

Université de Montréal

**Amélioration des propriétés pharmacocinétiques de peptides par
différentes alkylations *N*-terminales**

Par

Julien Poupart

Département de Chimie

Faculté des Arts et des Sciences

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures et postdoctorales

En vue de l'obtention de grade de

Maîtrise ès sciences (M.Sc.)

En Chimie

Avril 2014

© Julien Poupart, 2014

Sommaire

L'effet de différentes alkylations sur l'activité biologique et la stabilité enzymatique d'un peptide linéaire L, énantiomère du modulateur allostérique des récepteurs prostaglandine F2 α ont été étudiés. Dans une étude antérieure, le peptide D PDC-31 avait montré un potentiel d'inhibition des contractions du myomètre et permettait de retarder l'accouchement dans des modèles animaux et humains. Il est possible que le peptide L possède une activité semblable, mais les protéases, abondantes dans le tissu myométrial, le dégradent probablement avant qu'il ne puisse atteindre le site actif. La synthèse peptidique sur support solide suivie d'une amination réductive a permis d'obtenir différents peptides portant différentes chaînes alkyle et PEG N-terminales. La protection de l'amine terminale par un groupement *ortho*-nitrobenzène sulfonyle suivie par une réaction de Mitsunobu a permis l'obtention d'un analogue portant une chaîne farnesyle. Malgré le fait que ni l'analogue PEGylé, ni l'analogue farnesylé n'aient montrés la moindre activité, certains analogues alkylés se sont avérés actifs dans l'essai tissulaire de contractions myométriales. Le peptide L portant une chaîne dodécyle s'est avéré posséder une activité statistiquement significative et reproductible. Qui plus est, l'analogue D du peptide possédant une chaîne de 12 carbones s'est avéré posséder une activité inférieure à l'analogue L portant la même chaîne, ce qui représente une perte d'activité significative par rapport au peptide D non-modifié (PDC-31).

Mots clefs

Lipidation, PEGylation, Farnesylation, Prostaglandine F2 α , Accouchements prématurés.

Abstract

The application of hydrophobic grafts to prolong the biological activity of rapidly metabolized peptides has been explored by modification of the L-peptide of the prostaglandin F₂ α receptor modulator PDC-31. The all-D peptide PDC-31 has previously been shown to inhibit myometrial contractions and delay labour in various animal models as well as in humans. The L-peptide may have activity; however, proteases, which are abundant in myometrial tissue, may likely degrade the peptide before it is capable of showing activity. Solid-phase peptide synthesis followed by *N*-terminal modification by reductive aminations with different aldehydes provided linear aliphatic alkyl and PEG-grafted peptide analogs. Alternatively, *ortho*-nitrobenzensulfonylation of the peptide followed by Mitsunobu alkylation with farnesol and deprotection gave a farnesylated analog. Although the PEG and farnesylated analogs exhibited no activity, certain *N*-alkyl analogs exhibited inhibitory activity on myometrial contractions, with the most active analog possessing a dodecyl chain. Moreover, the *N*-dodecyl analog of PDC-31, exhibited lower activity than its L-counterpart in the myometrial contraction assay, and with reduced potency relative to its unmodified structure.

Key Words

Lipidation, PEGylation, Farnesylation, Prostaglandin F₂ α , Preterm labor.

Table des matières

| | |
|------------------------|-----|
| SOMMAIRE | II |
| MOTS CLÉS | II |
| ABSTRACT | III |
| KEY WORDS | III |
| TABLE DES MATIÈRES | IV |
| LISTE DES FIGURES | VII |
| LISTE DES SCHÉMAS | IX |
| LISTE DES TABLEAUX | X |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | XI |
| REMERCIEMENTS | XIV |

Chapitre 1 : Introduction

| | |
|---|----|
| 1.1 La problématique des accouchements prématurés | 2 |
| 1.2 Traitement des contractions prématurées | 5 |
| 1.3 Les récepteurs Prostaglandine F _{2α} | 9 |
| 1.4 Inhibiteurs connus | 13 |
| 1.5 PEGylation | 15 |
| 1.6 Lipidation | 16 |

| | |
|---|----|
| 1.7 Prénylation | 17 |
| 1.8 Étude de modélisation | 18 |
| 1.9 Méthodologies | 19 |
| 1.9.1 Amination réductrice | 19 |
| 1.9.2 Réaction de Mitsunobu avec une amine portant un groupement Nitrobenzènesulfonyle | 20 |
| 1.10 Références | 23 |

Chapitre 2 : Impact des différentes alkylations sur les propriétés pharmacocinétiques du peptide L-PDC-31

| | |
|--|----|
| 2.1 Introduction | 30 |
| 2.2.1 Abstract | 31 |
| 2.2 Introduction | 32 |
| 2.3 Chemistry | 37 |
| 2.4 Effects of modified peptides on PGF ₂ α -induced contraction in mice myometrium | 43 |
| 2.5 Conclusion | 47 |
| 2.6 Experimental section | 48 |
| 2.7 References | 65 |
| 2.8 Contribution des co-auteurs | 70 |

Chapitre 3 : Conclusion

| | |
|--------------------|----|
| 3.1 Travaux futurs | 72 |
| 3.2 Conclusions | 76 |
| 3.3 Références | 81 |

Annexe

| | |
|-----------------------|----|
| Étude de modélisation | 82 |
|-----------------------|----|

Liste des figures

Chapitre 1

- Figure 1.** : Mappemonde indiquant le pourcentage de naissances prématurées. 3
- Figure 2.** Agents tocolytiques couramment utilisés. 6
- Figure 3.** Prostaglandine F2 α , le ligand orthostérique naturel des récepteurs FP. 10
- Figure 4.** Représentations du récepteur FP. 11
- Figure 5.** Mécanisme d'inhibition allostérique. 12
- Figure 6.** Structure du PDC-31. 14
- Figure 7.** Chaîne polyéthylène glycol. 15
- Figure 8.** Structure du groupement prényle. 17

Chapitre 2

- Figure 1.** Calculated LogP of different peptides in relation to the number of heavy atoms (carbon or oxygen) in their grafts. 36

Figure 2. Effect of L- and D-*N*-dodecanyl peptides L- and D-**5b** (A L-**5b** and B D-**5d**) on PGF2 α induced contractions in postpartum mice myometrium.

44

Figure 3. Effect and f-test values of a second batch of L-dodecanyl peptide **5b** on PGF2 α induced contractions in postpartum mice myometrium.

44

Figure 4. Effect on PEG-grafted peptide **5d** (A) and farnysyl peptide **8** (B) on PGF2 α induced contractions in postpartum mice myometrium.

45

Figure 5. Effect of L-*N*-Hexyl peptide **5a** (A) and L-*N*-Octadecanyle peptide **5c** (B) on PGF2 α induced contractions in postpartum mice myometrium.

46

Chapitre 3

Figure 1. Comportement amphiphile des peptides alkylés.

74

Figure 2. Peptide **5b** dans un mélange eau :acétonitrile.

75

Liste des schémas

Chapitre 1

Schéma 1. Alkylation sur support solide par amination réductrice. 19

Schéma 2. Alkylation sur support solide par réaction de Mitsunobu entre un alcool et l'amine terminale protégée par un groupement *o*NBS. 21

Schéma 3. Réarrangement de type « Smiles » menant à la perte du groupement SO₂. 22

Chapitre 2

Scheme 1. Structure of PDC-31 (D-1). 37

Scheme 2. Synthesis of *N*-alkyl and *N*-PEG grafted peptides **5**. 38

Scheme 3. Synthesis of farnesylated peptide **8**. 40

Scheme 4. Loss of SO₂ by Smiles rearrangement. 41

Chapitre 3

Schéma 1. Mécanisme de bisalkylation passant par l'intermédiaire iminium.

Liste des tableaux

Chapitre 2

Table 1. Peptides purity and characterization data. 42

Chapitre 3

Tableau 1. Peptides synthétisés et méthode de synthèse 77

Liste des abréviations

| | |
|-------------------|--------------------------------------|
| Boc | <i>Tert</i> -butyloxycarbonyle |
| <i>t</i> Bu | <i>Tert</i> -butyle |
| °C | Degré Celcius |
| Calc | <i>Calculated</i> |
| CDCl ₃ | Chloroforme deutéré |
| CTC | Chlorure de 2-chlorotriptyl |
| Cx43 | Connexines 43 |
| DBU | 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène |
| DCM | Dichloromethane |
| DIAD | Diisopropylazodicarboxylate |
| DIEA | Diisopropyléthylamine |
| DMF | Diméthylformamide |
| DMSO | Diméthylsulfoxyde |
| Fmoc | Fluorénylméthoxyloxycarbonyle |
| FP | Récepteur prostaglandine F2 α |
| g | Gramme |
| GPCR | <i>G protein coupled receptor</i> |

| | |
|---------------------|--|
| HBTU | <i>N,N,N',N'</i> -tetraméthyl- <i>O</i> -(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate |
| Hz | Hertz |
| LC-MS | <i>Liquid chromatography-mass spectroscopy</i> |
| MeCN | Acétonitrile |
| mg | Milligramme |
| min | Minutes |
| mL | Millilitre |
| mmol | Millimole |
| NaCNBH ₃ | Cyanoborohydrure de sodium |
| NAM | <i>Negative allosteric modulator</i> |
| NMR | <i>Nuclear magnetic resonance</i> |
| OC | Récepteurs de l'ocytocine |
| <i>o</i> NBS | <i>ortho</i> -nitrobenzènesulfonyle |
| PAM | <i>Positive allosteric modulator</i> |
| PCC | Chlorochromate de pyridinium |
| PEG | Polyéthylène glycol |
| PGF2 α | Prostaglandine F2 α |
| PPh ₃ | Triphénylphosphine |

| | |
|---------|---|
| ppm | Partie par million |
| RP-HPLC | <i>Reverse-phase high performance liquid chromatography</i> |
| Rt | <i>Room temperature</i> |
| SPPS | <i>Solid phase peptide synthesis</i> |
| TES | Triéthylsilane |
| TFA | Acide trifluoroacétique |
| THF | Tetrahydrofurane |
| Trt | Trityle |
| μL | Microlitre |

Remerciements

Je voudrais en premier lieu remercier le professeur William D. Lubell qui m'a permis de faire mes études de maîtrise, sous sa tutelle, au sein de son groupe. Son dévouement envers la science s'est avéré une source d'inspiration tout au long de mon cheminement.

Je tiens aussi à remercier tous les membres du groupe pour leur appui et support. Je tiens particulièrement à remercier la docteure Carine Bourguet pour son aide précieuse lors de la rédaction et pour sa lecture attentive du manuscrit.

Je voudrais aussi remercier le Docteur Tarek Kassem pour m'avoir initié à la chimie peptidique et pour ses conseils en mon début de parcours. Merci aussi à Mildred Bien-Aimée pour son rôle dans le soutien administratif du groupe.

Je remercie aussi toute l'équipe du laboratoire de spectrométrie de masse de l'Université de Montréal pour leur soutien et leurs conseils.

Comme ce projet a nécessité l'utilisation quasi hebdomadaire du laboratoire de chimie combinatoire de l'Université de Montréal, je tiens à remercier Fabrice Galaud pour son aide avec le synthétiseur de peptides et pour son support tout au long du projet.

Je tiens finalement à remercier ma famille; ma sœur, Amélie, et ma mère, Lucie, dont le support a été précieux, ainsi que mon père, le docteur Marc-André Poupart, avec qui les nombreuses discussions sur la chimie ont su me motiver et m'inspirer.

Chapitre 1

Introduction

1.1 : La problématique des accouchements prématurés

Les accouchements prématurés sont définis comme des naissances survenant avant la 37^{ième} semaine de gestation, et posent de nombreux problèmes à la fois à la mère et à l'enfant.

