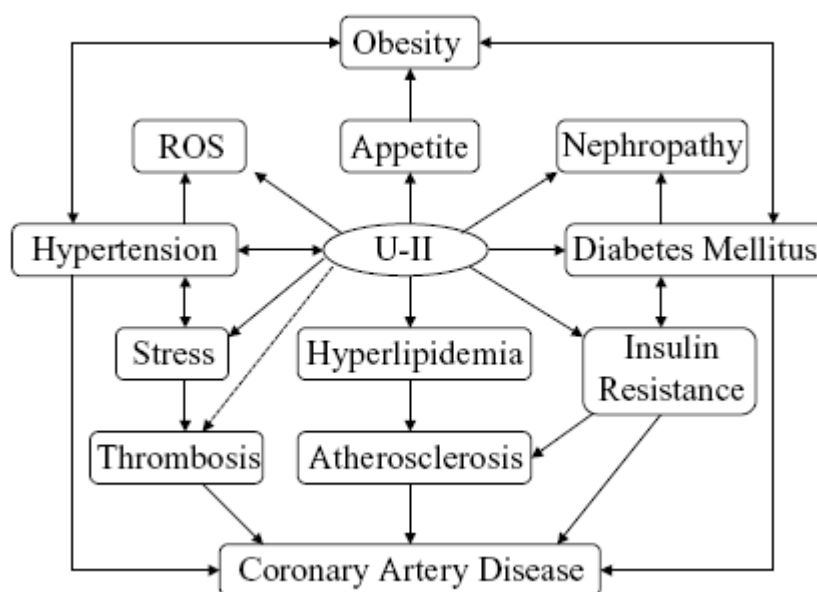


Figura 4. Coinvolgimento dell'U-II nella sindrome metabolica.

Inoltre la presenza della pro-U-II nel timo dell'uomo, come molti altri neuropeptidi, fa ipotizzare che l'U-II possa essere coinvolta anche nella regolazione della risposta immunitaria.

In più, fino ad oggi solo l'U-II e il peptide codificato dal gene della calcitonina (CGRP) sono stati ritrovati nei motoneuroni del midollo spinale. Ciò suggerisce che l'U-II esercita la sua attività modulatoria a livello della placca neuromuscolare, come è stato dimostrato in precedenza per la calcitonina, ipotizzando quindi un meccanismo comune per i due peptidi.²²

Recentemente, è stata descritta un'elevata espressione di UT anche nelle cellule LNCaP androgeno-dipendenti; mediante la tecnica di Western Blotting è stata valutata l'espressione del recettore UT nelle tre linee "classiche" di carcinoma prostatico, LNCaP (ormono-responsive), PC3 e DU145 (ormono-non responsive). E' emerso che

nelle cellule LNCaP si riscontra una maggiore espressione di tale recettore rispetto alle cellule PC3, mentre è completamente assente nelle cellule DU 145. L'elevata espressione del recettore UTR nelle cellule del carcinoma prostatico potrebbe quindi essere utilizzato come target diagnostico per questa patologia.

1.3 Studi relazione struttura attività e studi conformazionali

Pertanto l' U-II sembra essere implicata in diversi processi biologici, ma gli studi fondamentali riguardano la sua potenziale attività vasocostrittoria.

Al fine di chiarire quali fossero i minimi requisiti strutturali dell'UT per tale attività, diversi gruppi di ricerca hanno sintetizzato, partendo dalla sequenza nativa, una serie di peptidi di delezione sequenziale dei singoli residui amminoacidici..

Dall'attività di tali peptidi di “delezione” è stato dedotto che la minima sequenza attiva è il frammento 4-11 **H-Asp-[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH** , dotata di potenza ed efficacia paragonabili al peptide nativo (Tabella 2).²³

Peptide	Ki (nM)	pD ₂
U-II	1.7±0.02	8.3±0.06
U-II (4-11)	1.8±0.03	8.6±0.08

Tabella 2. Attività dell'U-II e del frammento UT-II(4-11.)

Individuata la minima sequenza attiva è stato possibile delineare i requisiti strutturali che caratterizzano il farmacoforo dell'U-II, tramite la tecnica “Ala scan”.²⁴ Dall'analisi dei risultati biologici ottenuti si evince che le catene laterali di Trp⁷, Lys⁸ e Tyr⁹ sono indispensabili per l'attività.

Inoltre per verificare se il ponte disolfuro giocasse un ruolo importante nell'interazione recettoriale sono stati sintetizzati analoghi lineari dell'Urotensina-II.

Questo approccio ha permesso di dimostrare come il ponte disolfuro sia indispensabile ai fini dell'attività biologica, poiché i composti lineari sono risultati totalmente inattivi.

Contemporaneamente all'individuazione dei requisiti strutturali fondamentali per l'attività, si è proceduto ad un approfondito studio spettroscopico al fine di individuare caratteristiche conformazionali di questo peptide. Un primo ed importante studio strutturale condotto sull'U-II è stato riportato nel 1994 da Yu²⁵ mediante l'uso di appropriate tecniche NMR. Da tale studio è stato possibile dimostrare che i residui del core peptidico dell'U-II, ossia la sequenza Phe⁶-Trp⁷-Lys⁸-Tyr⁹, adotta una struttura molto ordinata e compatta che probabilmente va ad inserirsi in una tasca idrofobica del recettore. Risultati simili sono stati ottenuti successivamente da Flohr et al.²⁶ che usarono le strutture NMR e i risultati degli studi SAR ottenuti fino a quel momento per la creazione di un modello 3D del farmacoforo. Questo modello farmacoforico, secondo Flohr, è caratterizzato dalla presenza di un atomo di N protonabile, localizzato sulla catena laterale della Lys⁸, e due residui idrofobici aromatici presenti rispettivamente nel Trp⁷ e Tyr⁹, disposti in modo da conservare una precisa distanza.

Infatti, il nucleo idrofobico aromatico posto in catena laterale del Trp⁷(A) dista dal gruppo amminico ionizzabile della Lys⁸(B) di 11,3Å; la distanza tra il gruppo amminico di Lys⁸ e il nucleo idrofobico aromatico in catena laterale della Tyr⁹(C) è, invece, di 6,4Å (Figura 5).

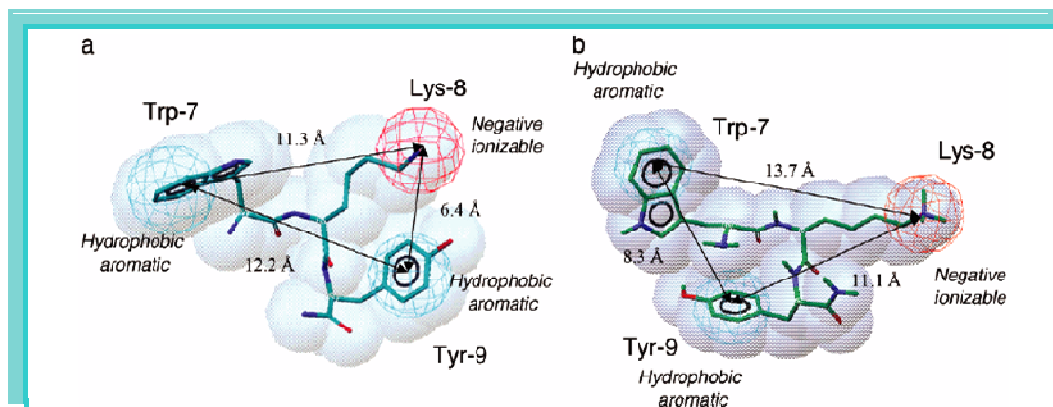


Figura 5. Rappresentazione schematica del farmacoforo dell' U-II di Flohr et al.

Più recentemente il gruppo con il quale svolgo la mia attività di ricerca, ha condotto esperimenti NMR ottenendo distanze tra i punti farmacoforici diverse da quelle descritte da Flohr: A-B: 5.62-5.8 Å; A-C: 5.8-6.2 Å; B-C 6.0-6.2 Å. Probabilmente il differente ambiente utilizzato per condurre gli esperimenti può essere la spiegazione di questa discrepanza. Infatti, Flohr et al. utilizzarono un ambiente acquoso mentre le nostre distanze sono state dedotte utilizzando micelle di SDS (sodio dodecilsolfato) in modo da mimare l'ambiente membranario. La scelta dell'utilizzo'uso di questo tipo di ambiente è motivato dal fatto che l'U-II e i suoi analoghi interagiscono con un recettore di membrana.²⁷

Dopo l'individuazione di un ipotetico farmacoforo si è passati alla costruzione di un modello recettoriale.

L'identificazione della struttura tridimensionale del recettore dell'Urotensina, è stata effettuata tramite la tecnica del modellamento per omologia. Tale tecnica si basa sulla considerazione che proteine appartenenti ad una medesima famiglia funzionale e/o

filogenetica, presentano uno specifico grado di omologia tra le sequenze amminoacidiche. Per la costruzione del recettore dell'Urotensina è stato utilizzato come riferimento la rodopsina, proteina che presenta un omologia strutturale del 70% con l'UTR. Effettuando un confronto della sequenza amminoacidica del recettore dell'Urotensina con quella della rodopsina e sostituendo gli amminoacidi diversi nella sequenza primaria si è potuto ottenere un modello recettoriale quasi reale.

Una volta costruito il modello, è stato possibile effettuare studi di docking con il ligando endogeno.

Tali studi hanno ulteriormente confermato l'importanza dei residui di Trp⁷, Lys⁸ e Tyr⁹, allocati in specifiche tasche idrofobiche del sito recettoriale, ai fini dell'interazione.

La Phe⁶, orientata verso l'esterno del recettore, più che avere un ruolo diretto nel legame con il recettore, va a determinare la corretta orientazione del residuo di Trp⁷ (Figura 6).

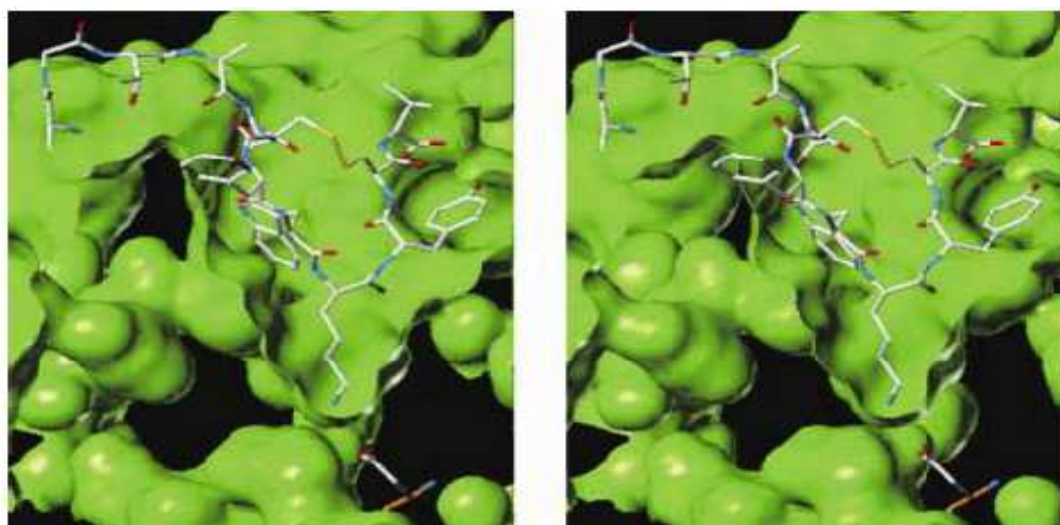


Figura 6. *Docking tra l'hU-II e il suo recettore.*

2. Impostazione della ricerca

Il gruppo di ricerca presso il quale ho svolto il mio lavoro di dottorato, ha prodotto rilevanti risultati nella determinazione dei requisiti strutturali indispensabili per l'attività biologica dell'U-II.

Le principali ricerche sono state indirizzate verso:

- La determinazione dell'importanza del ponte disolfuro ai fini dell'interazione recettoriale, in questo senso sono stati sintetizzati peptidi contenenti un ponte lattamico di diverse dimensioni, un ponte tioetere, peptidi ciclici di diversa natura e mediante la sostituzione dei due residui di Cisteina, Cys⁵ e Cys¹⁰, con analoghi contenenti un gruppo tiolico (hCys e Pen);
- Il potenziamento dell'affinità recettoriale apportando modifiche alla core sequence, mediante la sostituzione degli amminoacidi Phe⁶, Trp⁷, Lys⁸ e Tyr⁹, con amminoacidi naturali e non;
- L'individuazione delle caratteristiche strutturali di tali composti.

Tutti gli studi sono stati effettuati a partire dall'octapeptide UT-II(4-11), e hanno portato alla sintesi di un potente agonista **P5U**²⁹ e un superantagonista denominato **URANTIDE** (*Urotensin-Antagonist-Peptide*).³⁰

2.1 P5U: caratteristiche strutturali e attività biologica

La sostituzione della Cys⁵ nel frammento UT-II(4-11), con Pen, ha prodotto un peptide (P5U) che ha mostrato un'affinità recettoriale tre volte superiore rispetto al peptide naturale (Tabella 3).

H-Asp-c[Pen-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH

P5U

Contrariamente, la sostituzione della Cys¹⁰ o di entrambe con un residuo di Pen ha prodotto analoghi rispettivamente 1000 e 10 volte meno potenti del peptide di partenza.

Peptide	pEC ₅₀ (± SEM) ^b	pK _B (± SEM)	pKi ^c (± SEM)
U-II	8.3±0.06	---	9.1±0.08
U-II (4-11)	8.3±0.04	---	9.6±0.07
P5U	9.6±0.07	---	9.7±0.07

(a) I valori di pEC₅₀ (-log EC₅₀) e pK_B (-log K_B) sono stati tratti da esperimenti su aorta torica di ratto. (b) Ciascun valore in tabella è la media ± s.e.m. di almeno 4 determinazioni. (c) I valori di pKi (-log Ki) sono tratti da esperimenti su cellule CHO-K1 esprimenti il recettore UT ricombinante umano

Tabella 3. Attività biologica del superagonista P5U.

Negli esperimenti funzionali sull'aorta di ratto, il P5U è stato il peptide che ha dato maggiore attività contrattile, dimostrandosi 20 volte più potente dell' hU-II²⁹.

Successivamente sono state condotte analisi conformazionali, mediante tecniche NMR e di modelling molecolare, che hanno evidenziato come il farmacoforo nel P5U mantiene la stessa disposizione spaziale del peptide nativo (Figura 7).

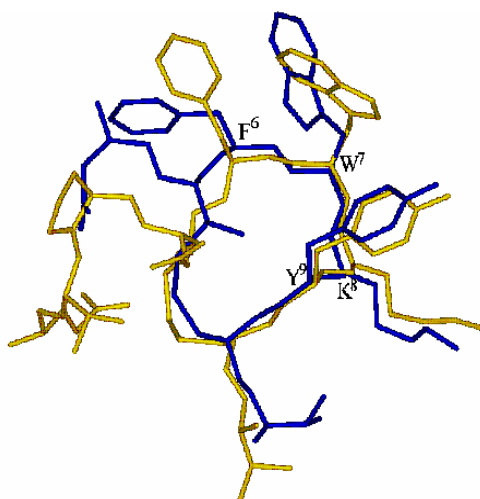


Figura 7. Sovrapposizione tra hU-II (giallo) e il P5U (blu).

Lo studio ha dimostrato che la sostituzione della Cys⁵ con Pen influenza principalmente il residuo prossimale di Phe⁶ lasciando quasi inalterati il Trp⁷, la Lys⁸ e la Tyr⁹.³¹ Questa sequenza, come risulta da studi struttura–attività sull' hU-II, è la più importante per l'attività di agonista pieno, confermando ciò che era già descritto in letteratura.

2.2 Dall'agonista (P5U) al superantagonista (URANTIDE): caratteristiche strutturali e attività biologica.

Al composto P5U sono state apportate delle modifiche a carico della posizione 7 e 8, occupate rispettivamente da Trp e Lys. Allo scopo di indagare il loro ruolo nell'attivazione recettoriale sono stati sintetizzati peptidi in cui il Trp⁷ è stato sostituito con il D-Trp, e la Lys⁸ è stata sostituita con il suo analogo inferiore, Orn.

Come mostrato in Tabella 4, il risultato più importante è stato ottenuto con la sostituzione contemporanea di Trp⁷ e Lys⁸, che ha permesso di ottenere un potente antagonista, denominato URANTIDE, completamente privo di attività agonista.³⁰

H-Asp-c[Pen-Phe-D-Trp-Orn-Tyr-Cys]-Val-OH

URANTIDE

L'Urantide è diventato così il composto di riferimento per valutare l'attività antagonista.

Peptide	pEC₅₀ (± SEM)	pK_B (± SEM)	pK_i (± SEM)
U-II	8.3±0.06	---	9.1±0.08
U-II (4-11)	8.3±0.04	---	9.6±0.07
P5U	9.6±0.07	---	9.7±0.07
Urantide	---	8.3±0.09	8.3±0.04

Tabella 4. *Attività biologica dell'antagonista Urantide.*

Sulla base dei dati ottenuti da questi studi il mio lavoro di ricerca è stato volto all'approfondimento e alla conoscenza di ulteriori requisiti strutturali indispensabili per l'attività biologica e si è articolato in 3 fasi:

- La prima parte è stato indirizzata alla valutazione del ruolo svolto dal residuo di Asp⁴ nell'interazione con il recettore, apportando sostituzioni a tale residuo.
- La seconda parte del lavoro ha riguardato un'esplorazione mirata della *core sequence* e la sostituzione degli amminoacidi che la compongono con residui amminoacidici ristretti conformazionalmente.
- Una terza fase, invece, ha riguardato la sintesi di strutture non peptiche dell'Urotensina-II.

2.3 Sintesi di analoghi dell'Urotensina II modificati in posizione N-terminale.

Nella prima fase del mio lavoro di ricerca si è deciso di indagare il ruolo svolto dall'Asp⁴, residuo carico negativamente, ai fini dell'attività biologica. Dati

recentemente apparsi in letteratura, riguardanti la sostituzione dell'Asp⁴, nel frammento (4-11) dell'Urotensina, con residui amminoacidici aromatici, hanno mostrato interessanti risultati di attività biologica e sull'affinità recettoriale. In particolare la sostituzione dell'Asp⁴ non ha determinato un decadimento dell'attività, ipotizzando che tale residuo non sia indispensabile per l'attività del peptide.^{32,33}

Il mio studio è stato effettuato a partire non dal minimo frammento attivo UT-II(4-11), ma utilizzando come *lead compound* il superagonista, P5U (serie A) e l'antagonista, Urantide (serie B). In particolare l'Asp⁴, di entrambi i peptidi, è stato sostituito con diversi residui amminoacidici, carichi e non carichi, aromatici e non aromatici, le cui strutture sono riportate in Figura 8.

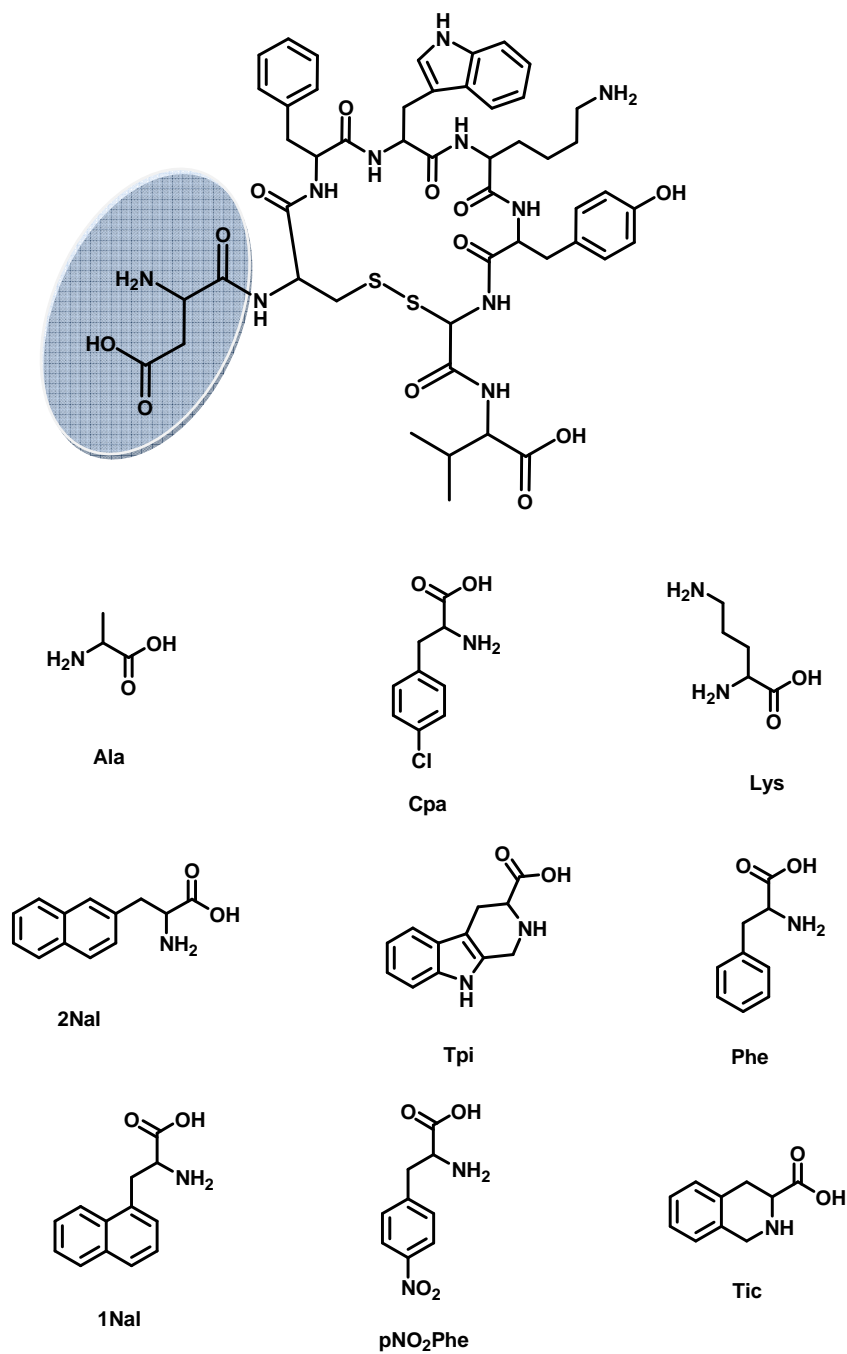


Figura 8. Struttura chimica degli amminoacidi utilizzati in questo studi.

Come amminoacidi non aromatici sono stati scelti l'Alanina, amminoacido più semplice che conserva la chiralità, e la Lysina, amminoacido carico positivamente. La scelta di questi residui è stata fatta allo scopo di valutare se la delezione della carica negativa o la sostituzione della stessa con una carica positiva possa influire ai fini dell'interazione recettoriale. Un'altra modifica ha previsto la sostituzione dell'Aspartico con residui aromatici Phe, Nal(1') e Nal(2') per valutare quanto l'ingombro sterico e l'aumentata lipofilia possano influire sull'attività dei peptidi. Inoltre sono stati considerati anche amminoacidi ristretti conformazionalmente quali il Tic e il Tpi per verificare come la variazione conformazionale potesse influenzare l'attività biologica. Inoltre, per valutare la possibile formazione di legami π - π tra il residuo amminoacidico in posizione 4 con il recettore sono stati sintetizzati composti contenenti un residuo di *p*-clorofenilalanina e di *p*-nitrofenilalanina.

2.4 Sintesi di analoghi dell'Urotensina II modificati nella core sequence con l'introduzione di amminoacidi ristretti conformazionalmente.

Da studi spettroscopici in ambiente anisotropico, effettuati dal gruppo presso il quale ho svolto il mio lavoro di ricerca³¹, si evince che l' hU-II e i suoi analoghi adottano una struttura secondaria β -Hairpin, ben definita. Generalmente per L-Aminoacidi si osservano strutture β -turn di tipo I o II, questo tipo di struttura β -Hairpin è stata riportata fino ad ora solo per peptidi penta ciclici, ed è caratterizzata da due foglietti antiparalleli β -sheet connessi da un β -turn. Questa struttura comprende i residui 6-9, sia del P5U che dell' URANTIDE. La differenza principale osservata tra la struttura del peptide antagonista, Urantide e l'agonista P5U consiste nella differente orientazione della catena laterale del D/L-Trp⁷. In particolare, mentre nel P5U si

osserva uno stretto contatto tra le catene laterali del Trp⁷, Lys⁸ e Tyr⁹ e l' L-Trp adotta una conformazione di tipo trans, l'anello indolico del D-Trp⁷ dell'Urantide è molto più flessibile ed è lontano dalle catene laterali dell'Orn⁸ e della Tyr⁹ (Figura 9).²⁸

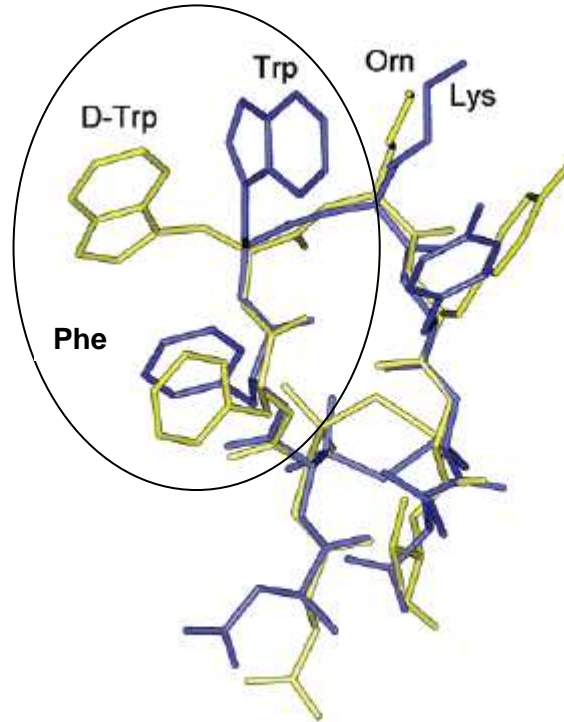


Figura 9. Sovrapposizione P5U (blu) e Urantide (giallo).