Le risque de mortalité infantile et néonatale est significativement augmenté à mesure que l'âge gestationnel diminue.¹ Par exemple, le taux de survie des enfants nés à seulement 24 semaines de gestation est d'environ 50%.²

De plus, les survivants sont susceptibles de souffrir de plusieurs retards développementaux, hypothéquant grandement leur développement et leur fonctionnement tout au long de leur vie.³ Par exemple, ces enfants peuvent souffrir, de problèmes visuels allant de la myopie sévère à la cécité complète (25% des chances chez les grands prématurés),⁴ de problèmes auditifs,⁵ de problèmes respiratoires⁶ et de problèmes cognitifs et développementaux.^{3, 7}

Comme plusieurs enfants devront vivre avec des handicaps, les accouchements prématurés ont été le diagnostic le plus coûteux par patient aux États-Unis en 2012⁸, ce qui démontre bien à quel point il s'agit d'un problème majeur dans les pays développés.

De plus, la quantité de naissance prématurées est en augmentation dans le monde, en particulier aux États-Unis⁹.

Même si la problématique des accouchements prématurés pose un défi de taille aux pays développés, ce sont les pays en voie de développement qui sont les plus touchés³.

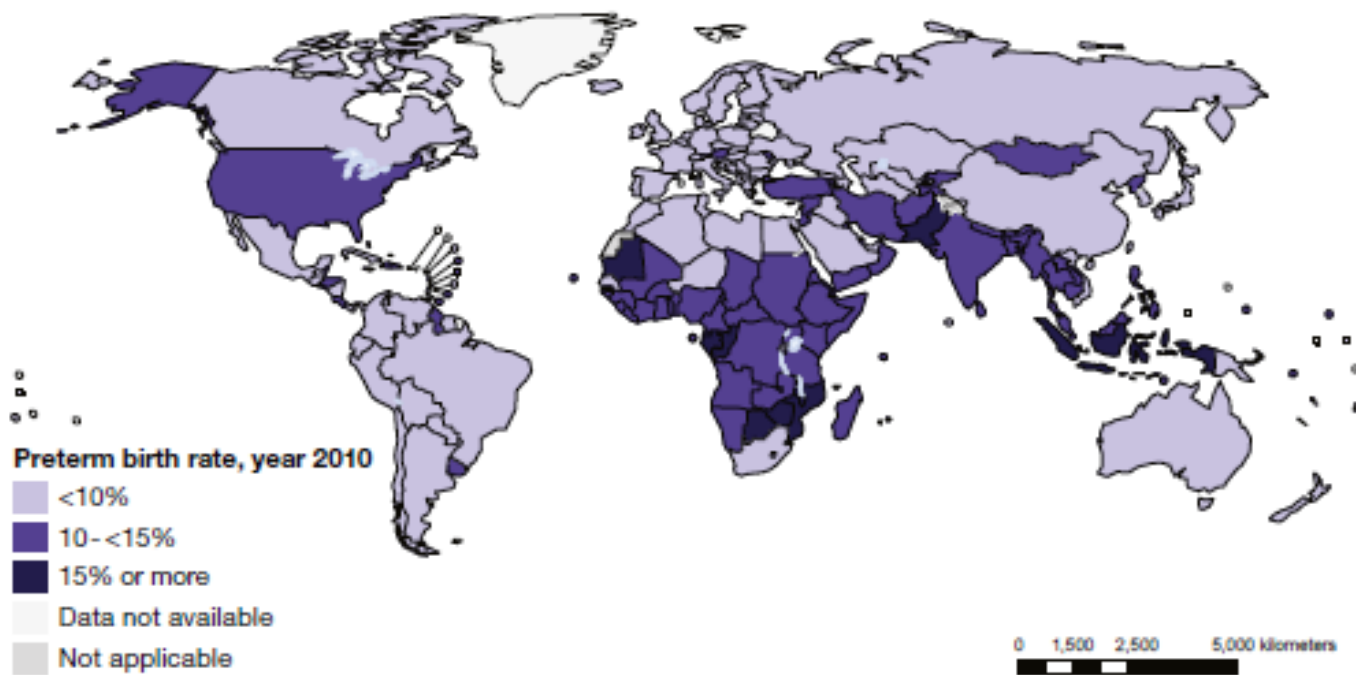


Figure 1: Mappemonde indiquant le pourcentage de naissances prématurées.³

En effet, plus de 60 % des naissances prématurées se produisent en Afrique subsaharienne et au sud de l'Asie³. Pour la majorité de ces pays, qui n'ont pas en place le système de santé approprié et qui n'ont pas les ressources nécessaires pour encadrer correctement les patientes, la mortalité infantile des bébés prématurés est très élevée. En fait, seuls 10 % des grands prématurés (âge gestationnel de moins de 28 semaines) survivent, alors que ce pourcentage est d'environ 90% dans les pays développés³.

Il existe de nombreux facteurs de risques d'avoir un accouchement prématuré, et plusieurs d'entre eux expliquent, du moins en partie, la prépondérance de la problématique dans les pays en voie de développement. En effet, les grossesses pendant l'adolescence, avoir de

nombreuses grossesses rapprochées, souffrir de déficiences chroniques en certains nutriments et souffrir de la faim (déficit calorique), être atteinte d'infections sexuellement transmissibles (SIDA, syphilis, etc...) et souffrir de détresse psychologique sont tous des facteurs pouvant favoriser une situation d'accouchements prématuré. Il est à noter que certains facteurs de risques sont aussi plutôt associés aux pays développés, comme l'obésité et la consommation de la cigarette.³

Récemment, il a été découvert que le fait d'être née prématurément était l'un des plus important facteurs de risques d'avoir soi-même un accouchement prématuré, non pas par un mécanisme génétique, mais par un mécanisme épigénétique. Le stress causé par la naissance prématurée entrainerait la méthylation de certains gènes clefs.¹⁰

1.2 : Traitement des contractions prématurées

Les agents pouvant retarder l'accouchement en réduisant l'intensité des contractions utérines et prolongeant la gestation sont appelés tocolytiques. Il existe présentement un seul médicament approuvé uniquement pour prévenir les accouchements prématurés, et plusieurs autres composés sont utilisés « hors indication » (off-label). En pratique, les différents traitements utilisés sont un antagoniste du récepteur de l'ocytocine (Atosiban)¹¹, les bloqueurs de canaux calciques (Nifedipine, Nimodipine)¹², les agonistes β 2-adrénergiques (Ritodrine, Terbutaline)¹³, un inhibiteur de la chaîne légère de la myosine (sulfate de magnésium)¹⁴ et les inhibiteurs de l'enzyme prostaglandine-endoperoxydase synthase 2 (COX-2) (Idométhacine),^{15,16} (Voir figure 2).

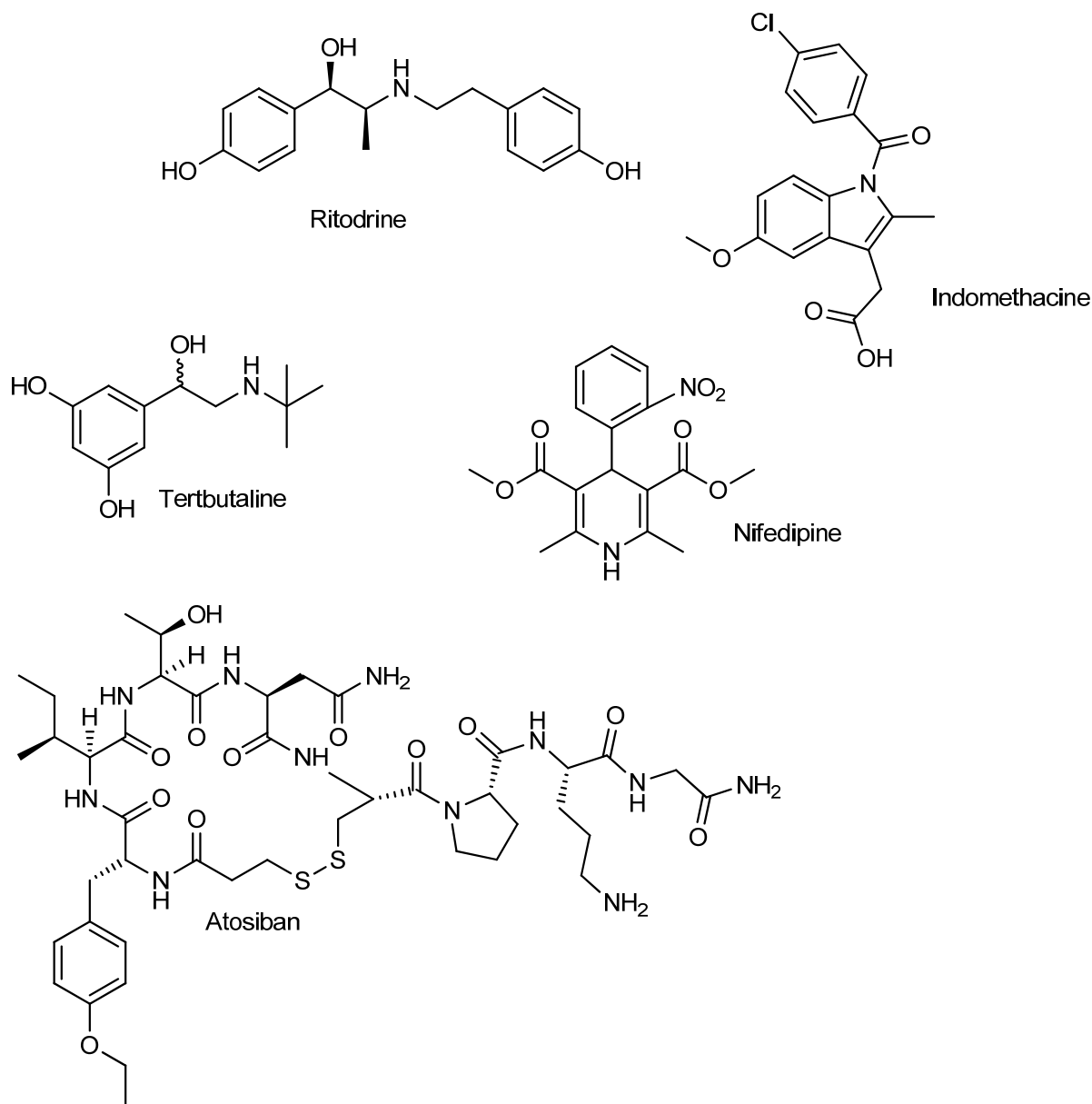


Figure 2: Agents tocolytiques couramment utilisés

Toutefois, dans plusieurs cas, leur utilisation demeure controversée.¹⁷ En effet, il est rare que l'accouchement soit retardé de plus de 48h,¹⁸ et la gestation n'est normalement pas prolongée.¹⁷ Bien que court, ce délai entre l'apparition des premières contractions et l'accouchement peut toutefois s'avérer précieux car il peut permettre à ces femmes d'être transférées dans un établissement approprié. Dans les cas où le développement du système

respiratoire de l'enfant est à risque, ce délai peut aussi permettre aux glucocorticoïdes de faire leur action et d'accélérer le développement des voies respiratoire.¹⁹

Néanmoins, l'utilisation de tocolytiques est susceptible de causer des effets secondaires à la fois au fœtus et à la mère. L'utilisation de tocolytiques est associée chez l'enfant, notamment, à de la mortalité infantile, des cas de maladie des membranes hyalines et des hémorragies intraventriculaires.¹⁷ Pour la mère, les effets secondaires peuvent aller de simples palpitations et migraines jusqu'au décès dans les cas les plus sévères.²⁰

Plus spécifiquement, les agonistes β 2-adrénergiques (Ritodrine, Terbutaline) sont associés à des effets secondaires cardiovasculaires comme des palpitations, un risque accru d'ischémie myocardique, d'arythmie et d'œdèmes pulmonaires.¹³ Ils sont administrés dès les premières contractions et nécessitent un suivi serré.

Le sulfate de magnésium, un inhibiteur de la chaîne légère de la myosine, a montré une efficacité comparable à la Terbutaline et présente un meilleur profil de tolérance.²¹ Son utilisation est toutefois associée à des arrêts cardiaques et de la détresse respiratoire.¹³ De plus, comme le sulfate de magnésium traverse la barrière placentaire, il peut entraîner de la dépression respiratoire et motrice potentiellement fatales chez l'enfant, ce qui a mené à son interdiction en Europe.²¹

L'idométhacine et autres anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) sont aujourd'hui rarement utilisés dans les pays industrialisés à cause des risques d'insuffisance rénale chez le fœtus pouvant mener au décès infantile, en plus des risques d'effets négatifs chez la mère.²²

L'Atosiban, un antagoniste de l'ocytocine, est plus sélectif et entraîne moins d'effets secondaires. Il ne permet toutefois pas de prévenir l'hypotension artérielle, et ne permet donc

pas de diminuer le niveau de monitoring nécessaire,²³ et son utilisation est limitée par plusieurs facteurs.²⁴ L'Atosiban est malgré tout une alternative de traitement résultant en de plus faibles coûts hospitaliers quand on le compare aux agonistes β 2-adrénergiques.²⁵

Finalement, les inhibiteurs de canaux calciques (Nifedipine) sont parfois considérés comme présentant le meilleur rapport bénéfice/risque,²⁶ pouvant retarder l'accouchement de 2 à 7 jours.¹² Certaines conditions propre à la mère peuvent toutefois limiter leur utilisation, comme l'hypotension ou la dysfonction hépatique.¹²

Lorsque comparée à l'Atosiban, la Nifedipine s'est montrée aussi efficace à retarder l'accouchement pour 48 h, mais était associée à plus d'effets secondaires chez la mère.²⁷ Une autre étude comparative a conclu que la Nifedipine était associée à un plus grand prolongement de la gestation, mais que l'Atosiban était plus fiable pour retarder les contractions pour 48 h.²⁸

1.3 : Le récepteur Prostaglandine F2 α

Le récepteur Prostaglandine F2 α (FP) joue un rôle essentiel dans le processus de parturition. En effet, l'expression de ce récepteur augmente au début et pendant l'accouchement.²⁹

Selon de récentes études, les contractions sont initiées par le relâchement de l'ocytocine, qui se lie à son propre récepteur, le récepteur transmembranaire couplé à une protéine G Ocytocine (OT). Cette activation du récepteur OT cause une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca²⁺, qui est responsable de l'augmentation de l'activité des enzymes kinases de la chaîne légère de la myosine. Ces enzymes déclenchent les contractions en causant l'activation des protéines associées à la contraction (*contraction-associated proteins*, CAP). L'étirement du myomètre est responsable de l'augmentation des jonctions gap, jonctions formées de six molécules transmembranaires associées en nexus, formées des protéines connexine 43 (Cx43). Il entraîne aussi une surexpression des récepteurs OT et FP.³⁰

Il a aussi été démontré que les souris K.-O. pour le gène menant à l'expression du récepteur FP (« *FP knockout mice* »), soit des lignées de souris n'exprimant pas ce récepteur, n'étaient pas capable d'accoucher naturellement, même après induction par la prostaglandine F2 α et l'ocytocine.³¹ Ce n'est toutefois pas le cas pour les souris K.-O. pour le gène menant à l'expression du récepteur OT.³¹

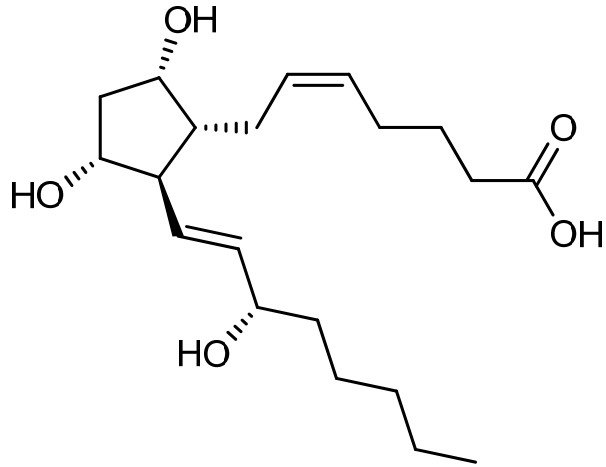


Figure 3: Prostaglandine F2 α , le ligand orthostérique naturel des récepteurs FP.

Le récepteur FP est un récepteur transmembranaire appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Il comporte 7 hélices alpha transmembranaires, en plus d'un domaine extracellulaire *N*-terminal et d'un domaine cytosolique *C*-terminal.

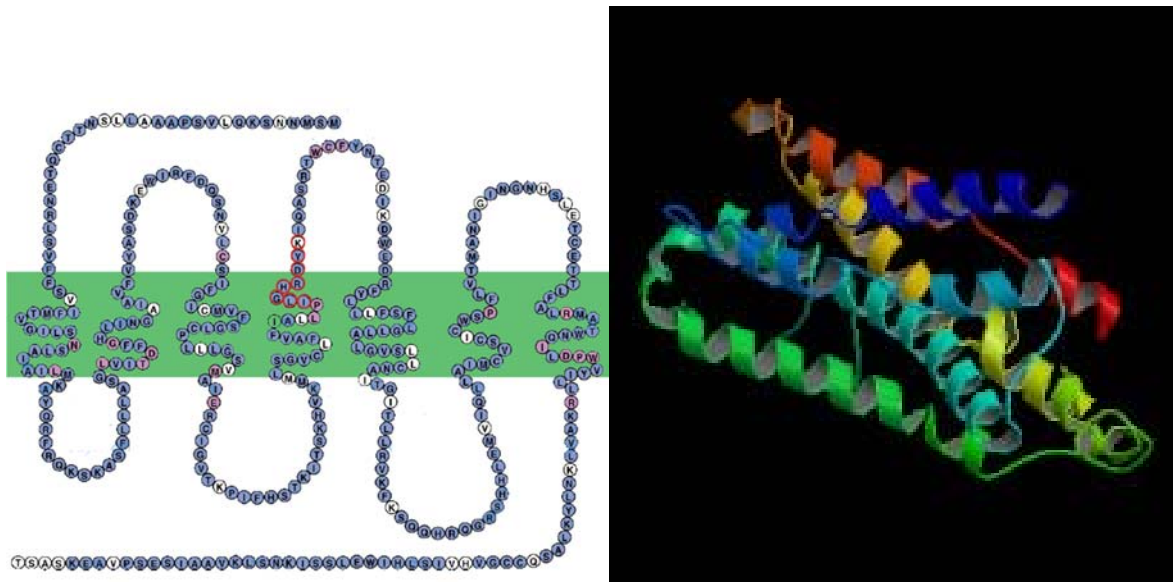


Figure 4: a) Représentation schématique du récepteur Prostaglandine F2 α humain³² (gauche)
 b) Représentation en rubans du récepteur Prostaglandine F2 α humain³³ (droite).

Les récepteurs couplés à des protéines G représentent la plus large classe de récepteurs membranaires dans les cellules eucaryotes et peuvent accommoder une large variété de substrats naturels.³⁴ Des efforts ont récemment été entrepris pour développer des effecteurs allostériques de ce type de récepteurs, autrement dit qui exercent leur action à un site distinct du ligand orthostérique naturel.

Cette approche permet de développer des drogues ayant une meilleure spécificité et des profils d'effets secondaires plus favorables. De plus, en se liant à un site topologiquement distinct du ligand naturel, ils n'exercent leur effet d'antagoniste qu'en présence d'une stimulation accrue du récepteur par le ligand naturel, ce qui contribue à réduire le risque d'effet secondaire.³⁴

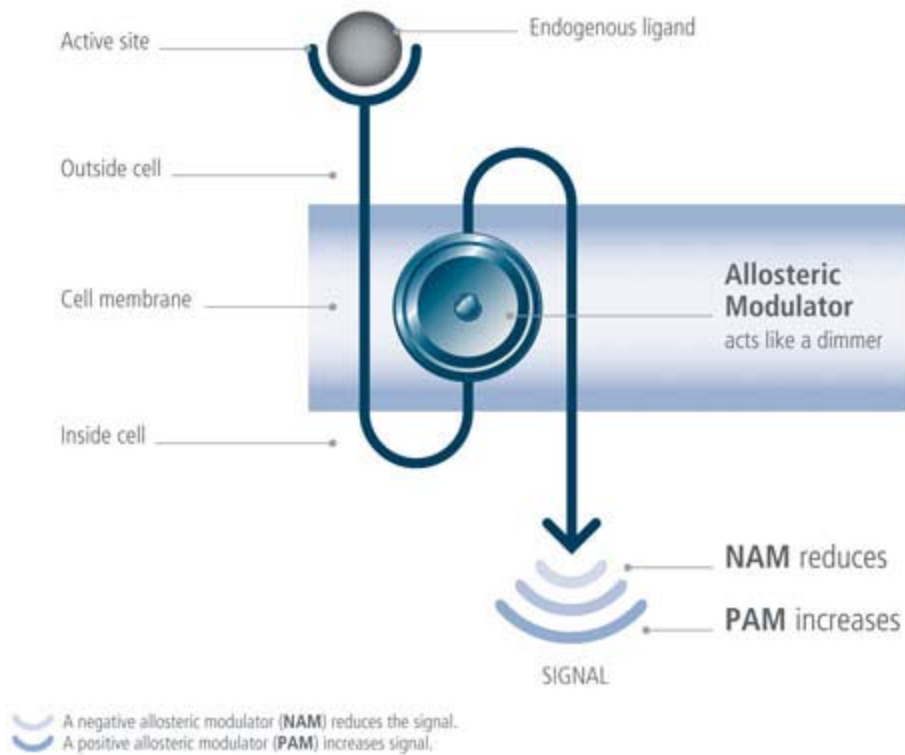


Figure 5: Mécanisme d'inhibition allostérique.³⁵

Le ligand allostérique n'exclut pas nécessairement le ligand naturel du site orthostérique, mais modifie la façon dont ce dernier affecte le récepteur, produisant une réponse différente. Dans le cas d'un inhibiteur allostérique, il y a une diminution (inhibition) de la réponse associée au ligand naturel.³⁴

La spécificité de la cible affecte aussi grandement le profil d'effets secondaires d'une drogue.

Le tocolytique considéré comme ayant le meilleur profil d'effets secondaires est l'Atosiban, qui justement cible des récepteurs propres aux cellules myométriales.^{11, 16, 27-28}

En effet, la majeure partie des effets secondaires des tocolytiques présentement utilisés cliniquement sont due au fait qu'ils ciblent des récepteurs qui ne sont pas spécifiques au myomètre.²⁰ Par exemple, les médicaments bêtamimétiques, comme la Terbutaline et le Sulbutamol, causent de nombreux effets secondaires cardiovasculaires en raison de la présence de nombreux récepteurs adrénérgiques dans le tissu cardiaque.³⁶

1.4 : Inhibiteurs connus

Un composé, le PDC-31,³² vient de compléter avec succès la phase d'essais cliniques 1B, et est prêt à commencer la phase 2 (PDC Biotech GmbH; Q4-Q2 2010-11, www.pdcbiotech.com).

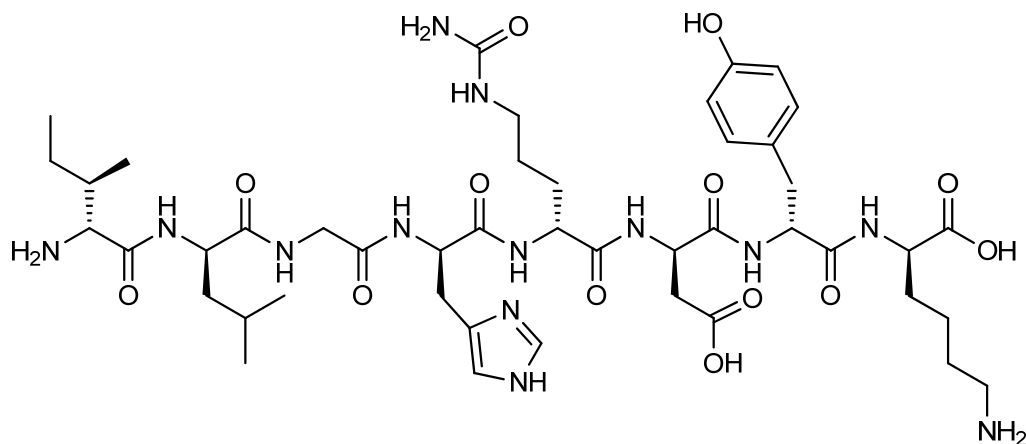


Figure 6: Structure du PDC-31³²

Cet agent agit comme inhibiteur allostérique des récepteurs FP. Il fut développé par le groupe Lubell en collaboration avec le professeur Sylvain Chemtob.