Per verificare se l'effetto β -Hairpin fosse determinante nell'interazione recettoriale si è pensato di sostituire agli amminoacidi coinvolti in questo tipo di conformazione, amminoacidi ristretti conformazionalmente quali la Prolina al posto della Phe e il Tpi, analogo del Trp, sia nella configurazione *L* che *D*. Questi amminoacidi sono induttori o stabilizzanti del β -Turn (Figura 10). Per quanto riguarda il residuo di Prolina questo è stato inserito all'interno della sequenza non solo del P5U e dell'Urantide, ma anche in quella dell'UT-II(4-11).

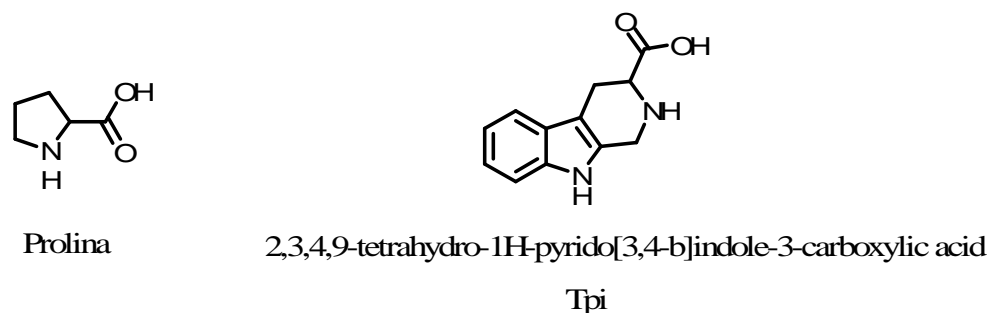


Figura 10. Strutture degli amminoacidi utilizzati in questo studio, Prolina e Tpi.

2.5 Sintesi di peptidomimetici

Un approccio per limitare i problemi legati all'utilizzo dei peptidi come potenziali farmaci è quello di apportare modifiche al *backbone* peptidico, progettando sostanze "peptidomimetiche" le quali mantengano la conformazione bioattiva dei peptidi naturali. Da un punto di vista chimico il passaggio da un peptide ad un suo corrispondente peptidomimetico può comportare semplici modificazioni, quali la ciclizzazione, la sintesi di strutture originali prive del tutto di residui amminoacidici, oppure, il cambiamento di configurazione di alcuni opportuni residui, o sostituirli con amminoacidi non naturali in grado di imporre delle restrizioni conformazionali su alcuni angoli diedri del backbone e/o delle catene laterali. In tutti i casi, è fondamentale che nelle nuove molecole siano preservate le funzioni chimiche indispensabili per l'interazione con il recettore. È ovvio che una progettazione razionale di peptidomimetici richiede, in via preliminare, un'accurata definizione del "pattern farmacoforico". L'identificazione del farmacoforo non è un problema semplice se si considera l'enorme numero di conformazioni che teoricamente possono essere assunte da un peptide naturale. Tale numero aumenta in maniera esponenziale

all'aumentare del numero di legami semplici. L'applicazione di vincoli geometrici derivanti da esperimenti NMR in soluzione e di calcoli di meccanica molecolare limita fortunatamente il numero di conformazioni da considerare. Un altro problema è quello di riconoscere quali sono i raggruppamenti chimici farmacoforici. Nel caso dell'UT-II, i dati ottenuti dal nostro gruppo di ricerca e quelli apparsi in letteratura hanno permesso di tracciare un farmacoforo per i composti non peptidici ben preciso, sia in funzione dei gruppi chimici da conservare sia le distanze da rispettare, pervenendo così ad un'ipotesi ragionevole sull'interazione farmacodinamica. Questo farmacoforo è stato identificato sia per composti non peptidici agonisti che antagonisti. Nel caso dei composti agonisti è stato utilizzato come riferimento il composto AC-7954, uno dei primi agonisti non peptidici identificato (Figura 11).

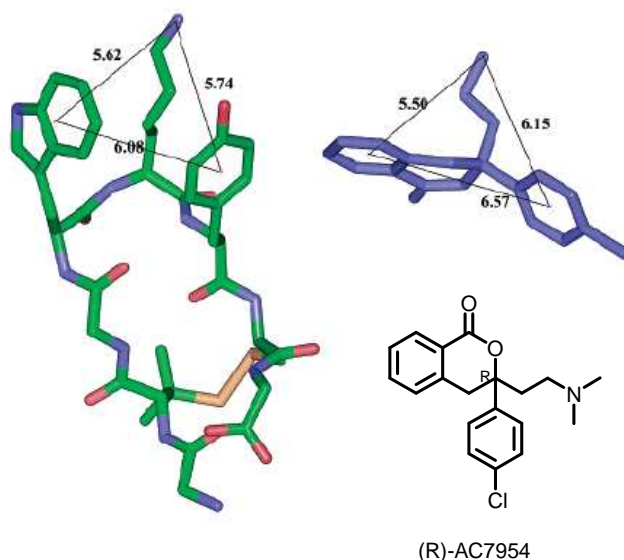


Figura 11. Distanze farmacoforiche identificate in un potente agonista non peptidico e paragonate a quelle del p5U. Le distanze sono indicate in Angstrom.

Per definire le distanze farmacoforiche dei composti antagonisti è stato utilizzato il Palosuran, il più potente antagonista non peptidico identificato fino ad oggi (Figura 12).²⁷

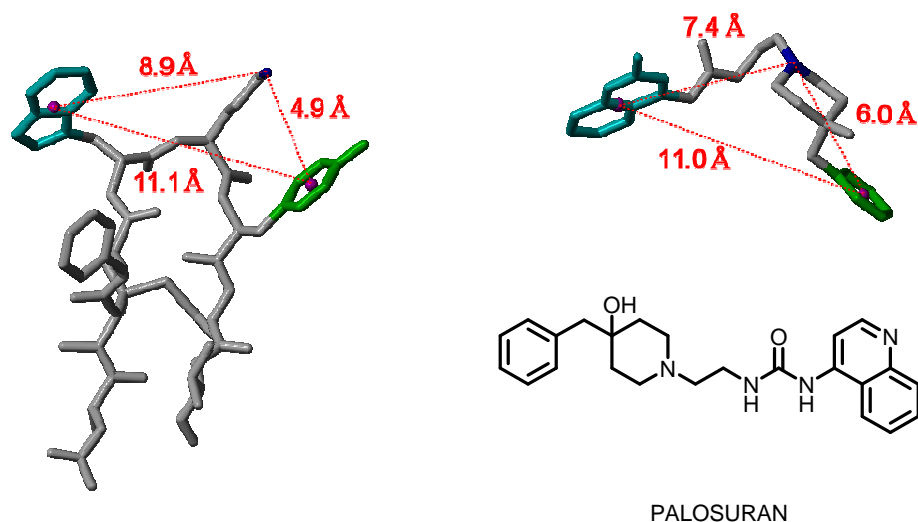


Figura 12. Distanze farmacoforiche identificate nel più potente antagonista non peptidico descritto fin'ora, Palosuran, e paragonate a quelle dell'Urantide.

L'individuazione del farmacoforo per la progettazione dei composti peptidomimetici è avvenuto grazie all'ausilio del *virtual screening*. Quando la struttura 3D di un target farmacologico è disponibile, il *virtual screening* rappresenta una tecnologia estremamente utile nella ricerca farmaceutica in quanto permette di selezionare, all'interno di *databases* contenenti centinaia di milioni di molecole, *hits* in grado di legare più o meno fortemente il *target*. Ad ogni modo, il *molecular docking* presenta notevoli vantaggi: nonostante non sia in grado di discriminare tra due composti che risultano entrambi in grado di inserirsi nel sito di legame, è capace di scartare in modo affidabile composti che non sono in grado di adattarsi al sito di

legame o che hanno caratteristiche elettrostatiche sfavorevoli per l'interazione con la proteina. Ciò consente di testare sperimentalmente solo un numero limitato di molecole che lo *screening* virtuale ha selezionato tra milioni di composti. Infine, da un' esperimento di *virtual screening*, per ogni *hit* è già nota la sua modalità di legame nel sito attivo, e ciò rappresenta il punto di partenza per l'ottimizzazione razionale del *lead* trovato.

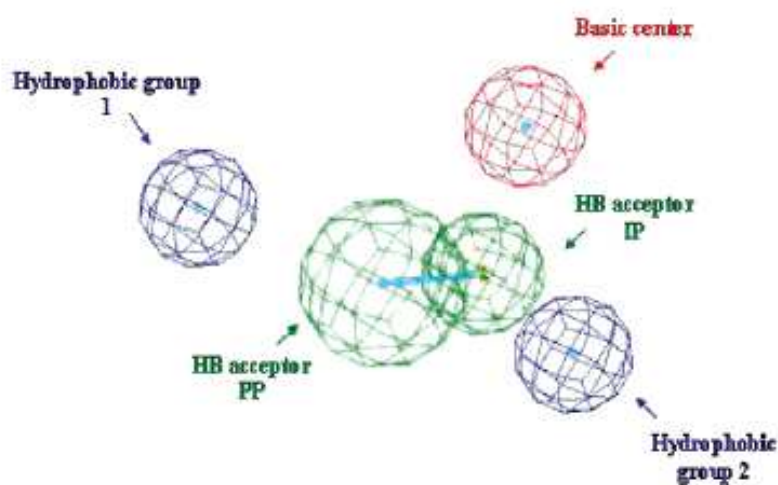
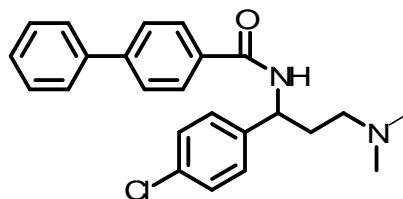


Figura 13. Farmacoforo degli agonisti dell'UT-II non peptidici.

Le molecole progettate con questa metodica conservano tutti e tre i requisiti indispensabili nell'interazione recettoriale, che sono due anelli aromatici e un gruppo basico (Figura 13).³⁴

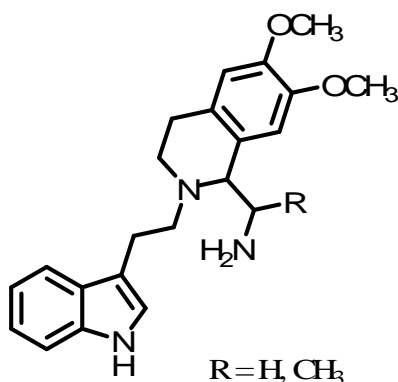
In questo modo durante gli ultimi anni sono stati descritti diversi analoghi non peptidici dell'Urotensina II, sia agonisti che antagonisti. In particolare FL104 e il Palosuran (Figura 12), già nominato precedentemente, sono rispettivamente il più potente agonista e il più potente antagonista descritti fino ad oggi (Figura 14).³⁵⁻³⁹



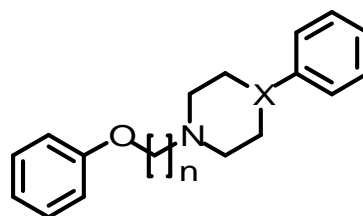
FL 104

Figura 14. Struttura di FL104, il più potente agonista non peptidico dell'U-II.

Sulla base di questi dati e come risultato di esperimenti di virtual screening effettuati dal nostro gruppo di ricerca, sono state progettate una serie di molecole con potenziale affinità per il recettore UT. Nella terza fase del mio lavoro di ricerca mi sono occupata della sintesi di tali molecole che presentano un nucleo tetraidroisochinolinico, **serie 100**, un nucleo piperidinico e piperazinico, **serie 200**, e β -carbolinico, **serie 300** (Figura 15).

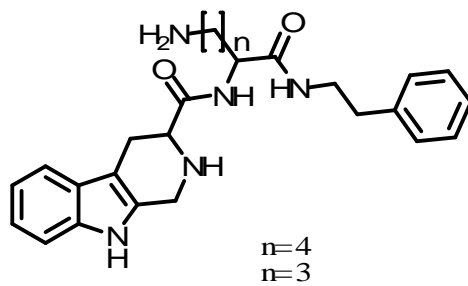


Serie 100



n=2; X=C
 n=2; X=N
 n=3; X=C
 n=3; X=N

Serie 200



Serie 300

Figura 15. *Strutture delle molecole peptidomimetiche sintetizzate.*

3. Risultati e discussioni

3.1. Chimica

3.1.1 Sintesi peptidica

La sintesi peptidica in fase solida è stata eseguita in fase eterogenea con il reagente solubile in fase liquida ed il peptide in crescita in fase solida, su resina. Tale tipo di tecnica presenta numerosi vantaggi rispetto alla sintesi in soluzione. Innanzitutto, permette di superare i problemi derivanti dalla possibile insolubilità degli intermedi peptidici nei comuni solventi organici utilizzati. Inoltre permette una facile rimozione dell'eccesso di reagenti e dei sottoprodotti attraverso semplici operazioni di lavaggio e filtrazione, dopo il completamento di ciascuna reazione, in quanto il peptide è completamente insolubile in tutti gli stadi della sintesi. La sintesi viene eseguita in un unico reattore e ciò consente (a) di evitare perdite di materiali; (b) di ottenere rese elevate in prodotti finali, potendo utilizzare larghi eccessi di reagenti per spingere le reazioni a completezza. Infine, tale tipo di tecnica si presta bene ad essere automatizzata, riducendo così i tempi di realizzazione dei peptidi.