Des études ont précédemment démontré l'importance de la deuxième boucle extracellulaire des récepteurs couplés aux protéines G pour la liaison avec le ligand.³⁷ En se basant sur la séquence connue de la deuxième boucle extracellulaire des récepteurs FP, plusieurs peptides ont été testés dans différents essais pour mesurer leur potentiel d'agir comme inhibiteurs. Un des peptides, ayant la séquence ilGhrdyk-OH (les lettres minuscules font référence aux acides aminés de configuration D) s'est avéré le plus actif. Le remplacement de l'arginine par une citrulline a entraîné un gain d'activité et a mené au PDC-31.³²

Il s'agit d'un peptide linéaire de huit acides aminés. Pour bénéficier d'une stabilité métabolique accrue, il est composé d'acides aminés de configuration D, ce qui implique des coûts de production élevés si le produit est approuvé pour commercialisation.

De plus, la voie d'administration utilisée pour ce peptide est la voie parentérale, ce qui limite son potentiel de développement en tant que drogue préventive.

Le développement d'un analogue L de ce peptide, portant une modification permettant d'en augmenter la résistance métabolique et facilement accessible par chimie sur support solide, serait une avancée considérable vers le développement d'un tocolytique efficace, abordable, et potentiellement administrable par des voies alternatives.

1.5 : PEGylation

La technique de PEGylation, qui consiste à attacher une chaîne polyéthylène glycol de longueur variable à une protéine ou un peptide d'intérêt biologique, est couramment utilisée pour augmenter la stabilité métabolique des drogues peptidiques.

En plus de ralentir la dégradation métabolique, les chaînes PEG permettent d'augmenter l'hydrophilicité et de réduire la réponse immunitaire.³⁸

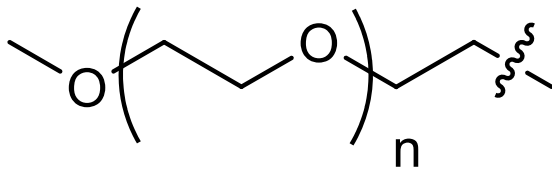


Figure 7: Chaîne polyéthylène glycol

Cette approche est couramment utilisée, et le nombre de composés PEGylés au stade de développement clinique atteignait 500 en 2000.³⁹ Plusieurs produits commerciaux sont PEGylés, notamment le Somavert©, un analogue PEGylé d'un antagoniste du récepteur de l'hormone de croissance utilisé dans le traitement de l'acromégalie,⁴⁰ et le Pegasys©, un analogue PEGylé de l'interféron $\alpha 2a$ sur le marché depuis 2002.⁴¹

Dans la majorité des cas, les protéines sont PEGylés de manière aléatoires en utilisant une distribution statistique de chaînes polyéthylène glycol. Typiquement, les chaînes sont ajoutées soit par une liaison ester (liaison clivable dans les conditions biologiques), soit par une liaison alkyle (stables en milieu biologique).⁴²

La PEGylation sur un site spécifique de peptides ramifiés possédant une activité antimicrobienne a résulté en une stabilité protéolytique supérieure.⁴³

La PEGylation sur un site spécifique de petits peptides en utilisant de courtes chaînes polyéthylène glycol linéaire de longueurs spécifiques directement couplée en *N*-terminal n'a toutefois pas été rapporté, au meilleur de mes connaissances.

1.6: Lipidation

La lipidation est une autre technique couramment utilisée pour accroître la stabilité métabolique des drogues peptidiques, en plus d'accroître leur lipophilicité (LogP).⁴⁴

En plus d'un effet de protection contre l'activité protéolytique, la présence d'une chaîne alkyle peut permettre l'association avec les membranes plasmiques.⁴⁵

Des peptides de petite taille (5-13 acides aminés) portant des chaînes alkyles de différentes longueurs liées par une liaison de type ester ont été rapportés comme ayant une meilleure spécificité et une meilleure affinité pour leur récepteur, en plus d'être plus résistants à la dégradation métabolique et d'avoir une plus longue durée d'action.^{44b, 46} La présence d'une chaîne trop longue menait toutefois à l'obtention de molécules moins actives agissant beaucoup plus lentement que leur contrepartie non-alkylée ou alkylée avec de plus petite chaînes, probablement en raison du gain de lipophilicité.^{41b, 43}

Il a aussi été suggéré que l'ajout d'une chaîne lipidique s'ancrant à la membrane plasmique pouvait induire un meilleur repliement de la portion peptidique ce qui faciliterait l'adoption d'une conformation active.⁴⁷

1.7 Prénylation

La prénylation, soit l'addition d'une unité isoprényle (5 carbones), géranyle (10 carbones), farnesylyle (15 carbones) ou geranylgeranyl (20 carbones), est une importante modification post traductionnelle des peptides et protéines. La majorité des peptides et protéines prénylés sont destinés à s'ancrer dans la membrane plasmique par leur unité prényle.⁴⁸

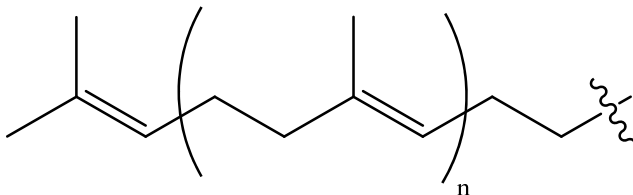


Figure 8: Structure du groupement prényle.

La prénylation s'effectue par l'action de prényl transférases. Par exemple, l'enzyme farnesyle transférase transfère un groupement farnesyle aux peptides et protéines. Plusieurs exemples de prénylflavonoïdes naturels, de petites molécules de type flavonoïdes portant un groupement prényle, ont été identifiés et leurs activités biologiques sont attribuables à leur association aux membranes plasmiques de par leur unité prényle.⁴⁹

En raison de l'importance des molécules associées aux membranes plasmiques dans la reconnaissance cellulaire et dans le cycle de vie général des cellules, la perturbation des voies de prénylation jouent un rôle dans plusieurs types de maladies prolifératives comme les cancers.⁵⁰

1.8 : Étude de modélisation

Dans le but d'étudier l'impact des différentes modifications envisagées sur la lipophilicité du peptide d'intérêt, une série de composés ont été modélisés à partir du logiciel HyperChem 8.⁵¹ Ces différentes valeurs ont été portées en graphique (voir chapitre 2, figure 1).

Le fait d'ajouter des chaînes lipidiques de plus en plus volumineuses a entraîné une augmentation linéaire de la lipophilicité prédite. Pour cette raison, des chaînes de 3, 6, 12 et 18 carbones ont été choisies.

L'ajout de petites chaînes de polyéthylène glycol s'est avéré avoir un impact relativement faible sur l'hydrophilicité du peptide. Il faut dire que celui-ci est déjà considérablement hydrophile en raison de la présence de plusieurs résidus chargés. Dans le but d'offrir une comparaison avec les chaînes lipidiques choisies, en raison de la difficulté d'obtenir des réactifs

purs de PEG monométhyl éther de longueurs discrètes de plus de 4 unités PEG, une chaîne de PEG₄ fut sélectionnée.

L'addition d'une chaîne farnesyle (15 carbones) permettait d'obtenir un produit final ayant une lipophilicité comparable au peptide possédant une chaîne de 12 carbones.

Dans tous les cas, la structure minimisée des peptides portant des groupements alkyles était superposable à la structure du peptide libre, ce qui indique que l'alkylation ne change pas la conformation préférentielle de la molécule (voir annexe 2 et annexe 3).

1.9 : Méthodologies

1.9.1 : Amination réductrice

Dans le cas de composés pouvant former des aldéhydes stables et réactifs, la réaction d'amination réductrice sur support solide semble la plus versatile et économique en terme d'étapes synthétiques.^{38b}

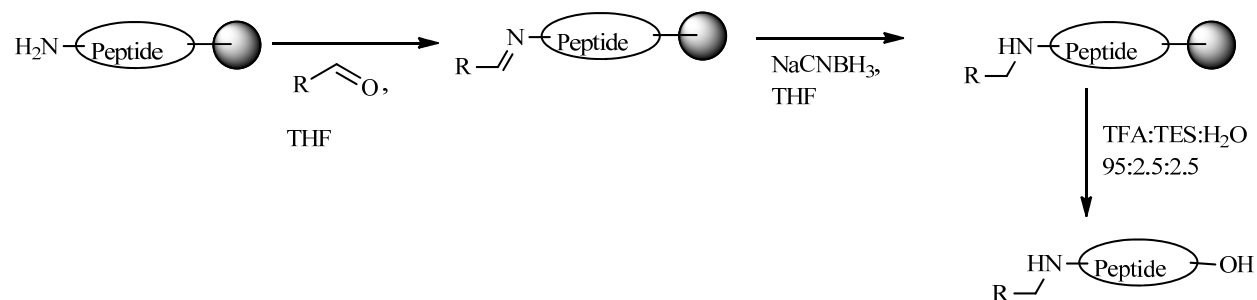


Schéma 1: Alkylation sur support solide par amination réductrice.

Après oxidation de l'alcool précurseur par différentes méthodes, notamment une variation de l'oxidation de Swern,⁵² l'aldéhyde est simplement mis en contact avec la résine portant l'amine terminale déprotégée. Une fois l'imine formée, l'excès d'aldéhyde est retiré par lavage de la résine et l'imine est réduite avec du cyanoborohydrure de sodium. Le clivage déprotecteur permet d'obtenir le peptide alkylé.

1.9.2 : Réaction de Mitsunobu avec une amine portant un groupement nitrobenzènesulfonyle

Dans le cas où l'aldéhyde formé ne présente pas la réactivité voulue, comme dans le cas du farnesol, où l'aldéhyde conjugué mènerait à l'obtention d'une imine conjuguée qui ne pourrait être réduite avec un réactif de type borohydrure, une autre méthode a dû être employée.

La protection de l'amine terminale au moyen d'un groupement *ortho* nitrobenzènesulfonyle (*o*NBS) rend son proton restant suffisamment acide pour qu'elle prenne part à une réaction de Mitsunobu avec l'alcool, dans ce cas le farnesol.⁵³

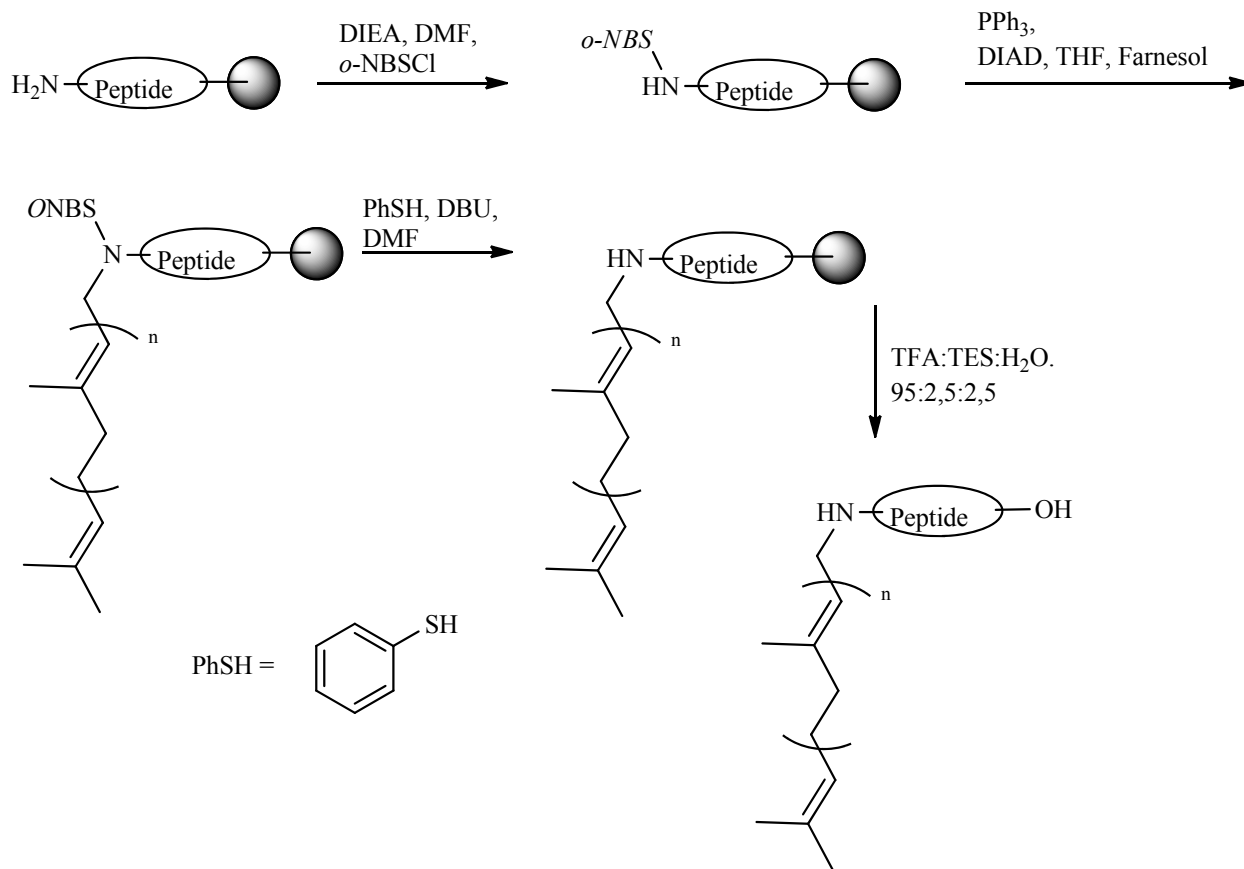


Schéma 2: Alkylation sur support solide par réaction de Mitsunobu entre un alcool et l'amine terminale protégée par un groupement oNBS.