Tutti i peptidi, sono stati assemblati su supporto solido usando la classica procedura peptidica *via-Fmoc* (*N*-Fluorenilmetossi-carbonile), utilizzando una resina Wang. Il primo amino acido, Fmoc-Val-OH, così come tutti gli altri aminoacidi sono stati accoppiati seguendo i protocolli standard della sintesi peptidica in fase solida. L'accoppiamento del primo amminoacido, così come dei successivi, è stato effettuato utilizzando come agenti accoppianti sali di uronio quali HBTU/HOBt in presenza di una base terziaria, DIEA. Il gruppo N^α -Fmoc di ogni amminoacido è stato rimosso mediante

trattamento del peptide legato alla resina con una soluzione al 25% di piperidina in DMF.

Le sequenze amminoacidiche sono state così assemblate alternando cicli di deprotezione e cicli di accoppiamento. Dopo ogni accoppiamento, per determinarne la completezza, e dopo ogni deprotezione, per verificare la totale rimozione del gruppo protettore Fmoc, è stato effettuato il Kaiser test.⁴⁰

Il distacco del peptide finale dalla resina e la contemporanea rimozione degli altri gruppi protettori in catena laterale sono stati effettuati utilizzando una miscela di TFA (acido trifluoroacetico), TES (triethylsilano) ed H₂O. Uno dei problemi nell'impiego di questa metodica è dato dalla possibile alchilazione dei residui di Cys e Trp da parte di cationi prodotti durante il processo di deprotezione. A tale riguardo i trialchilsilani, come il Et₃SiH (TES), si sono dimostrati efficaci scavengers⁴¹. La resina è stata rimossa dalla soluzione mediante filtrazione ed il peptide grezzo è stato ottenuto per precipitazione in etere etilico a freddo, dando una polvere bianca. Le proprietà chimico-fisiche e la purezza di questi peptidi sono state valutate mediante ESI/MS e RP-HPLC.

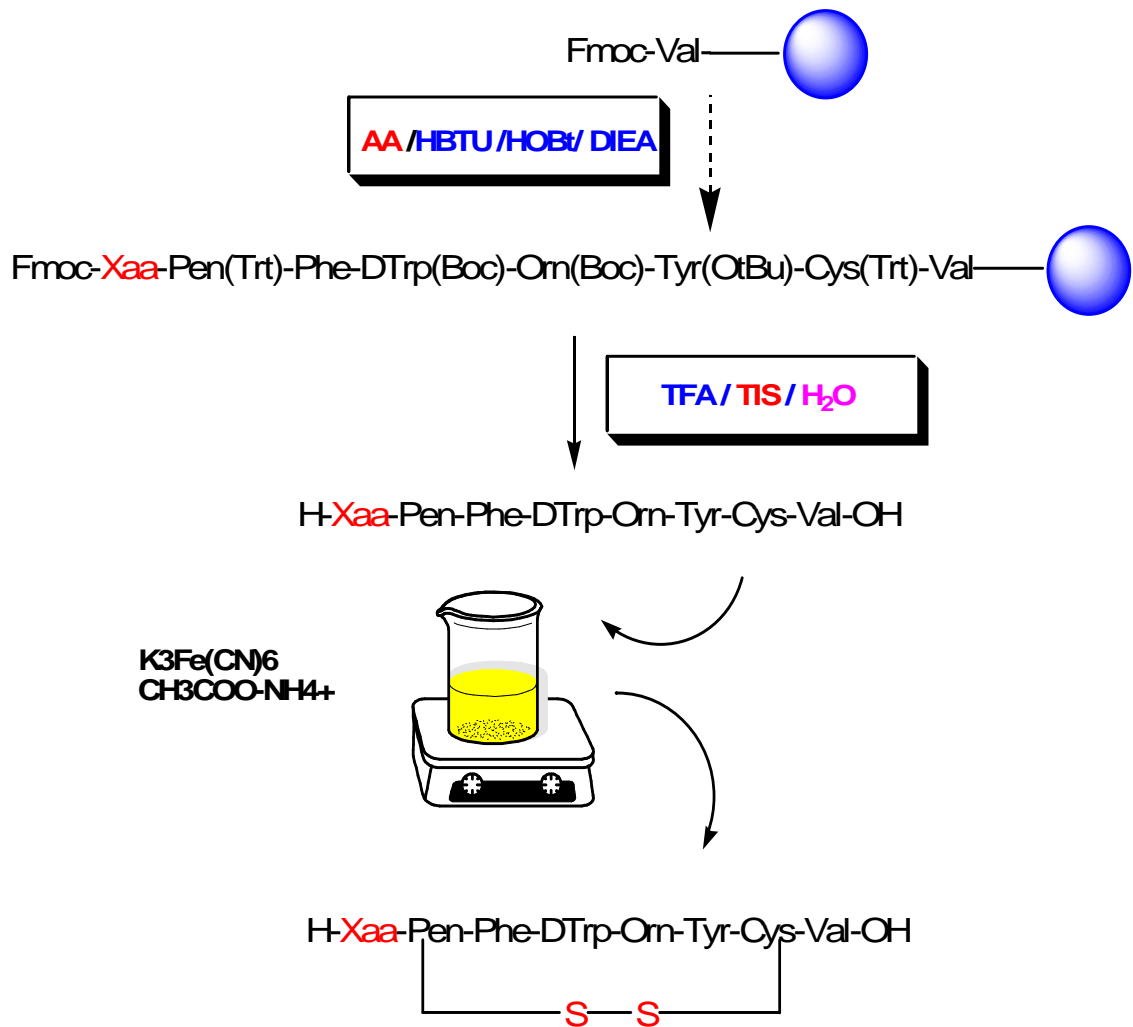
Una volta ottenuto il peptide lineare si è proceduti alla ciclizzazione.

3.1.2 Formazione del ponte disolfuro

Il ponte disolfuro dei peptidi è stato ottenuto mediante ossidazione, tra due residui tiolici delle Pen⁵ e Cys¹⁰, con ferrocianuro di potassio utilizzando il metodo della *syringe pump* (Schema 1).⁴²

Il peptide ciclico ottenuto viene purificato mediante HPLC preparativo su colonna C-18 a fasi inversa ed eluita con un gradiente lineare di acetonitrile in acqua con 0,1% di acido trifluoroacetico (v/v).

Tutti i peptidi, infine, sono stati caratterizzati mediante RP-HPLC analitico e ESI-MS



Schema 1. Sintesi dei peptidi

I composti sintetizzati secondo questa metodica sono mostrati in tabella 5 e 6.

H-Asp-[Pen-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH	P5U
H-Asp-[Pen-Phe-DTrp-Orn-Tyr-Cys]-Val-OH	URANTIDE
H-Ala-[Pen-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH	1a
H-Ala-[Pen-Phe-DTrp-Orn-Tyr-Cys]-Val-OH	1b
H-Lys-[Pen-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH	2a
H-Lys-[Pen-Phe-DTrp-Orn-Tyr-Cys]-Val-OH	2b
H-Phe-[Pen-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH	3a
H-Phe-[Pen-Phe-DTrp-Orn-Tyr-Cys]-Val-OH	3b
H-(1)Nal-[Pen-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH	4a
H-(1)Nal-[Pen-Phe-DTrp-Orn-Tyr-Cys]-Val-OH	4b
H-(2)Nal-[Pen-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH	5a
H-(2)Nal-[Pen-Phe-DTrp-Orn-Tyr-Cys]-Val-OH	5b
H-Tic-[Pen-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH	6a
H-Tic-[Pen-Phe-DTrp-Orn-Tyr-Cys]-Val-OH	6b
H-Tpi-[Pen-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH	7a
H-Tpi-Pen-Phe-DTrp-Orn-Tyr-Cys]-Val-OH	7b
H-Cpa-[Pen-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH	8a
H-Cpa-[Pen-Phe-DTrp-Orn-Tyr-Cys]-Val-OH	8b
H-Phe(pNO ₂)-[Pen-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH	9a
H-Phe(pNO ₂)-[Pen-Phe-DTrp-Orn-Tyr-Cys]-Val-OH	9b

Tabella 5. Struttura dei peptidi di riferimento P5U ed urantide e dei peptidi sintetizzati, modificati in posizione N-terminale.

H-Asp-[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH	UT-II (4-11)
H-Asp-[Pen-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH	P5U
H-Asp-[Pen-Phe-DTrp-Orn-Tyr-Cys]-Val-OH	URANTIDE
H-Asp-[Cys-Pro-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH	10
H-Asp-[Pen-Pro-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH	10a
H-Asp-[Pen-Pro-DTrp-Orn-Tyr-Cys]-Val-OH	10b
H-Asp-[Pen-Phe-Tpi-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH	11a
H-Asp-[Pen-Pro-DTpi-Orn-Tyr-Cys]-Val-OH	11b

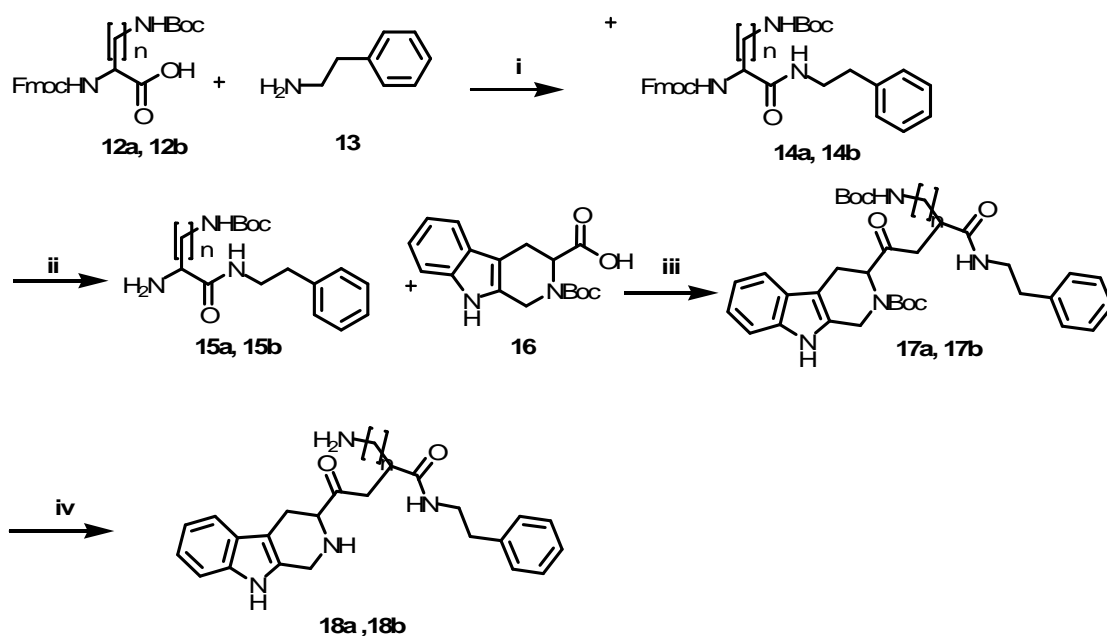
Tabella 6. Peptidi sintetizzati, modificati nella core sequence con amminoacidi ristretti conformazionalmente.

3.1.3 Sintesi peptidomimetici

3.1.3.1 Sintesi dei composti a nucleo tetraidro β -carbolinico.

La sintesi dei derivati tetraidro β -carbolinici, **18a** e **18b**, è stata ottenuta seguendo lo schema 2. La condensazione della feniletilammina (composto **13**) con la Fmoc-Lys(Boc)-OH (**12a**) o la Fmoc-Orn(Boc)-OH (**12b**), in presenza di sali di uronio quali HOBt e HBTU come agenti di accoppiamento e di una base terziaria DIPEA, ha portato alla formazione rispettivamente dei composti **14a** o **14b**. Dopo purificazione per flash cromatografia di **14a** o **14b**, si è proceduto con la Fmoc deprotezione del gruppo amminico in presenza di dietilammina in THF. La successiva reazione di accoppiamento con il Boc-Tpi-OH (**16**), in presenza di HOBt, HBTU e DIPEA ha portato alla formazione dei composti **17a** o **17b**. La deprotezione dei gruppi protettori in catena laterale, avvenuta mediante l'utilizzo di acido trifluoroacetico e DCM, ha

permesso di ottenere i composti finali **18a** o **18b**, che sono stati purificati tramite HPLC semi-preparativo e caratterizzati tramite spettrometria di massa e $^1\text{H-NMR}$.

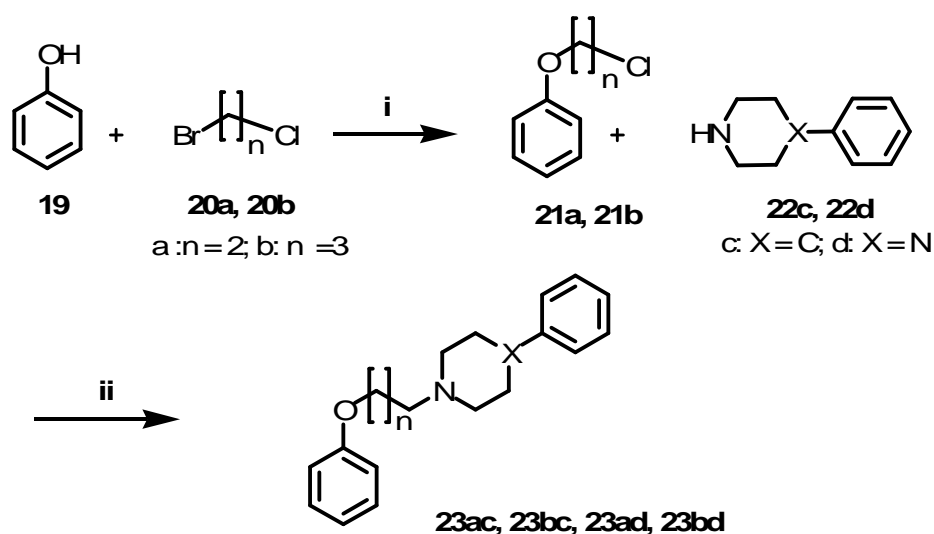


Schema 2. Reagenti e condizioni: i) HBTU, HOBT, DIEA, DMF, rt, 12 h; ii) DEA, THF, rt, 3h; iii) HBTU, HOBT, DIEA, DMF, rt, 12 h; iv) TFA, CH_2Cl_2 , rt, 12h.

3.1.3.2 Sintesi dei composti a nucleo piperidinico e piperazinico.

I rispettivi derivati piperidinici (**23ac**, **23bc**) e piperazinici (**23bc**, **23bd**) sono stati sintetizzati secondo lo schema 3. Per la sintesi di questi composti sono state riscontrate diverse difficoltà dovute a rese molto basse a causa della scarsa reattività del fenolo. Il primo step, infatti, prevede la sostituzione nucleofila dell'O del fenolo con l' 1-bromo-2-cloroetano (**20a**) o l' 1-bromo-3-cloropropano (**20b**). Per ottimizzare questa reazione sono state utilizzate diverse condizioni, utilizzando differenti solventi e basi. Le migliori

rese per gli intermedi **21a** e **21b** sono state ottenute utilizzando DBU come base e DMF come solvente, in presenza di ioduro di sodio. L'intermedio è stato fatto reagire, attraverso una seconda sostituzione nucleofila, con la 4-fenilpiperidina (**22c**) o la 4-fenilpiperazina (**22d**) in presenza di DIPEA, CS_2CO_3 e NaI in THF; la reazione ha portato alla sintesi dei composti finale **23ac**, **23bc**, **23ad**, **23bd**, purificati tramite flash cromatografia e caratterizzato tramite $^1\text{H-NMR}$.

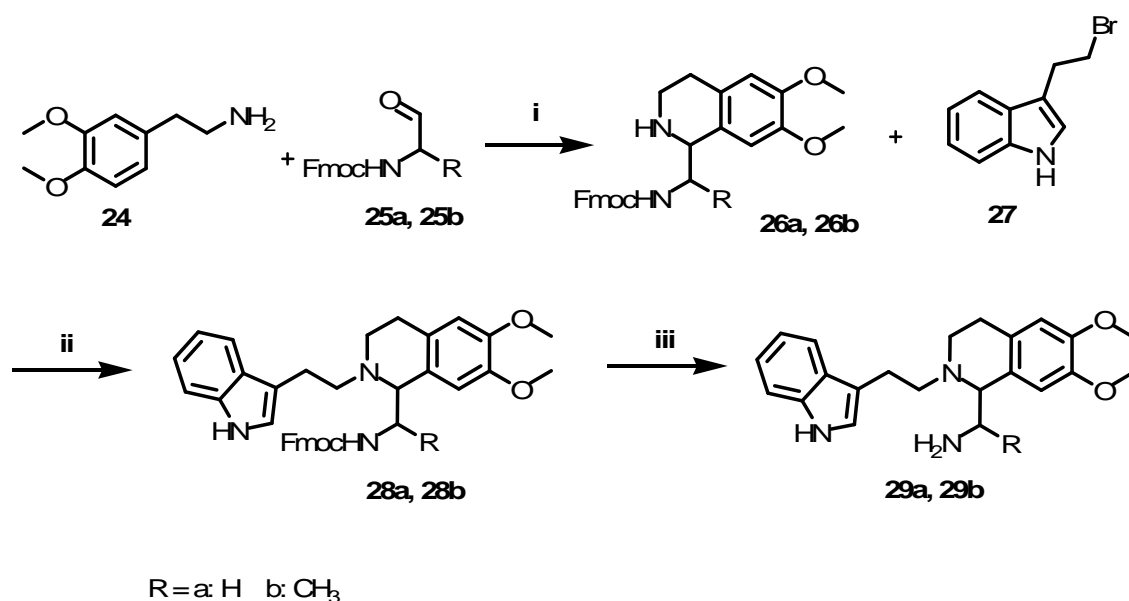


Schema 3. Reagenti e condizioni: i) DBU, NaI, DMF, refluxo, 2 h; ii) DIEA, CS_2CO_3 , NaI, THF, rt, 12h.

3.1.3.3 Sintesi dei composti a nucleo tetraidro-isochinolinico

I derivati tetraidroisochinolinici, **28a** e **28b**, sono stati sintetizzati secondo la metodica illustrata nello schema 4. Mediante una reazione di Pictet-Spengler, la 3,4-dimetossifenilettilammina (**24**) è stata condensata con i derivati aldeidici delle corrispondenti Fmoc-Glicina (**25a**) e della Fmoc-Alanina (**25b**), in presenza di acido trifluoroacetico, ottenendo rispettivamente gli intermedi di reazione **26a** o **26b**.

Successivamente la sostituzione nucleofila del composto 3-(2-Bromoetil)-1*H*-indolo (**27**) con gli intermedi **26a** o **26b**, in presenza di DIPEA, Cs₂CO₃, NaI, in THF, ha permesso di ottenere i corrispondenti derivati **28a** o **28b**. La Fmoc deprotezione con dietilammina in THF ha portato all'ottenimento dei prodotti finali **29a** e **29b**. Tali composti sono stati purificati tramite flash cromatografia e caratterizzato tramite ¹H-NMR.



Schema 4. Reagenti e condizioni: i) TFA, DCM, refluxo, 6h; ii) DIEA, CS₂CO₃, NaI, THF, rt, 8h; iii)DEA, THF, r.t., 4h.

3.2 Sperimentazione Biologica

I peptidi sintetizzati sono stati saggiati per la loro affinità recettoriale attraverso studi di binding in membrane ottenute da cellule CHO-K1 esprimenti il recettore UT ricombinante umano. Successivamente è stata valutata la capacità di indurre contrazione nell'aorta toracica di ratto. Il responso contrattile dei composti in esame è stato calcolato prendendo come riferimento il P5U e l'Urantide.

I risultati farmacologici dei peptidi modificati in posizione *N*-terminale sono riportati nella tabella 7.

Composto	Peptide	pKi	pEC ₅₀	E _{max} %U-II
P5U	H-Asp-[Pen-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH	9.7±0.07	9.6±0.07	97±31
1a	H-Ala-[Pen-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH	9.1±0.08	8.0	95±15
2a	H-Lys-[Pen-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH	8.1±0.07	8.17±0.25	
3a	H-Phe-[Pen-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH	9.5±0.05	9.23±0.11	96
5a	H-(2)Nal-[Pen-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH	8.2	8.28±0.10	
6a	H-Tic-[Pen-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH	8.6	8.87±0.18	88±13
8a	H-Cpa-[Pen-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH	9.0±0.03	8.86±0.06	96
URANTIDE	H-Asp-[Pen-Phe-DTrp-Orn-Tyr-Cys]-Val-OH	8.3±0.04	pA ₂ 7.5	
2b	H-Lys-[Pen-Phe-DTrp-Orn-Tyr-Cys]-Val-OH	6.7	pA ₂ 8.7	
3b	H-Phe-[Pen-Phe-DTrp-Orn-Tyr-Cys]-Val-OH	7.7	pA ₂ 8.7	
4b	H-(1)Nal-[Pen-Phe-DTrp-Orn-Tyr-Cys]-Val-OH	8.4	pA ₂ 8.5	
5b	H-(2)Nal-[Pen-Phe-DTrp-Orn-Tyr-Cys]-Val-OH	7.9	pA ₂ 7.9	
6b	H-Tic-[Pen-Phe-DTrp-Orn-Tyr-Cys]-Val-OH	8.0	pA ₂ 9.0	
9b	H-Phe(pNO ₂)-[Pen-Phe-DTrp-Orn-Tyr-Cys]-Val-OH	7.8	pA ₂ 7.9	

Tabella 7. Dati farmacologici dei composti modificati in posizione N-terminale.

I risultati ottenuti dall'attività agonista sono stati espressi come pEC₅₀ (-logEC₅₀, EC=concentrazione molare del peptide che produce il 50% dell'effetto massimo); ciascun valore rappresenta la media ± s.e.m. di almeno 4-17 determinazioni. Il potere antagonista viene invece espresso come pA₂ (pA₂=log[CR-1]/[antagonista]; CR=concentrazione ratio rappresentata dal rapporto tra EC₅₀ dell'agonista in presenza o in assenza dell'antagonista).

Per quanto riguarda i derivati del P5U, la sostituzione dell' Asp⁴ con i residui alifatici Ala e Lys (composto **1a** e **2a**), ha dato peptidi con affinità e attività di circa 10 volte inferiore al peptide di riferimento. La sostituzione con Phe (composto **3a**), invece, genera composti con affinità e attività molto simile al P5U. L'introduzione di un atomo di alogeno, Cloro, in posizione para della Phe (composto **8a**) non influisce

sull'interazione con il recettore ma determina un decadimento dell'attività (pEC₅₀ 8.86 rispetto a 9.26 del P5U) ma. La sostituzione con un anello naftilico (composto **5a**) genera un peptide circa 10 volte meno affine e meno potente del P5U. Mentre l'introduzione di un residuo aromatico ristretto conformazionalmente come il Tic comporta una leggera perdita sia di affinità che di attività (composto **6a**).

Per quanto riguarda invece i derivati dell'antagonista Urantide l'introduzione della Lys, residuo alifatico carico positivamente, (composto **2b**) determina un notevole decremento dell'affinità recettoriale e dell'attività antagonista, pari a circa 20 volte. Lo stesso risultato si ottiene introducendo un residuo di Nal(2') e di Cpa, (composto **5b** e **9b**) con attività e affinità 10 volte inferiore al peptide di riferimento. La sostituzione con la Phe, invece, ha dato un peptide con minore affinità recettoriale ma che mantiene la stessa attività antagonista dell'Urantide. L'introduzione invece di un residuo di Nal(1') da un peptide con attività e affinità simile al peptide di riferimento. Mentre l'introduzione di un residuo aromatico ristretto conformazionalmente, Tic, origina il derivato più potente della serie (composto **6b**) con un'attività antagonista quasi 10 volte più elevata dell'Urantide.

I risultati ottenuti dalla maggior parte dei composti dimostrano che il residuo di Aspartico in posizione 4 sembra non essere indispensabile ai fini dell'interazione recettoriale e dell'attività biologica. Infatti l'introduzione di un'anello aromatico, come quello della Phe o del Cpa sembra generare peptidi con attività e affinità quasi uguale ai peptidi di riferimento, questo suggerisce che la carica negativa dell' Asp non è cruciale per l'interazione recettoriale. Inoltre, i dati ottenuti nel caso del composto **2a** e **2b**, **5a** e **5b** dimostrano che la sostituzione rispettivamente con un residuo di Lys e Nal(2') non è

critica ai fini dell'attività agonista mentre mostra una maggiore influenza sull'attività antagonista. Questo sembra dimostrare l'esistenza di un diverso sito di interazione recettoriale per l'agonista e l'antagonista.

Queste supposizioni sono state confermate in parte da uno studio effettuato da Fournier ed apparso su *Biochemistry* in cui è stato messo in evidenza, usando una particolare tecnica di NMR, che gli agonisti hU-II e URP agirebbero sia sul loop extracellulare II che III, mentre l'Urantide, l'unico antagonista al momento dello studio disponibile, agirebbe esclusivamente sul *loop-II*. Questo studio ci ha spinto ad effettuare uno studio di modeling mediante la costruzione del recettore UT e il successivo docking dei ligandi da noi sviluppati. Il lavoro è in parte in esecuzione presso i nostri laboratori.

Il risultato più importante è stato ottenuto con il composto **6b** che si è dimostrato essere un'antagonista più potente dell'Urantide, confermando che il residuo di aspartico in posizione 4 e quindi la carica negativa non è indispensabile ai fini dell'interazione recettoriale e dell'attività biologica.

In tabella 8 vengono mostrati i risultati dei composti che presentano un residuo di Pro, aminoacido ristretto conformazionalmente, al posto della Phe.⁶

Composto	pKi	pEC ₅₀
U-II (4-11)		8.86±0.08
P5U	9.7±0.07	9.6±0.07
URANTIDE	8.3±0.04	---
10	5.0	IN
10a	5.3	IN
10b	5.3	IN

Tabella 8. *Dati farmacologici dei composti modificati nella core sequence con amminoacidi ristretti conformazionalmente.*

L' introduzione di Pro sia nel frammento UT(4-11) che nel P5U e nell' Urantide ha dato peptidi inattivi e con scarsa affinità recettoriale. Quindi probabilmente l'introduzione nel backbone peptidico di un residuo ristretto conformazionalmente va a determinare un drastico cambiamento nelle conformazione del peptide risultante deleteria per l'interazione con il recettore.