Après clivage du groupement *o*NBS par le thiophénol⁵⁴ et clivage déprotectif, on obtient le peptide alkylé.

L'utilisation du groupement dinitrobenzènesulfonyl (DNBS) dans les réactions de Mitsunobu a été rapportée comme étant une alternative plus efficace au groupement *o*NBS. Toutefois, un réarrangement de type « Smiles » peut mener à la perte d'une molécule de SO₂.⁵⁵

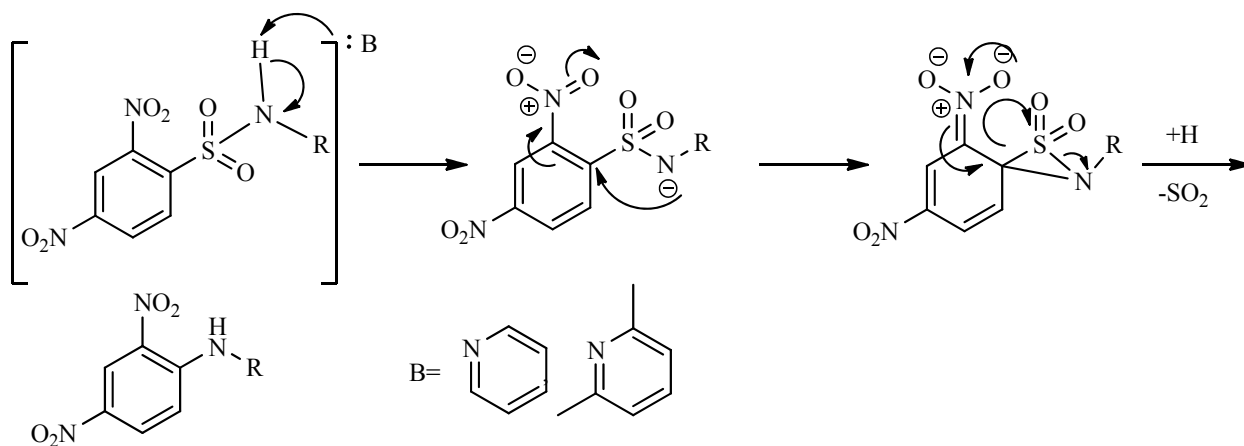


Schéma 3: Réarrangement de type "Smiles" menant à la perte du groupement SO₂.

La substitution de la pyridine pour la lutidine est supposée enrayer cette réaction parasite dans certains cas. Toutefois, il appert que, pour certaines structures, cette réaction parasite sera la seule qui est observée.⁵⁶ Après plusieurs essais infructueux avec le groupement DNBS, celui-ci fut substitué par le groupement *o*NBS (voir chapitre 2).

1.10: Références

1. Costeloe, K. L.; Henessy, E. M.; Haider, S.; Stacey, F.; Marlow, N.; Draper, E. S., Short term outcomes after extreme preterm birth in England: comparison of two birth cohorts in 1995 and 2006 (the EPICure studies). *B.M.J.* **2012**, *345*, e7976.
2. Russell, R. B. G., N. S.; Steiner, C. A.; Meikle, S.; Howse,os, Marie-Christine; J. L.; Poschman, K.; Dias, T.; Potetz, L.; Davidoff, M. J.; Damus, K.;Petrini, J. R, Cost of hospitalization for preterm and low birth weight in infants in the United States. **2007**, (120), E1-E9.
3. *March of Dimes, PMNCH, Save the Children, WHO. Born Too Soon: The Global Action Report on Preterm Birth.* Eds CP, Howson, MV Kinney, JE Lawn. World Health Organization. Geneva, 2012.
4. O'Connor, A. R. W., C.M.; Fielder, A.R., Ophthalmological problems associated with preterm birth. *Eye* **2007**, *21*, 1254-1260.
5. Marlow, M. W., D.; Bracelwell, M.A.; Samara, M., Neurologic and developmental disability at six years of age after extremely preterm birth. *New Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 9-19.
6. Greenough, A., Long term respiratory outcomes of very premature birth (<32 weeks). *Semin. Fetal Neonatal. Med.* **2012**, *17*, 73-76.
7. Hagberg, B.; Hagberg, G.; Beckhung, E.; Uvebrant, P., Changing panorama of cerebral palsy in Sweden. VIII. Prevalence and origin in the birth year period 1991-94. *Acta. Paediatr.* **2001**, *90*, 1-277.
8. Morken, N. H., Preterm birth: new data on a global health priority. *The Lancet* **2012**, *379*, 2128-2130.
9. Blencowe H, C. S., Oestergaard M, Chou D, Moller AB, Narwal R, Adler A, Garcia CV, Rohde S, Say L, Lawn JE, National, regional and worldwide estimates of preterm birth. *The Lancet* **2012**, *379*, 2162-2172.
10. Mitchell, C. M.; Sykes, S. D.; Pan, X.; Pringle, K. G.; Lumbers, E. R.; Hirst, J. J.; Zakar, T., Inflammatory and steroid receptor gene methylation in the human amnion and decidua. *J. Mol. Endocrinol.* **2013**, *50* (2), 267-77.
11. Papatsonis, D. F., V.; Cole, S.; Liley, H., Oxytocin receptor antagonists for inhibiting preterm labour. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2005**, *CD004452*.

12. King, J. F. F., V.; Papatsonis, D.; Dekker, G.; Carbonne, B., Calcium channel blockers for inhibiting preterm labour; a systematic review of the evidence and a protocol for administration of nifedipine. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.* **2003**, *43*, 192-198.
13. Anotayanonth, S. S., N. V.; Garner, P.; Neilson, J. P.; Harigopal, S., Betamimetics for inhibiting preterm labour. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2004**, *CD004352*.
14. Crowther CA, H. J., Doyle LW Magnesium sulphate for preventing preterm birth in threatened preterm labour. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2002**, *CD001060*.
15. Loudon, J. A. Z. G., K.A.; Bennett, P.R., Prostaglandin inhibitors in preterm labour. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **2003**, *17*, 731-744.
16. van Vliet, E. O. G.; Boormans, E. M.; de Lange, T. S.; Mol, B. W.; Oudijk, M. A., Preterm labor: current pharmacotherapy options for tocolysis. *Exp. Opin. Pharmacother.* **2014**, *15*, 787-797.
17. Tan, T. C.; Davendra, K.; Tan, L. K.; Tan, H. K., Tocolytic treatment for the management of preterm labour: a systematic review. *Singapore Med. J.* **2006**, *47*, 361-366.
18. Haas, D. M. I., T. F.; Kirkpatrick, P. R.; Klein, R. W.; Zollinger, T. W.; Golichowski, A. M., Tocolytic Therapy: a meta-analysis and decision analysis. *Obstet. Gynecol.* **2009**, *113*, 585-594.
19. Crowley, P., Prophylactic corticosteroids for preterm birth. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2006**, (3), CD000065.
20. Hill, W. C., Risks and complication of tocolysis. *Clin. Obstet. Gynecol.* **1995**, *38*, 725-745.
21. Mittendorf, R.; Covert, R. B., J.; Khoshnood, B.; Lee, K. S.; Siegler, M., Is tocolytic magnesium sulphate associated with increased total paediatric mortality? . *Lancet* **1997**, *350*, 1517-1518.
22. Benini, D.; Fanos, V.; Cuzzolin, L.; Tato, L., In utero exposure to nonsteroidal anti-inflammatory drugs: neonatal renal failure. *Pediatric Nephrology* **2004**, *19*, 232-234.
23. Duchateau, F. X.; Max, A.; Harscoat, S.; Curac, S.; Ricard-Hibon, A.; Mantz, J., Comparison between atosiban and nicardipine in inducing hypotension during in-utero transfers for threatening premature delivery. . *Eur. J. Emergency Med.* **2010**, *17*, 142-145.

24. Goodwin, T. M.; Valenzuela, G.; Silver, H.; Hayashi, R.; Creasy, G. W.; Lane, R., Treatment of preterm labor with the oxytocin antagonist atosiban. *Am. J. Perinatology* **1996**, *13* (143-146).
25. Wex, J.; Connolly, M.; Rath, W., Atosiban versus betamimetics in the treatment of preterm labour in Germany: an economic evaluation. *BMC pregnancy childbirth* **2009**, *9*, 23.
26. Coomarasamy, A.; Knox, E. M.; Gee, H.; Song, F. J.; Khan, K. S., Effectiveness of nifedipine versus atosiban for tocolysis in preterm labour: a meta-analysis with an indirect comparison of randomised trials. *B. J. O. G.* **2003**, *110*, 1045-1049.
27. Kashanian, M.; Akbarian, A. R.; Soltanzadeh, M., Atosiban and nifedipin for the treatment of preterm labor. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* **2005**, *91* (1), 10-4.
28. Salim, R.; Garmi, G.; Cachum, Z.; Zafran, N.; Baram, S.; Shalev, E., Nifedipine compared with atosiban for treating preterm labor: a randomized controlled trial. *Obstet. Gynecol.* **2012**, *120*, 1323-1331.
29. (a) Olson, D. M., The role of prostaglandins in the initiation of parturition. *Best Pract. Res., Clin. Obstet. Gynaecol.* **2003**, *17*, 717-730; (b) Olson, D. M. Z., D.B.; Shallow, M.C.; Cook, J.L.; Mitchell, B.F.; Grigsby, P.; Hirst, J., Myometrial Activation and Preterm Labour: Evidence Supporting a Role for the Prostaglandin F Receptor - A review. *Placenta* **2003**, *17*, S47-S54.
30. Ivanisevic, M.; Djelmis, J.; Bukovic, D., Review on Prostaglandin and Oxytocin Activity in Preterm Labor. *Coll. Antropol.* **2001**, *2*, 687-694.
31. (a) Sugimoto, Y. S., D.; Tsuboi, K.; Ichikawa, A.; Narumiya, s., Female reproduction in mice lacking the prostaglandin F receptor. Roles of prostaglandin and oxytocin receptors in parturition. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1998**, *449*, 317-321; (b) Sugimoto, Y. Y., A.; Segi, E.; Tsuboi, K.; Aze, Y.; Nishimura, T.; Oida, H.; Yoshida, N.; Tanaka, T.; Katsuyama, M.; Hasumoto, K.; Murata, T.; Hirata, M.; Ushikubi, F.; Negishi, M.; Ichikawa, A.; Narumiya, S., Failure of parturition in mice lacking the prostaglandin F receptor. *Science* **1997**, *277*, 681-683.
32. (a) Peri, K. G. Q., C.; Hou, X.; Abran, D.; Varma, D. R.; Lubell, W. D.; Chemtob, S., THG113: a novel selective FP antagonist that delays preterm labor. *Semin. Perinatol.* **2002**, *26*, 389-397; (b) Peri, K. P., F.; Lubell, W.; Thouin, E.; Chemtob, S. Peptides and Peptidomimetics Useful for Inhibiting the Activity of Prostaglandin F2R Receptor. WO/2003/104266, 2003.