Ovviamente la mancanza di studi di binding e di saggi funzionali su alcuni dei composti sintetizzati non permette ancora di valutare bene l'entità ai fini biologici delle sostituzioni apportate. Lo studio è attualmente in corso.

4. Conclusioni

Negli ultimi anni è aumentato notevolmente l'interesse della comunità scientifica per il ruolo svolto dall'Urotensina-II nella regolazione della normale omeostasi pressoria.

Inoltre, il coinvolgimento di questo peptide endogeno in altre patologie, ha fatto sì che numerosi gruppi di ricerca, sia privati che pubblici, abbiano investito notevoli risorse al fine di sviluppare agonisti ed antagonisti selettivi. In tale ambito, il gruppo di ricerca presso il quale ho svolto il mio lavoro di tesi, occupa un ruolo di primo piano.

In questo lavoro sono state sintetizzate diverse serie di composti analoghi dell'Urotensina II al fine comprendere meglio il ruolo fisiologico dell'Urotensina-II, identificare la natura del recettore UT e stabilire ulteriormente i requisiti minimi strutturali fondamentali per l'interazione del ligando con il recettore.

Alla luce dei dati farmacologici ottenuti possiamo affermare che la presenza in posizione 4, di un residuo amminoacidico più lipofilo e non carico, non risulta essere deleterio ai fini dell'affinità recettoriale dell'attività biologica. La maggior parte delle modifiche effettuate, infatti, hanno portato all'ottenimento di ligandi con attività simile al P5U e all'Urantide.

Inoltre, sostituendo l' Asp⁴ con il Tic abbiamo ottenuto un nuovo antagonista del recettore UT più potente dell'Urantide ($pA_2 = 9.0$) Questo nuovo composto potrà essere utilizzato per ulteriori studi biologici sul recettore UT.

In più sono stati sintetizzati composti peptidomimetici con potenziale attività agonista e antagonista. Questi ultimi potranno essere potenziali candidati all'impiego terapeutico nel trattamento dell'ipertensione arteriosa. I saggi biologici di questi composti sono ancora in corso.

Questo lavoro e quelli precedenti saranno utilizzati per la progettazione e la sintesi di nuovi analoghi peptidici e peptidomimetici, con l'obiettivo di completare l'esplorazione dei requisiti strutturali fondamentali per l'attività biologica dell'Urotensina II.

5. Parte Sperimentale

5.1 Sintesi dei peptidi.

Tutti gli aminoacidi N^α -Fmoc-protetti e la resina Wang sono stati acquistati dalla GL Biochem (China), HBTU e HOBt, TFA e DIPEA sono stati forniti dall' Iris Biotech (Germania).

I solventi per la sintesi peptidica così come l'Acetonitrile per HPLC sono stati acquistati da fonti commerciali ed usati senza ulteriore purificazione.

La sintesi degli analoghi dell'U-II è stata effettuata in reattori manuali mediante sintesi in fase solida. In particolare tutti i peptidi sono stati preparati partendo da 0,5 g di resina Wang (con grado di sostituzione di 0.7 mmol/g) precedentemente lasciata rigonfiare in 30 ml di DMF. L'accoppiamento del primo aminoacido (N^α Fmoc-Val-OH), così come quello dei successivi aminoacidi (N^α Fmoc-Cys(Trt)-OH, N^α Fmoc-Tyr(tBu)-OH, N^α Fmoc-Zaa(N^ϵ -Boc)-OH (Zaa = Lys, Orn), N^α Fmoc-Yaa(N^{in} -Boc)-OH (Yaa = Trp, DTrp, Tpi, D-Tpi), N^α Fmoc-Xaa-OH (Xaa = Phe, Pro), N^α Fmoc-Pen(Trt)-OH e N^α Fmoc-Waa-OH (Waa: Phe, Cpa, Tic, Nal, Tpi, Ala, Lys), è stato effettuato usando un eccesso di aminoacido pari a 3 volte il grado di sostituzione della resina in presenza di HBTU/HOBt e di DIEA. Per il primo aminoacido è stata usata una quantità catalitica di DMAP.

Il gruppo N^α -Fmoc è stato rimosso mediante trattamento del peptide legato alla resina con una soluzione al 25% di piperidina in DMF (1x50 mL, 5 min, 1x50 mL, 20 min). I peptidi sono stati quindi lavati più volte con DMF (3x50 mL), DCM (3x50 mL). Il procedimento è stato condotto fino alla completezza della sintesi.

Le sequenze amminoacidiche sono state così assemblate alternando cicli di deprotezione e cicli di accoppiamento.

Il Kaiser test è stato effettuato dopo ogni accoppiamento, per determinarne la completezza, e dopo ogni deprotezione per verificare la totale rimozione del gruppo protettore N^α-Fmoc.

Il gruppo N^α-Fmoc terminale è stato rimosso e il distacco del peptide finale dalla resina e la contemporanea rimozione dei gruppi protettori in catena laterale sono stati effettuati utilizzando una miscela di TFA/Et₃SiH/H₂O (90:5:5) per una durata di 3 ore.

Infine, la resina è stata rimossa dalla soluzione mediante filtrazione e il peptide grezzo è stato recuperato attraverso precipitazione in etere etilico a freddo ottenendo un precipitato bianco.

5.1.1 Formazione del ponte disolfuro

Il ponte disolfuro dei peptidi sintetizzati è stato ottenuto mediante ossidazione con ferrocianuro di potassio utilizzando il metodo della *syringe pump*.⁴²

Dopo aver sciolto il peptide in un volume di acqua pari a 10 mL, e aver aggiunto CH₃CN per facilitarne la dissoluzione, è stata aggiunta una soluzione ossidante preparata nel seguente modo: in un pallone da 250 mL sono stati sciolti 20 mg di K₃Fe(CN)₆ in 50 mL di acqua e 10 mL di CH₃CN, sono stati aggiunti 10 ml di una soluzione satura di ammonio acetato. Infine è stata aggiunta ammoniaca fino a pH = 8.5. Il peptide posto nella syringe pump è stato aggiunto con un flusso di 10 µl/min molto lentamente alla soluzione posta sotto agitazione, controllando il pH. La reazione è stata lasciata sotto agitazione per 24-48 ore a seconda dei casi. Il decorso delle reazioni

è stato monitorato mediante RP-HPLC analitico della Shimadzu. usando una colonna C₁₈ Vydac 218TP104. A ciclizzazione avvenuta è stato aggiunto acido acetico glaciale fino a pH=4. Sono stati aggiunti 20 g di amberlite IRA-68 e la reazione è stata lasciata sotto agitazione per 20 minuti fino a separazione della soluzione incolore dalla resina gialla. Il tutto è stato filtrato su un imbuto Buckner; è stato aggiunto alla soluzione n-Butanolo e si è provveduto all'allontanamento dell'azeotropo acqua-butanolo formatosi.

5.2 Purificazione e caratterizzazione dei peptidi

Successivamente il peptide è stato purificato mediante HPLC preparativo su colonna C-18 a fase inversa (Vydac 218TP1010, 1.0 cm x25 cm) ed eluita con un gradiente lineare di CH₃CN in H₂O con 0,1% di acido trifluoroacetico (v/v). La purificazione è stata monitorata a 230 nm, e le frazioni corrispondenti al picco di maggiore entità sono state raccolte, combinate e liofilizzate per dare un prodotto finale puro (>98%) come polvere bianca (resa: 45-50 % come peptide ciclico). Il grado di purezza finale è stato controllato mediante RP-HPLC analitico della Shimadzu usando una colonna C₁₈ Vydac 218TP104 e applicando un gradiente da 10% a 90% acetonitrile in acqua con l'aggiunta di 0.1% di TFA nel tempo di 40 min ad un flusso di 1 mL per min. Tutti i peptidi, infine, sono stati caratterizzati mediante spettrometria di massa ESI.

5.3 Sintesi peptidomimetici

Le strutture dei composti sintetizzati sono state confermate dalle loro proprietà analitiche e spettroscopiche. I controlli cromatografici della purezza sono stati eseguiti mediante cromatografia su strato sottile (TLC) usando lastre di gel di silice (0.25 mm) con supporto fluorescente a 254 nm.

L'analisi elementare (C, H e N) è in accordo con i valori calcolati con un limite di errore di $\pm 0,4$ % del valore teorico.

Gli spettri di massa ad Impatto Elettronico sono stati registrati con uno spettrometro API 2000. Gli spettri ^1H NMR dei composti sono stati registrati in CDCl_3 con uno spettrometro Varian 400 MHz con Me_4Si come riferimento interno. I chemical shifts sono espressi in δ e le costanti di accoppiamento in Hz.

Procedura generale di sintesi di N-[1-(phenethylcarbamoyl)-5-aminoalkyl]-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4b]indol-3-carboxamide, **18 a e 18b**

Un grammo di Fmoc-Lys(Boc)-OH (**12a**) o Fmoc-Orn(Boc)-OH (**12b**) (2.5 mmol) viene solubilizzato in dimetilformammide e alla soluzione vengono aggiunte 3.2 mmol di HOBt, 3.2 mmol di HBTU, 6.4 mmol di DIPEA e 3.2 di fenilettilammina (13). La reazione viene lasciata sotto agitazione elettromagnetica, a temperatura ambiente per 12 ore e monitorata tramite TLC utilizzando una camera di diclorometano. Successivamente il solvente di reazione viene allontanato per distillazione a pressione ridotta e il grezzo di reazione viene sciolto in Diclorometano e lavato per tre volte con acqua distillata per tre volte con una soluzione di acido citrico al 10% e un'ultima volta

con acqua distillata, quindi la fase organica viene anidrificata su solfato di sodio anidro ed evaporata a pressione ridotta.

I composti ottenuti ((9H-fluoren-9-yl)methyl-1-(phenethylcarbamoyl)-5-aminoalkylcarbamate, **14a** **14b**) vengono purificati mediante flash cromatografia, utilizzando come eluente diclorometano ed è ottenuto con una resa di circa il 70%.

Gli intermedi **14a** e **14b** sono stati solubilizzati in una soluzione di dietilammina in tetraidrofurano al 33% per effettuare la deprotezione dal gruppo Fmoc. La reazione viene eseguita a temperatura ambiente, sotto agitazione elettromagnetica per tre ore e monitorata mediante TLC in una camera di diclorometano/metanolo 9/1. Al termine delle tre ore la reazione viene interrotta, la fase organica evaporata e il grezzo di reazione viene lavato con n-esano per allontanare il fluorene liberato.

I composti **15a** e **15b** così deprotetti e ottenuti in rese quantitative vengono solubilizzati in dimetilformammide e alla soluzione vengono aggiunte 2.0 mmol di HOBt, 2.0 mmol di HBTU, 4.0 mmol di DIPEA e 2.0 di Boc-Tpi-OH (**16**). La reazione viene lasciata sotto agitazione elettromagnetica per 12 ore a temperatura ambiente, in seguito, la dimetilformammide viene allontanata per distillazione sotto vuoto e il grezzo di reazione viene solubilizzato in diclorometano, la fase organica viene dibattuta con acqua distillata per tre volte, con una soluzione di acido citrico al 10% per altre tre volte e un'ultima volta nuovamente con acqua distillata, anidrificata su solfato di sodio anidro e infine evaporata sotto vuoto. I composti **17a** e **17b** vengono solubilizzati in una soluzione di diclorometano/acido trifluoroacetico 1/1 allo scopo di allontanare i gruppi Boc delle catene laterali e la reazione viene interrotta dopo 2 ore. I prodotti finali **18a** e **18b** vengono quindi purificati mediante HPLC semipreparativa su colonna C-18 a fasi

inversa ed eluita con un gradiente lineare di acetonitrile in acqua con 0,1% di acido trifluoroacetico (v/v). Sono ottenuti come solidi gialli con una resa di circa il 47%.

N-[1-(Phenethylcarbamoyl)-5-aminopentyl]-2,3,4,9-tetrahydro-1H-

pyrido[3,4b]indol-3-carboxamide, 18a: Polvere giallo pallido; (47%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 10.09 (s, 1NH); 8.45 (s, 1NH); 7.96 (s, 1NH); 7.27 (t, 1H, H6); 7.25-7.20 (m, 5H, aryl); 7.16 (t, 1H, H7); 6.90 (d, 1H, H8, $J = 7.8$ Hz); 6.72 (d, 1H, H5, $J = 7.8$ Hz); 4.52-4.50 (m, 1H, H1'); 4.27 (dd, 1H, H3, $J' = 3.2$ Hz, $J'' = 10.6$ Hz); 4.17-4.15 (m, 1H, H1a); 4.02-3.99 (m, 1H, H1b); 3.61 (t, 2H, CH_2 ethyl); 2.90-2.78 (m, 3H, H4a e CH_2 ethyl); 2.70-2.62 (m, 3H, H4b e H5'); 1.80-1.76 (m, 2H, H2'); 1.61-1.59 (m, 2H, H4'); 1.32-1.28 (m, 2H, H3'). MS $[\text{M}^+]$ calcolata per $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_2$: 447.55, trovata: 447.43.

N-[1-(Phenethylcarbamoyl)-5-aminobutyl]-2,3,4,9-tetrahydro-1H

pyrido[3,4b]indol-3-carboxamide, 18b: Polvere giallo pallido; (46%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 9.86 (s, 1NH); 8.77 (s, 1NH); 7.91 (s, 1NH); 7.25 (t, 1H, H6); 7.21-7.16 (m, 5H, aryl); 7.14 (t, 1H, H7); 6.93 (d, 1H, H8, $J = 8.0$ Hz); 6.76 (d, 1H, H5, $J = 8.0$ Hz); 4.49-4.45 (m, 1H, H1'); 4.22 (dd, 1H, H3, $J' = 3.6$ Hz, $J'' = 11.4$ Hz); 4.13-4.08 (m, 1H, H1a); 4.00-3.95 (m, 1H, H1b); 3.63 (t, 2H, CH_2 ethyl); 2.83-2.75 (m, 3H, H4a e CH_2 ethyl); 2.71-2.69 (m, 2H, H4'); 2.66-2.62 (m, 3H, H4b); 1.84-1.79 (m, 2H, H2'); 1.34-1.31 (m, 2H, H3'). MS $[\text{M}^+]$ calcolata per $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_2$: 433.25, trovata: 433.30.

Procedura generale di sintesi di 1-(2-phenoxyalkyl)-4-phenylpiperidine (**23ac e 23bc**), e di 1-(2-phenoxyalkyl)-4-phenylpiperazine (**23ad e 26bd**).

Ad una soluzione di Fenolo (**19**) (10.0 mmol) in dimetilformammide vengono aggiunte 10.0 mmol di 1-bromo-2-cloroetano (**20a**) o l'1-bromo-3-cloropropano (**20b**), 10.0 mmol di ioduro sodico e 10.0 mmol di DBU. La reazione viene lasciata sotto agitazione elettromagnetica per 2 ore a temperatura di reflusso e monitorata tramite TLC impiegando diclorometano come eluente. Successivamente si evapora la DMF e il grezzo di reazione viene sciolto in diclorometano e dibattuto con acqua per tre volte. Il diclorometano viene quindi anidrificato su solfato di sodio anidro ed allontanato per distillazione sotto vuoto. Gli intermedi **21a e 21b**, 1-(2-cloroalkoxy)benzenici, vengono purificati tramite flash cromatografia utilizzando diclorometano come eluente, questi derivati sono ottenuti con una resa di circa il 40%.

I composti **21a o 21b** (4.0 mmol) vengono sciolti in tetraidrofurano ed alla soluzione vengono aggiunte 4.0 mmol di *p*-fenilpiperidina o *p*-fenilpiperazina, 4.0 mmol di DIPEA, 2.0 mmol di Cs₂CO₃ e 4.0 mmol di NaI.

La reazione viene mantenuta sotto agitazione elettromagnetica per 12 ore a temperatura ambiente e monitorata tramite TLC in una camera di diclorometano/metanolo 9/1.

In seguito il THF viene evaporato sotto vuoto e il grezzo di reazione viene sciolto in DCM e dibattuto con acqua per tre volte; la fase organica viene anidrificato su solfato di sodio anidro ed il solvente allontanato per evaporazione a pressione ridotta.

I composti finali **23ac**, **23bc**, **23ad**, **23bd** vengono purificati tramite flash cromatografia utilizzando una miscela di eluenti costituita da DCM/MeOH 9/1, sono ottenuti con rese di circa il 35% e si presentano come oli giallo-scuri.

1-(2-Phenoxyethyl)-4-phenylpiperidine, 23ac: Oil; (52%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.33-7.26 (m, 4H, aryl); 6.95-6.86 (m, 6H, aryl); 4.02 (t, CH_2 , ethyl); 2.85-2.78 (m, 3H, H4, CH_2 ethyl); 2.31-2.20 (m, 4H, H2, H6); 2.01-1.88 (m, 4H, H3, H5). MS [M+] calcolata per $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}$: 281.18, trovata: 281.16.

1-(3-Phenoxypropyl)-4-phenylpiperidine, 23bc: Oil; (51%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.36-7.30 (m, 4H, aryl); 7.02-6.98 (m, 6H, aryl); 4.01 (t, CH_2 , propyl); 2.91-2.87 (m, 2H, H4); 2.63 (t, 2H, CH_2 propyl); 2.29-2.21 (m, 4H, H2, H6); 2.05 (q, 2H, propyl); 1.96-1.83 (m, 4H, H3, H5). MS [M+] calcolata per $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{NO}$: 295.19, trovata: 295.16.

1-(2-Phenoxyethyl)-4-phenylpiperazine, 23ad: Oil; (48%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.38-7.31 (m, 4H, aryl); 7.01-6.95 (m, 6H, aryl); 4.04 (t, CH_2 , ethyl); 3.31 (t, 4H, H3, H5); 2.80 (t, 2H, CH_2 ethyl); 2.72 (t, 4H, H2, H6). MS [M+] calcolata per $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}$: 282.17, trovata: 282.15.

1-(3-Phenoxypropyl)-4-phenylpiperazine, 23bd: Oil; (47%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.34-7.29 (m, 4H, aryl); 7.05-7.00 (m, 6H, aryl); 4.03 (t, CH_2 , propyl); 3.28 (t, 4H, H2, H6); 2.71 (t, 4H, H3, H5); 2.65 (t, 2H, CH_2 propyl); 2.07 (q, 2H, propyl). MS [M+] calcolata per $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}$: 296.19, trovata: 296.21.

Procedura generale di sintesi di {2-[2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl]-1,2,3,4-tetrahydro-6,7-dimethoxyisoquinolin-1-yl}alkylamine (**29a e 29b**).

Cinque mmol di 3,4-dimetossifenilettilammina (**24**) vengono solubilizzate in diclorometano e alla soluzione si aggiungono 5 mmol di tert-butyl formylmethylcarbamate (**25a**) o di tert-butyl formylethylcarbamate (**25b**) e 5.0 mmol di acido trifluoroacetico.

La reazione viene condotta a temperatura di refluxo e monitorata mediante TLC in una camera di acetato di etile/n-esano in rapporto 3/2.

Dopo 6 ore la reazione viene interrotta, e il diclorometano viene lavato con acqua per tre volte. Successivamente la fase organica viene anidrificata su solfato sodico anidro e evaporata sotto vuoto.

Gli intermedi **26a** e **26b** n vengono purificati per flash cromatografia utilizzando come eluente una miscela di acetato/n-esano 3/2 e sono ottenuti con rese di circa il 60 %.

I composti **26a** e **26b** (3.0 mmol) vengono sciolti in tetraidrofurano e alla soluzione si aggiungono 3.5 mmol di 3-(2-bromoethyl)-1*H*-indolo (30), 3.5 mmol di NaI, 1.8 mmol di Cs₂CO₃ e 3.5 mmol di DIPEA; la reazione viene mantenuta sotto agitazione elettromagnetica per 8 ore e controllata per TLC utilizzando una camera di acetato di etile/n-esano 1/1.

Successivamente il THF viene evaporato sotto vuoto e il grezzo di reazione viene sciolto in DCM e lavato con acqua per tre volte. La fase organica viene allontanata per distillazione a pressione ridotta e i composti **28a** e **28b** vengono sottoposti a Fmoc deprotezione mediante una soluzione di dietilammina in THF al 33%. La reazione viene

eseguita a temperatura ambiente, sotto agitazione elettromagnetica per quattro ore e monitorata mediante TLC in una camera di diclorometano/metanolo 9/1. Al termine delle quattro ore la reazione viene interrotta, la fase organica evaporata e il grezzo di reazione viene lavato con n-esano per allontanare il fluorene liberato.

I composti finali **29a** e **29b** così ottenuti vengono purificati per flash cromatografia usando come eluente una soluzione di acetato di etile n-esano 1/1 e sono ottenuti con una resa di circa il 43% come oli giallo-pallidi.

{2-[2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl]-1,2,3,4-tetrahydro-6,7-dimethoxyisoquinolin-1-

yl}methanamine, 29a: Oil; (42%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 9.46 (s, 1NH); 7.26 (t, 1H, H5'); 7.18 (d, 1H, H4', *J* = 8.0 Hz); 7.15 (d, 1H, H7', *J* = 8.0 Hz); 7.11 (t, 1H, H6'); 6.86 (s, 1H, H2'); 6.51 (s, 2H, H5, H8); 4.19-4.15 (m, 1H, H1); 3.81 (s, 3H, OCH₃); 3.77 (s, 3H, OCH₃); 3.22-3.19 (m, 1H, H1'); 2.93-2.89 (m, 1H, H''); 2.73-2.67 (m, 2H, H3a, H4a); 2.62-2.52 (m, 4H, H3b, H4b, CH₂ ethyl); 2.44 (t, 2H, CH₂ ethyl). MS [M⁺] calcolata per C₂₂H₂₇N₃O₂: 365.21, trovata: 365.24.

2-[2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl]-1,2,3,4-tetrahydro-6,7-dimethoxyisoquinolin-1-

yl}ethanamine, 29b: Oil; (44%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 9.01 (s, 1NH); 7.24 (t, 1H, H5'); 7.16 (d, 1H, H4', *J* = 8.0 Hz); 7.13 (d, 1H, H7', *J* = 8.0 Hz); 7.09 (t, 1H, H6'); 6.82 (s, 1H, H2'); 6.55 (s, 2H, H5, H8); 4.22-4.18 (m, 1H, H1); 4.01-3.98 (m, 1H, H1'); 3.80 (s, 3H, OCH₃); 3.78 (s, 3H, OCH₃); 2.71-2.64 (m, 2H, H3a, H4a); 2.58-2.51 (m, 4H, H3b, H4b, CH₂ ethyl); 2.41 (t, 2H, CH₂ ethyl). MS [M⁺] calcolata per C₂₃H₂₉N₃O₂: 379.23, trovata: 379.26.

5.4 Saggi di Binding

Tutti gli esperimenti sono stati fatti in membrane ottenute da cellule CHO-K1 esprimenti il recettore ricombinante umano U-II (Euroscreen ES-440-M, Bruxelles, Belgium). Le condizioni di analisi sono stati: tampone Tris (20 mM, pH 7.4 a 37° C) aggiunto con MgCl₂ (5 mM) e 0.5% BSA. Il volume dell'analisi finale era 0.1 ml, contenenti 1 mg di proteine di membrana. Il radioligando usato per gli esperimenti di competizione sono stati [¹²⁵I] Urotensina II (attività specifica 2000Ci/mmol; Amersham, Biosciences, Buckinghamshire, UK) nell'intervallo: 0.07-1.4 nM (corrispondenti a 1/10-1/5 della sua K_D).

È stato determinato un legame non specifico in presenza di 1μM di hU-II senza etichetta e disposto tra il 10-20% del legame totale.

Il periodo d'incubazione (120 minuti a 37° C) è stato concluso con una rapida filtrazione attraverso Whatman GF/B filtri (presolvatati in BSA allo 0.5% per 3h).

In seguito i filtri sono stati lavati per quattro volte con 4 ml di soluzione tampone fredda (20 mM).

La radioattività è stata valutata con un contatore γCobra (Canberra-Packard).

5.5 Eserimenti Funzionali: saggio sull'aorta toracica isolata del ratto

Lo studio è stato effettuato su porzioni di aorta toracica isolata di topi albini maschi che sono stati storditi e uccisi.

L'aorta toracica è stata pulita dal tessuto circostante ed incisa dall'arto aortico al diaframma. Il vaso è stato aperto lungo l'asse longitudinale e l'endotelio è stato rimosso con un delicato sfregamento della sua superficie interna con un applicatore con punta in carbone.

La prova di questa operazione è stata assicurata dalla perdita di risposta di rilassamento all'Ach (1 μ M) in preparazioni precontratte di noradrenalina (1 μ M).

Da ciascuna aorta è stata ricavata una striscia tagliata elicoidalmente e in seguito è stata divisa in due strisce parallele.

Una prima striscia è stata usata come controllo costruendo una curva dose-risposta all'hU-II mentre l'altra striscia ha ricevuto il peptide sotto esame (come singola dose massimale o come una serie di concentrazioni somministrate cumulativamente).

Tutte le preparazioni sono messe in bagnetti d'organo di 5ml saturati con soluzione ossigenata di Krebs-Kenslet (96% O₂, 24% CO₂).

Le massime risposte contrattili delle preparazioni sono state indotte con la somministrazione di KCl (80 mM) alla fine dell'esperimento.

L'attività antagonista è stata espressa in termini di pK_b (logaritmo negativo della costante di dissociazione dell'antagonista) e assumendo una pendenza di -1,0.

È stata stimata una media dei valori individuali ottenuti con l'equazione: $pkb = \log [dose\ ratio - 1] - \log [concentrazione\ antagonista]$.

La competitività antagonista è stata controllata dal metodo “Schild plot”: una traccia con regressione lineare e pendenza non significativamente differente dall’unità è stata considerata come prova della semplice competizione reversibile.