33. Human prostaglandin F2alpha receptor :
[http://www.cusabio.cn/product/ELISA_Kit/Human_Prostaglandin_F2-alpha_receptor\(PTGFR\)_ELISA_kit-98883.html](http://www.cusabio.cn/product/ELISA_Kit/Human_Prostaglandin_F2-alpha_receptor(PTGFR)_ELISA_kit-98883.html). (accessed 17-04-2014).
34. Conn, P. J.; Christopoulos, A.; Lindsley, C. W., Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders. *Nat. Rev. Drug Disc.* **2009**, *8* (1), 41-54.
35. Kerr, E., Refining GPCR Discovery Approaches. *Genetic Engineering & Biotechnology News* 2011.
36. Fitzpatrick, D.; Purves, D.; Augustine, G., In *Neuroscience*, Third ed. ed.; Sinauer: Sunderland, 2004; p Table 20.2.
37. (a) Shi, L.; Javitch, J. A., The binding site of aminergic G protein-coupled receptors: the transmembrane segments and second extracellular loop. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2002**, *42*, 437-467; (b) Peeters, M. C.; van Westen, G. J.; Li, Q.; AP, I. J., Importance of the extracellular loops in G protein-coupled receptors for ligand recognition and receptor activation. *Trends in pharmacol. Sci.* **2011**, *32* (1), 35-42.
38. (a) Gokarn, Y. R.; McLean, M.; Laue, T. M., Effect of PEGylation on protein hydrodynamics. *Mol. Pharm.* **2012**, *9* (4), 762-73; (b) Moosmann, A. B., J.; Lindner, R.; Muller, E.; Bottinger, H., Aldehyde PEGylation kinetics: a standard protein versus a pharmaceutically relevant single chain variable fragment. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22* (8), 1545-58; (c) Veronese, F. M. P., G., PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discov. Today* **2005**, *10* (21), 1451-1458.
39. Roberts, M. J. B., M.D.; Harris, J.M., Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Adv. Drug Del. Rev.* **2002**, *54*, 459-476.
40. Trainer, P. J. *e. a.*, Treatment of Acromegaly eith the Growth Hormone-Receptor Antagonist Pegvisomant. *N. Engl. J. Med.* **2000**, *342*, 1171-1177.
41. Bailon, P.; Palleroni, A.; Schaffer, C. A.; Spence, C. L.; Fung, W. J.; POrter, J. E.; Ehrlich, G. K.; Pan, W.; Xu, Z. X.; Modi, M. W.; Farid, A.; Berthold, W.; Graves, M., Rational design of a potent, long lasting form of interferon: a 40kDa branched poly-ethylene glycol-conjugated interferon alpha-2a for the treatment of hepatitis C. *Bioconjug. Chem.* **2001**, *12*, 195-202.
42. Roberts, M. J.; Bentley, M. D.; Harris, J. M., Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Adv. Drug Del. Rev.* **2002**, *54*, 459-476.

43. Falciani, C.; Lozzi, L.; Scali, S.; Brunetti, J.; Bracci, L.; Pini, A., Site-specific pegylation of an antimicrobial peptide increases resistance to *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Amino acids* **2014**.
44. (a) Wang, J. H., D.J.; Tran, M.; Li, W.Y.; Yoshimura, R.F.; Johnstone, T.B.C.; Shen, W.C.;Gee, K.W., Reversible Lipidization for the Oral Delivery of leu-enkephalin. *J. Drug Target.* **2006**, *14*, 127-136; (b) al-Obeidi F, H. V., Yaghoubi N, Marwan MM, Hadley ME., Synthesis and biological activities of fatty acid conjugates of a cyclic lactam alpha-melanotropin. *J Med. Chem.* **1992**, *35*, 118-123.
45. Ward, B. P.; Ottaway, N. L.; Perez-Tilve, D.; Ma, D.; Gelfanov, V. M.; Tschop, M. H.; Dimarchi, R. D., Peptide lipidation stabilizes structure to enhance biological function. *Molecular metabolism* **2013**, *2* (4), 468-79.
46. Hadley, M. E.; F., A.-O.; V.J., H.; Weinrach, J. C.; Freedberg, D.; Jiang, J.; Stover, R. S., Biological Activities of Melanotropic Peptide Fatty Acid Conjugates. *Pigment Cell Res.* **1991**, *4*, 180-185.
47. Johannessen, L.; Remsberg, J.; Gaponenko, V.; Adams, K. M.; Barchi, J. J., Jr.; Tarasov, S. G.; Jiang, S.; Tarasova, N. I., Peptide structure stabilization by membrane anchoring and its general applicability to the development of potent cell-permeable inhibitors. *Chem. Bio. Chem.* **2011**, *12* (6), 914-21.
48. (a) Cox, A. D. a. D., C.D., Protein prenylation: more than just glue? *Curr. Opin. Cell Biol.* **1992**, *4*, 1008-1016; (b) Lane, K. T.; Beese, L. S., Thematic review series: lipid posttranslational modifications. Structural biology of protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase type I. *J. Lip. Res.* **2006**, *47* (4), 681-99.
49. Shen, G.; Huhman, D.; Lei, Z.; Snyder, J.; Sumner, L. W.; Dixon, R. A., Characterization of an isoflavonoid-specific prenyltransferase from *Lupinus albus*. *Plant physiol.* **2012**, *159* (1), 70-80.
50. Ochocki, J. D.; Igbavboa, U.; Gibson Wood, W.; Wattenberg, E. V.; Distefano, M. D., Enlarging the scope of cell-penetrating prenylated peptides to include farnesylated 'CAAX' box sequences and diverse cell types. *Chem. Biol. Drug. Des.* **2010**, *76* (2), 107-15.
51. (a) Medié-Sarié, M.; Mornar, A.; Badovinac-Crnjević, T.; Jasprica, I., Experimental and Calculation Procedures for Molecular Lipophilicity: A Comparative Study for 3,3'-(2-Methoxybenzylidene)bis(4-hydroxycoumarin). *Croatica Chemica Acta* **2004**, *77*, 367-370; (b)

Benfenati, E.; Gini, G.; Piclin, N.; Roncaglioni, A.; Vari, M. R., Predicting logP of pesticides using different software. *Chemosphere* **2003**, *53* (9), 1155-1164.

52. De Luca, L. G., G.; Porcheddu, A., A Mild and Efficient Alternative to the Classical Swern Oxidation. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7907-7909.

53. (a) Arya, P. W., C.Q.; Barnes, M.L.; Darowska, M., A Solid Phase Library Synthesis of Hydroxyindoline-Derived Tricyclic Derivatives by Mitsunobu Approach. *J. Comb. Chem.* **2004**, *6*, 65-72; (b) Bisegger, P.; Manov, N.; Bienz, S., Solid-phase synthesis of cyclic polyamines. *Tetrahedron* **2008**, *64* (32), 7531-7536.

54. Lencina, C. L.; Dassonville-Klimpt, A.; Sonnet, P., New efficient enantioselective synthesis of 2-oxopiperazines: a practical access to chiral 3-substituted 2-oxopiperazines. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19* (14), 1689-1697.

55. Fukuyama, T.; Cheung, M.; Jow, C.-K.; Hida, Y.; Kan, T., 2,4-Dinitrobenzenesulfonamides: A Simple and Practical Method for the Preparation of a Variety of Secondary Amines and Diamines. *Tet. Lett.* **1997**, *38*, 5831-5834.

56. Ying, J.; Gu, X.; Cai, M.; Dedek, M.; Vagner, J.; Trivedi, D. B.; Hruby, V. J., Design, Synthesis, and Biological Evaluation of New Cyclic Melanotropin Peptide Analogues Selective for the Human Melanocortin-4 Receptor. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6888-6896.

Chapitre 2

Impact de différentes alkylations sur les propriétés pharmacocinétiques du peptide L-PDC-31

2.1 : Introduction

Dans le but de contourner l'utilisation d'acides aminés D, une série d'alkylations ont été réalisées sur support solide en utilisant deux voies de synthèses différentes. L'activité des peptides obtenus, **5a-d** et **8**, a été testée dans un essai tissulaire de contractions myométriales induites par la prostaglandine F_{2α} et comparés à l'activité du peptide parent, L-1.

Ce chapitre, présenté sous forme d'article, est un résumé des méthodes de synthèse et des résultats biologiques obtenus.

L'article est prêt pour la soumission dans le périodique *Biopolymers –Peptide Science*.

Pharmacokinetic profile improvement of peptides by *N*-terminal alkylation: Development of a prostaglandin F2 α antagonist.

Julien Poupart,¹ Xin Hou,² Sylvain Chemtob,^{*2} and William D. Lubell^{*1}

¹Département de Chimie, Pavillon Roger Gaudry, Université de Montréal, CP 6128, succ. Centre-ville,
Montréal, Québec, CANADA, H3C 3J7.

²Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine Research Center,
Montréal, Québec, CANADA, H3T 1C5.

Abstract:

The application of hydrophobic grafts to prolong the biological activity of rapidly metabolized peptides has been explored by modification of the L-peptide of the prostaglandin F2 α receptor modulator PDC-31. The all D-peptide PDC-31 has previously been shown to inhibit myometrial contractions and delay labour in various animal models as well as in humans. The L-peptide may have activity; however, proteases, which are abundant in myometrial tissue, may likely degrade the peptide before it is capable of showing activity. Solid-phase peptide synthesis followed by *N*-terminal modification by reductive aminations with different aldehydes provided linear aliphatic alkyl and PEG-grafted peptide analogs **5a-d**. Alternatively, *ortho*-nitrobenzensulfonylation of the peptide followed by Mitsunobu alkylation with farnesol and deprotection gave farnesylated peptide **8**. These were evaluated in a murine postpartum myometrial contractility assay.

2.2 : Introduction

Preterm labor is a challenging target of modern medicinal chemistry. Preterm birth (PTB), defined as less than 37 weeks of gestational age, accounts for 5-13% of all births in North-America.⁵⁷ Responsible for increased risk of mortality (both neonatal and infantile),² PTB is also associated with various other complications including developmental disorders,⁵⁸ visual⁴ and hearing⁵ impairments and chronic metabolic conditions.⁵⁹ In 2012, preterm birth was the single most expensive medical urgency per patient in the United States,⁹ in part due to a lack of so-called tocolytic drugs that can effectively and safely delay delivery.

Preterm birth is more problematic in less-favored countries. Over 60% of preterm births occur in Africa and South-Asia. The ten countries that have the highest rate of prematurity per hundred live births are all situated in these regions, which suffer from a high percentage of neonatal or infantile mortality (90% for very preterm babies of <28 weeks), because they lack basic healthcare to treat mother and child. In developed countries, less than 10% of newborns, who suffer similar PTB conditions, experience the same fate.⁹

The currently available medications, including an oxytocin receptor antagonist,¹¹ calcium channel blockers,¹² β_2 agonists,¹³ a myosin light chain inhibitor¹⁴ and prostaglandin-endoperoxide synthase inhibitors,¹⁵ all rarely delay labor for >48 hours,^{18, 60} and many have risks of serious side effects for both mother and infant. New approaches exploring different pathways to tocolysis are essential for developing more effective treatments with minimal side effects.