6. Bibliografia

1. Watanabe T., Kanome T., Miyazaki A., Katagiri T. Human Urotensin II as a link between Hypertension and coronary artery disease *Hypertens.Res* **2006**, 29, (6) 375-387.
2. Farmaci antipertensivi e terapia farmacologica dell'ipertensione; In *Goodman and Gilman's Le Basi Farmacologiche della Terapia*, 10th ed.; John A. Oates e Nancy J. Brown, **2003**, 827-830.
3. Pearson D., Shively J.E., Clark B.R., Geschwind I., Barkley M., Nishioka R.S., Bern H.A. Urotensin II: a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, 77, 5021-5024.
4. Davenport A.P., Maguire J.J. Urotensin II: Fish neuropeptide catches orphan receptor. *Trends Pharmacol. Sci* **2000**, 21 80-82.
5. Bern, H.A., Pearson, D., Larson, B.A., Nishioka, R.S. Neurohormones from fish tails: the caudal neurosecretory system. I. *Recent. Progr. Horm. Res.* **1995**, 41, 533-552.
6. Itoh H., Itoh Y., Rivier J., Lederis K. Contraction of major artery segments of rat by fish neuropeptide urotensin II. *Am. J. Physiol.* **1987**, 252, R361-R366.
7. Mc Master D., Kobayashi Y., Rivier J., Lederis K. Characterization of the biologically and antigenically important regions of urotensin II. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **1986**, 29, 205-208.
8. Chatenet D., Dubessy C., Leprince J., Boullaran C., Carlier L., Segalas-Milazzo I., Guilhaudis L., Oulyadi H., Davoust D., Scalbert E., Pfeiffer B., Renard P., Tonon M.C., Lihmann I., Pacaud P., Vaudry H. Structure-activity

relationships and structural conformation of a novel urotensin II-related peptide
Peptide **2004**, 25, 1819-1830.

9. Douglas S.A., Ohlstein E.H. Human urotensin-II, the most potent mammalian vasoconstrictor identified to date, as a therapeutic target for the management of cardiovascular diseases. *Trends Cardiovasc. Med.* **2000**, 10, 229-237.

10. Conlon J.M., Tostivint H., Coulouarn Y., Jegou S., Tostivint H., Lihmann I. Characterization of human urotensin II as the most potent vasoconstrictor identified *Circulation* **1999**, 100 (Suppl.1) 2993.

11. Nothacker H.P., Wang Z., McNeill A.M., Saito Y., Merten S., O'Dowd B., Duckles S.P., Civelli O. Identification of the natural ligand of an orphan G-protein coupled receptor involved in the regulation of vasoconstriction. *Nature Cell Biol.* **1999**, 1, 383-385. b) Mori M., Sugo T., Abe M., Shimomura Y., Kurihara M., Kitada C., Kikuchi K., Shintai Y., Kurokawa T., Onda H., Nishimura O., Fujino M. Urotensin II is the endogenous ligand of a G-protein coupled orphan receptor, SENR (GPR14). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, 265, 123-129. c) Liu Q., Pong S., Zeng Z., Zhang Q., Howard A.D., Williams D.R., Davidoff M., Wang R., Austin C.P., McDonald T.P., Bai C., George S.R., Evans J.F., Caskey C.T. Identification of urotensin II as the endogenous ligand for the orphan G-protein coupled receptor GPR14. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, 266, 174-178.

12. Libert F., Vassart G., Parmentier M. Current developments in G-protein-coupled receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1991**, 8, 218-223.

13. Ames R.S., Sarau H.M., Chambers J.K., Willette R.N., Aiyar R.V., Romanic A.M., Loudon C.S., Foley J.J., Sauermelech C.F., Coatney R.W., Ao Z., Disa J., Holmes S.D., Stadel J.M., Martin J.D., Liu W.S., Glover G.I., Wilson S.,

McNulty D.E., Ellis C.E., Eishourbagy N.A., Shabon U., Trill J.J., Hay D.V.P., Ohlstein E.H., Bergsma D.J., Douglas S.A. Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* **1999**, 401, 282-286.

14. Marchese A., Heiber M., Nguyen T., Heng H.H., Saldivia V.R., Cheng R., Murphy P.M., Tsui L.C., Shi X., Gregor P., George S.R., O'Dowd B.F., Doeherty J.M. Cloning and chromosomal mapping of three novel genes, GPR9, GPR10 and GPR14, encoding receptor related to interleukin 8, neuropeptide Y, and somatostatin receptors. *Genomics* **1995**, 29, 335-344.

15. Boivin S., Guilhaudis L., Milazzo I., Oulyadi H., Davoust D., Fournier A. Characterization of Urotensin II receptor structural domains involved in the recognition of U-II, Urp, and Urantide *Biochemistry* , **2006**, 45, 5993-6002.

16. MacLean M.R., Alexander D., Stirrat A., Gallagher M., Douglas S.A., Ohlstein E.H., Morecroft I., Polland K. Contractile response to human urotensin-II in rat and human pulmonary arteries: effect of endothelial factors and chronic hypoxia in the rat. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, 130, 201-204.

17. Douglas S.A., Sulpizio A.C., Piercy V., Sarau H.M., Ames R.S., Aiyar N.V., Ohlstein E.H., Willette R.N. Differential vasoconstrictor activity of human urotensin-II in vascular tissue isolated from the rat, mouse, dog, pig, marmoset and cynomolgus monkey. *Br. J. Pharmacol.* **2001**, 131, 1262-1274.

18. Hay D., Luttmann M.A., Douglas S.A. Human urotensin-II is a potent spasmogen of primate airway smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, 131, 10-12.

19. Thanassoulis G., Huyhn T., Giaid A. Urotensin II and cardiovascular diseases *Peptides* 25, **2004**, 1789-1794.

20. Zhu Y.C., Zhu Y.Z., Moore P.K. The role of Urotensin II in cardiovascular and renal physiology and diseases *Br. J. Pharmacol.* **2006**, 148, 884-901.
21. Conlon J.M., Yano K., Waugh D., Hazon N. Distribution and molecular forms of urotensin II and its role in cardiovascular regulation in vertebrates *J. Exp. Zool.* **1996**; 275, 226-38.
22. Coulouarn Y., Lihmann I., Jegou S., Anouar Y., Tostivint H., Beauvillain J.C., Conlon J.M., Bern H.A., Vaudry H. Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 15803-15808.
23. Grieco P., Rovero P., Novellino E. Recent structure-activity studies of the peptide hormone urotensin II, a potent vasoconstrictor *Current Medicinal Chemistry* **2004**, 11, 8, 969-979.
24. Labarrère P., Chatenet D., Leprince J., Marionneau C., Loirand G., Tonon M.C., Dubessy C., Scalbert E., Pfeiffer B., Renard P., Calas B., Pacaud P., Vaudry H. Structure-activity relationships of human urotensin II and related analogues on rat aortic ring contraction *J Enzyme Inhib Med Chem.* **2003**, 18(2):77-88.
25. Bhaskaran R., ArunKumar A.I., Yu C. NMR and dynamical simulated annealing studies on the solution conformation of urotensin II *Biochim. Biophys Acta* **1994**, 1199(2), 115-22.
26. Flohr S., Kurz M., Kostenis E., Brkovich A., Fournier A., Klabunde T. Identification of nonpeptidic urotensin II receptor antagonists by virtual

screening based on a pharmacophore model derived from structure-activity relationships and nuclear magnetic resonance studies on urotensin II *J. Med. Chem.* **2002**, 45(9), 1799-805.

27. Carotenuto A., Grieco P., Campiglia P., Novellino E., Rovero P., Unravelling the active conformation of Urotensin II *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 1652-1661.

28. Grieco P., Carotenuto A., Campiglia P., Marinelli L., Lama T., Patacchini R., Santicioli P., Maggi C.A., Rovero P., Novellino E. Urotensin II receptor ligands. From agonist to antagonist activity *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 7290-7297.

29. Grieco P., Carotenuto A., Campiglia P., Zampelli E., Patacchini R., Maggi C.A., Novellino E., Rovero P. A new potent Urotensin II receptor peptide agonist containing a Pen residue at the disulfide bridge *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 4391-4394.

30. Novellino E., Grieco, P., Rovero P. Cyclic peptides acting as urotensin II antagonists, and use in the treatment of hypertension and other cardiovascular conditions and in urotensin II receptor characterization *PCT Int. Appl.* (**2005**), 19 pp. CODEN: PIXXD2 WO 2005023845 A2 20050317 AN 2005:239011.

31. Carotenuto A., Grieco P., Novellino E., Rovero P. Urotensin II receptor peptide agonists *Med. Res. Reviews* **2004** 24, 5, 577-588.

32. Marzola E., Camarda V., Batuwangala M., Lambert D. G., Calo' G., Guerrini R., Trapella C., Regoli D., Tomatis R., Salvadori S. Structure-activity relationship study of position 4 in the urotensin-II receptor ligand U-II(4-11) *Peptides* **2007** Jul 31.

33. Chatenet D., Dubessy C., Boularan C., Scalber E., Pfeiffer B., Renard P., Lihmann I., Pacaud P., Tonon M.C., Vaudry H., Leprince J. Structure-activity relationships of a novel series of urotensin II analogues: identification of a urotensin II antagonist *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 7234-7238.

34. Lescot E., Sopkova-de Oliveira Santos J., Dubessy C., Oulyadi H., Lesnard A., Vaudry H., Bureau R., Rault S. Definition of new pharmacophores for nonpeptide antagonist of human Urotensin-II. Comparison with the 3D-structure of human Urotensin-II and URP *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, 47, 602-612.

35. Aissaoui H., Binkert C., Clozel M., Mathys B., Mueller C., Nayler O., Scherz M., Velker J., Weller T. Preparation of 1-(piperaziny-lalkyl)-3-quinolinylurea derivatives as urotensin II antagonists. *PCT. Int. Appl.* **2004**, WO 2004099179, 32.

36. Aissaoui H., Binkert C., Clozel M., Mathys B., Mueller C., Nayler O., Scherz M., Velker J., Weller T. Preparation of novel piperidine derivatives as urotensin II antagonists *PCT Int. Appl.* **2004**, WO 2004099180, 32.

37. Aissaoui H., Binkert C., Clozel M., Mathys B., Mueller C., Nayler O., Scherz M., Weller T. Preparation of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolinylureas and related derivatives as urotensin II receptor antagonists *PCT Int. Appl.* **2002**, WO 2002076979, 94.

38. Clozel M., Binkert C., Birker-Robaczewska M., Boukhadra C., Ding S.S., Fischli W., Hess P., Mathys B., Morrison K., Muller C., Muller C., Nayler O., Qiu C., Rey M., Scherz M.W., Velker J., Weller T., Xi J.F., Ziltener P. Pharmacology of the urotensin-II receptor antagonist palosuran (ACT-058362); 1-[2-(4-benzyl-4-hydroxypiperidin-1-yl)-ethyl]-3-(2-methyl-quinolin-4-yl)-urea sulfate salt: First demonstration of a pathophysiological role of the urotensin system *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, 311, 204-212.

39. Kaiser E., Colescott R.L., Bossinger C.D., Cook P.I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* **1970**, 34, 595-598.

40. Pearson D.A. Trialkylsilanes as scavengers for the trifluoroacetic acid deblocking of protecting groups in peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 2739-2742.

41. Limal, D.; Briand, J.-P.; Dalbon, P.; Jolivet, M. Solid-phase synthesis and on-resin cyclization of a disulfide bond peptide and lactam analogues corresponding to the major antigenic site of HIV gp41 protein. *J. Peptide Res.* **1988**, 52, 121-129.

Indice

1. Introduzione	pag. 1
1.1 L' Ipertensione	pag.2
1.2 L' Urotensina II: struttura, recettore e attività biologica.....	pag.5
1.3 Studi relazione struttura-attività e studi conformazionali	pag.5
2. Impostazione ricerca	pag.17
2.1 P5U: caratteristiche strutturali e attività biologica	pag.18
2.2 Dall'agonista (P5U) al superantagonista (URANTIDE): caratteristiche strutturali e attività biologica	pag.20
2.3 Sintesi di analoghi dell' Urotensina II modificati in posizione N-terminale	pag.21
2.4 Sintesi di analoghi dell'urotensina II modificati nella core sequence con l'introduzione di amminoacidi ristretti conformazionalmente	pag.24
2.5 Sintesi di peptidomimetici	pag.26
3. Risultati e discussioni	pag.32
3.1 Chimica	pag.33
3.1.1 Sintesi peptidica	pag.33

3.1.2	Formazione del ponte disolfuro	pag.34
3.1.3	Sintesi peptidomimetici.....	pag.37
3.1.3.1	Sintesi dei composti a nucleo tetraidro- β carbolinico	pag.37
3.1.3.2	Sintesi dei composti a nucleo piperidinico e piperazinico.....	pag.38
3.1.3.3	Sintesi dei composti a nucleo tetraidro-isochinolinico	pag.39
3.3	Sperimentazione biologica.....	pag.41
4.	Conclusioni	pag.47
5.	Parte Sperimentale	pag.49
5.1	Sintesi dei peptidi.....	pag.50
5.1.1	Formazione del ponte disolfuro	pag.51
5.2	Purificazione e caratterizzazione dei peptidi.....	pag.52
5.3	Sintesi peptidomimetici.....	pag.53
5.4	Saggi di binding	pag.60
5.5	Esperimenti funzionali: saggio sull'aorta toracica isolata del ratto	pag.61
6.	Bibliografia	pag.62