The prostaglandin F₂ α receptor (FP) is a promising target for delaying preterm birth, because of its involvement in parturition. FP expression increases at the beginning of labor.²⁹ FP-knockout mice never go into labor even when induced by oxytocin.^{31b}

The tocolytic prototype PDC31 (D-1) was reported previously by our group and is currently undergoing clinical trials.³² From a library of sequences based on the second extracellular loop of FP, short lead peptides were identified using *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* analyses. Optimisation of the lead peptides yielded PDC31, which exhibited notable potency ($IC_{50} = 13$ nM) and efficacy (>85% inhibition of the vasomotor response induced by $PGF_{2\alpha}$ in a porcine vesicular contraction assay), without inhibiting other known vasoconstrictors.^{32a} In the presence of prostaglandin $F_{2\alpha}$, the peptide analog PDC31 modulates selectively the downstream signalling of FP. Present thought on the mechanism of action of PDC31 suggests that it functions as an allosteric inhibitor, which interacts on FP at a different site than the “orthosteric”, native ligand-binding site. By inducing a conformational change in the receptor, PDC31 impairs the normal signalling of the endogenous ligand in a way that leads to reduction of induced uterine contractions.⁶¹

Composed of eight amino acids, seven of which are of D-configuration, including the non-proteinogenic amino acid citrulline, PDC31 possesses the sequence ile-leu-Gly-his-cit-aspartyl-lys (ilGhx_xdyk, x = citrulline, lower case letters refer to D amino acids). The relatively high cost of D-amino acid building blocks can be a limiting factor for the production of PDC31 for distribution to third-world countries, where an effective tocolytic is most needed.

In the field of medicinally relevant proteins, the grafting of polyethylene glycol chains to the polyamide structure has demonstrated success for improving pharmacodynamic properties, particularly to improve duration of action.^{38a, 38b} PEGylation of proteins has enhanced water solubility, prolonged half-life by improving metabolic stability and diminished immunogenicity compared to the unmodified molecule. In the case of these proteins, the grafts are typically introduced as a statistical distribution of polyethylene glycol chain lengths.^{39, 62} Grafts are

introduced randomly on the different residues bearing reactive side chains. For example, the addition of branched PEG chains of 40 kDa average molecular weight to interferon α 2a yielded Pegasys[®], a drug for hepatitis C that has been marketed since 2002.⁴¹ Modification of a 191-amino acid protein hormone antagonist with linear PEG chains provided Pegvisomant, which is used for the treatment of acromegaly since 2007 (Somavert[®]).⁴⁰ In both cases, the polyethylene glycol graft enhanced potency and duration of action. On the other hand, PEG-grafting on small peptide analogs has, to the best of our knowledge, yet to be described as a successful means to enhance efficacy.

Lipidation is another technique that has been commonly used to improve metabolic stability and lipophilicity.⁴⁴ Lipidation has been used to enhance the stability of large peptides, as well as to improve their specificity and association with membranes.⁴⁵ Lipid conjugation has also been applied to smaller peptides. Short peptide fragments bearing different lipid chains linked by way of an ester functionality have been shown to exhibit higher enzymatic stability and efficacy than unmodified peptide^{44b, 46}. For example, attaching hexanoic or decanoic lipid chains to α -Melanocyte Stimulating Hormone (α MSH) analogues resulted in equipotent molecules with prolonged duration of action.^{44b, 46} In contrast, longer chains (palmitic and myristic acids) resulted in less potent molecules, probably because of the increased lipophilicity.^{44b, 46} Lipidated peptide vaccines have also been reported, with the lipid acting as a self-adjuvant.⁶³ Amphiphiles, peptides bearing both a hydrophobic lipid chain and a charged moiety have been shown to aggregate in liposomes that can act as carriers for targeted drug delivery.⁶⁴ Another strategy called reversible aqueous lipidation (REAL) has been used to improve bioavailability of prodrugs that release the active molecule in the organism. This strategy has been applied to small peptides to facilitate oral delivery.^{44a} Recently, metabolic stability and membrane

permeability were improved by acylation of small peptides with a palmitoyl chain that facilitated anchoring in membranes, and may enhance peptide folding.⁴⁷

Prenylation is an important post-translational protein and peptide modification, which typically enhances cell membrane association.^{48, 65} For example, farnesyl transferases are enzymes known to introduce farnesyl subunits, which in turn may act to anchor the modified protein or peptide in the membrane. Disruption of prenylation has been suggested to play an important role in cancer, because of the significance of membrane-associated proteins in the cellular life cycle.⁵⁰ Small molecules can also be prenylated by prenyl transferases. For example, many naturally occurring prenylflavonoids have been characterized, and their biological effects manifested likely due to membrane association by way of their prenyl moieties.⁴⁹

In unpublished results, the L-amino acid version of PDC31 (**L-1**) was observed to exhibit some antagonist activity, but failed to do so in a myometrial tissue-based assay, probably owing to the relatively low metabolic stability of linear L-peptides. The purpose of the present work is to explore different bio-conjugates to possibly improve the metabolic stability of L-PDC31, in the attempt to provide an alternative FP allosteric antagonist that could be produced in a more cost-effective way. Instead of acylation of the terminal amine of the peptide using lipidic acids, a strategy was designed to maintain the basic nitrogen by alkylation using different hydrophobic moieties, including linear hydrocarbons, PEG and farnesyl chains.

The influence of the different hydrophobic chains was initially evaluated by a computational model in which logP values were predicted using the HyperChem software,⁵¹ and compared with PDC-31 (Figure 2). Although the addition of small PEG chains had limited impact on the logP of the peptide analogs, the addition of linear alkyl chains caused a notable

increase in log P with increasing length. Moreover, the 15-carbon farnesyl chain produced a peptide derivative predicted to have a logP similar to the peptide possessing a linear 12-carbon alkyl chain. Based on these predictions, a set of analogs were targeted possessing 3-, 6-, 12- and 18-carbon linear alkyl chains, tetra-ethylene glycol, and farnesyl moieties, all grafted respectively onto the *N*-terminal of the L-peptide variant of PDC31.

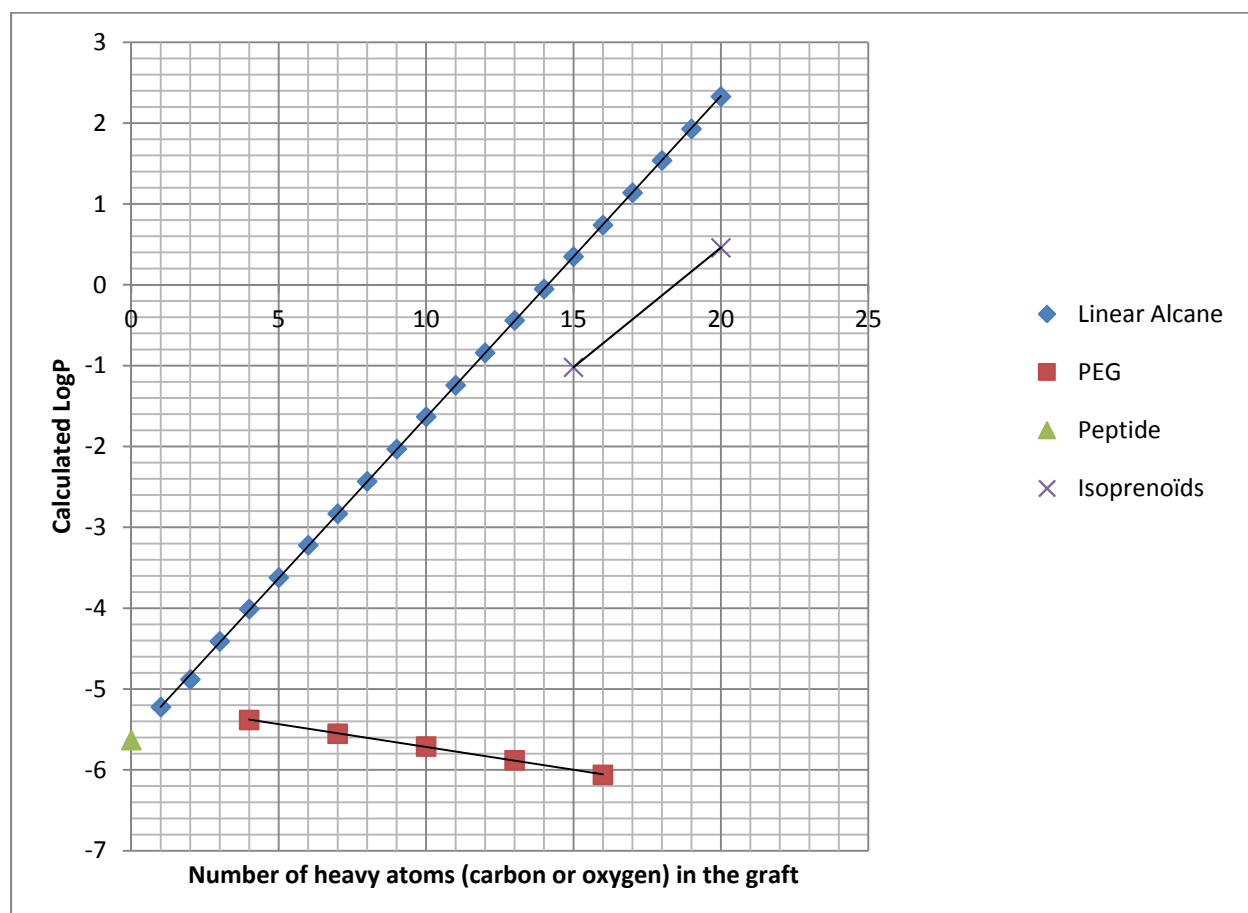
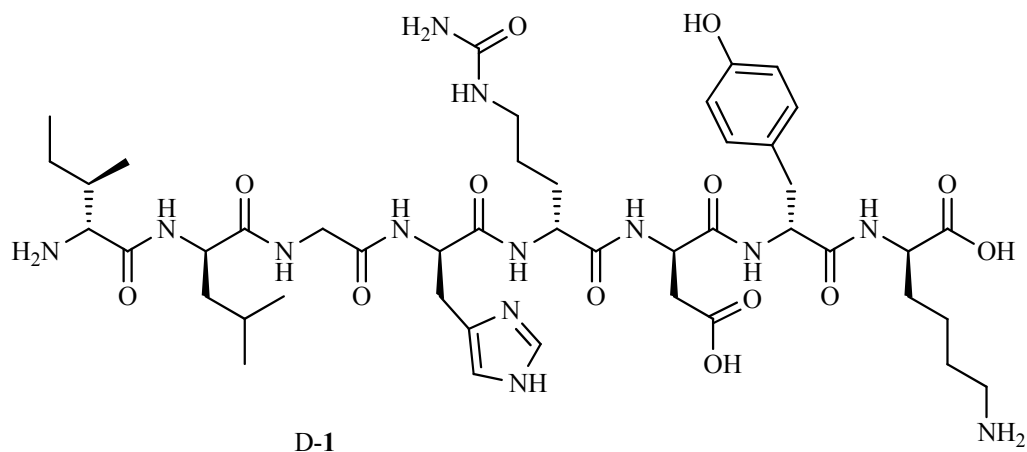


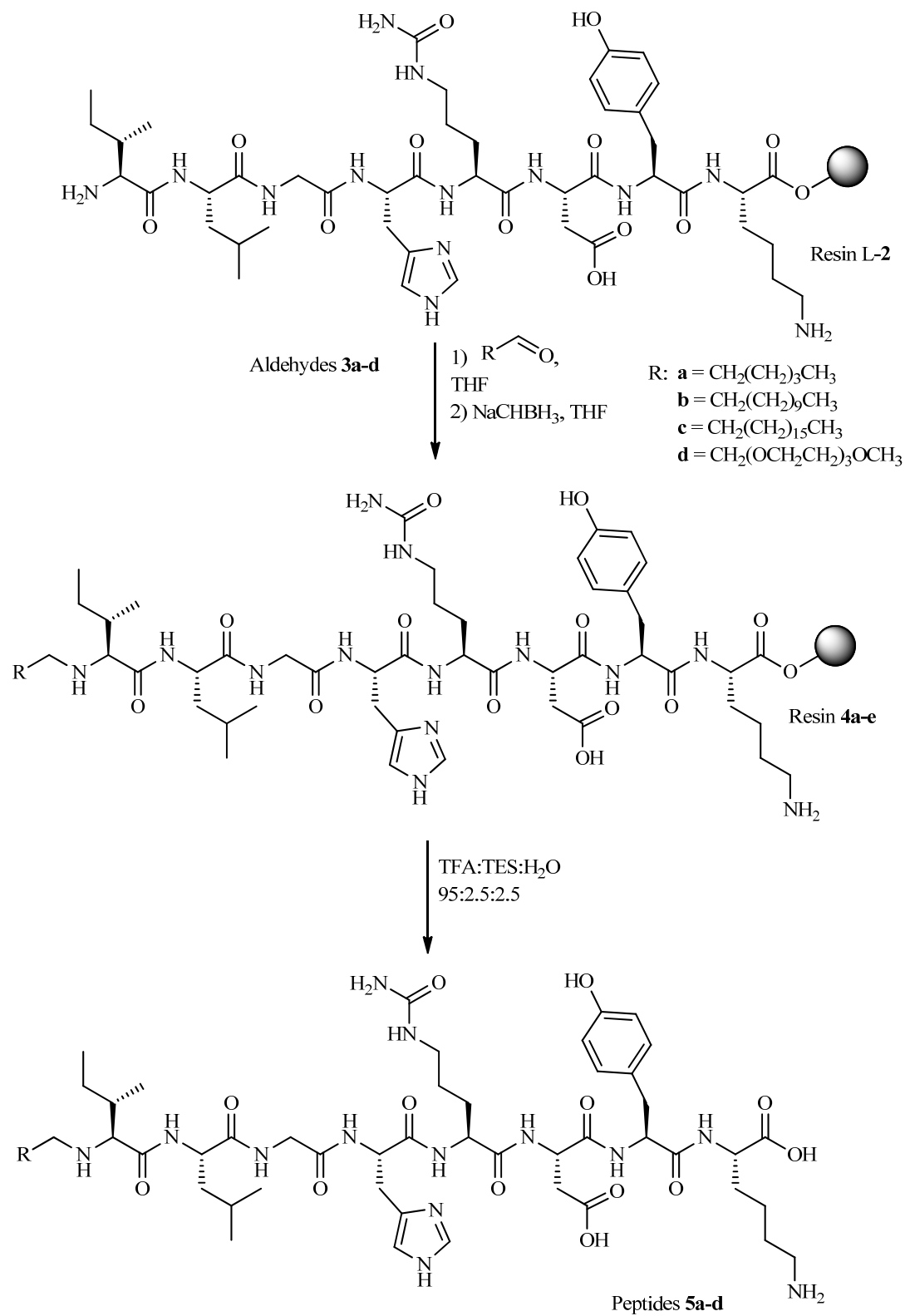
Figure 1: Calculated LogP of different peptides in relation to the number of heavy atoms (carbon or oxygen) in their grafts.

2.3 : Chemistry

Resins bearing L- and D-peptides, L- and D-**2**, were obtained by solid phase peptide synthesis using standard Fmoc/t-Bu protocols.⁶⁶ After removal of the terminal Fmoc protection, the peptide resin was treated with the appropriate aldehyde **3**. The resulting imino resin was washed to remove excess aldehyde and reductive amination was performed using sodium cyanoborohydride to provide secondary amine **4**. The final deprotective cleavage was conducted using a cocktail of 95:2.5:2.5 TFA:TES:H₂O to release *N*-alkyl- and *N*-PEG-grafted peptides **5** from the resin.⁴²



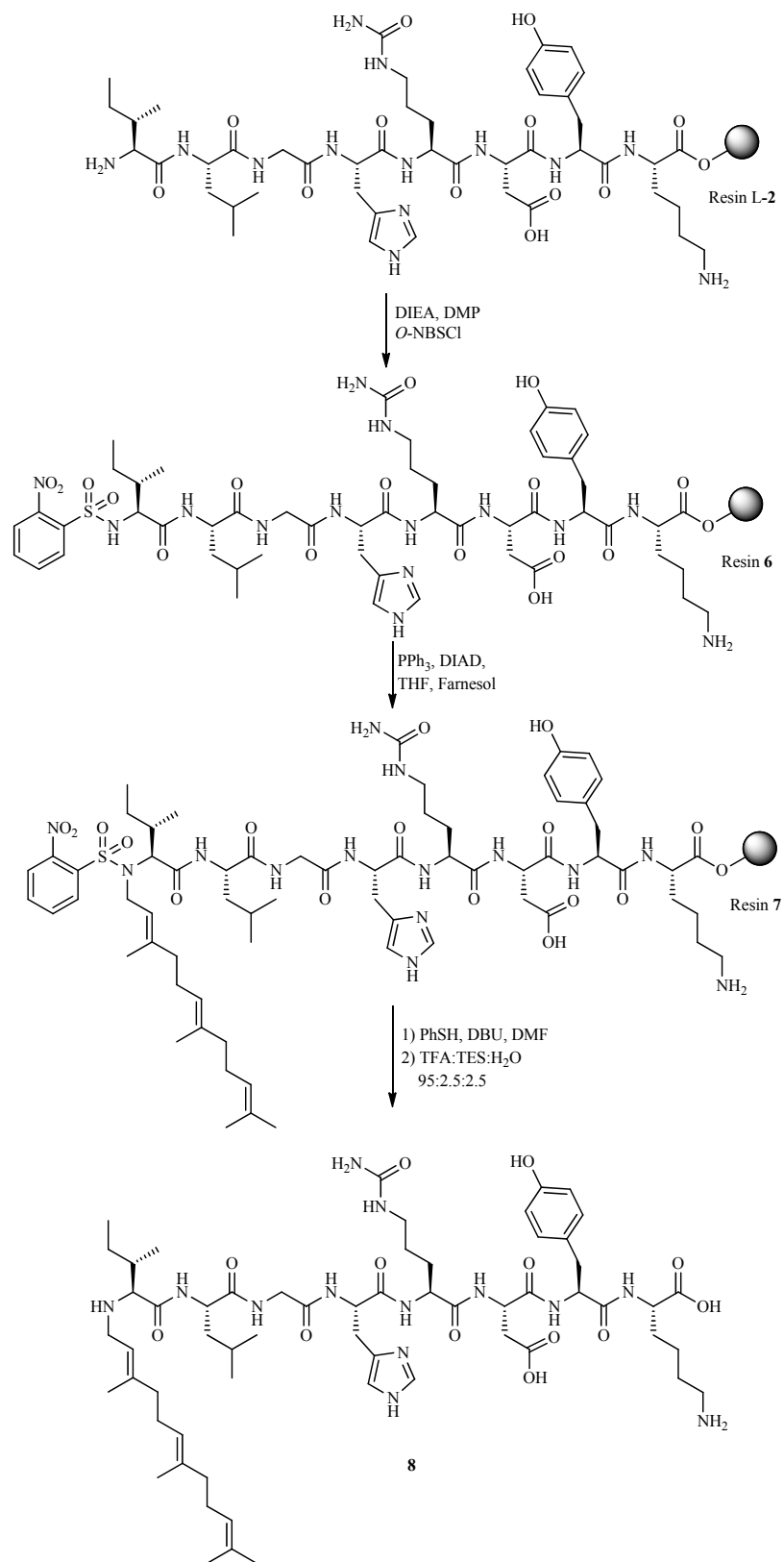
Scheme 1: Structure of PDC-31 (D-1)



Scheme 2: Synthesis of N-alkyl and N-PEG grafted peptides **5**

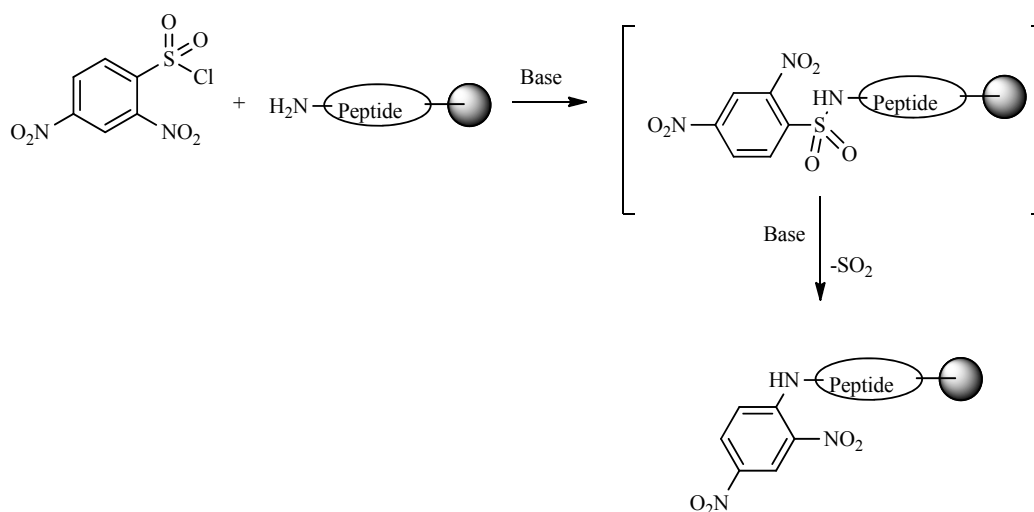
Peptides **5** were purified by RP-HPLC and were all freely soluble in water with the exception of peptide **5c**, bearing the 18-carbon alkyl chain, which required small amounts of DMSO to be dissolved completely.

An attempt to install an *N*-propyl chain by reductive amination with propanal gave competitive bis-alkylation in spite of washing the resin after treatment with the aldehyde. After cleavage from the resin, a mixture of unreacted peptide, mono- and bis-alkylated peptides was isolated and found to be inseparable using various HPLC conditions.



Scheme 3: Synthesis of farnesylated peptide **8**

Farnesyl peptide **8** was subsequently synthesized by a route featuring sulfonylation followed by alkylation using farnesol under Mitsunobu conditions. L-Peptide resin L-2 was swollen in DMF and acylated with *ortho*-nitrobenzenesulfonyl (*o*NBS) chloride and di-*iso*-propylethylamine. With the *o*NBS group installed, the sulfonamide was sufficiently acidic to take part in the Mitsunobu reaction. Treatment of *o*NBS resin **6** with diisopropyl azodicarboxylate (DIAD), triphenylphosphine and farnesol provided the *N*-farnesylated peptide resin **7**, in 55% conversion as demonstrated by LC-MS analysis of the residue from cleavage of an aliquot of resin with cleavage cocktail A.^{53-54, 67} The *o*NBS group was subsequently removed by treatment with thiophenol and DBU in DMF.⁵⁴ Farnesylated peptide **8** was cleaved and deprotected using a cocktail of 95:2.5:2.5 TFA:TES:H₂O, and purified by RP-HPLC to furnish, after freeze-drying, a white powder, which was soluble in water.



Scheme 4: Loss of SO₂ by Smiles rearrangement.

The use of the amine protecting group dinitrobenzenesulfonyl, which was reported to facilitate the Mitsunobu reaction,^{53b} was not successful. Upon treatment with base of resin L-2 in presence of dinitrobenzenesulfonyl chloride, the product showed a loss of SO₂. This type of

“Smiles” rearrangement was known to occur with some substrates,⁵⁶ and changing the base from pyridine to 2,6-lutidine did not prevent this side reaction. This protecting group was abandoned in favor of *ortho*-benzenesulfonyl chloride.

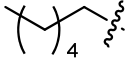
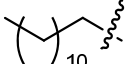
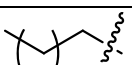
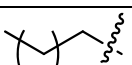
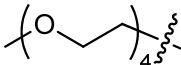
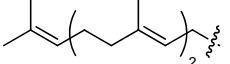
| Peptide | R-ILGHCitDYK-OH | System A | System B | [M+H] ⁺ | [M+H] ⁺ | Total |
|-------------|---|------------------------|------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------|
| | R= | Rt, min, (% purity) | Rt, min, (% purity) | Calc. | Found | Yield (%) |
| L-1 | H | 10.8 (97) | 9.9 (90) | 1002.5367 | 1002.5366 | 7.71 |
| 5a |  | 9.8 (92) | 9.7 (61) | 1086.6306 | 1086.633 | 0.33 |
| L-5b |  | 12.6 (94) | 13.4 (57) | 1170.7245 | 1170.7251 | 0.65 |
| D-5b |  | 13.0 (94) | 13.1 (74) | 1170.7245 | 1170.7238 | 1.20 |
| 5c |  | 15.0 (94) | 15.1 (89) | 627.9128 ([M+2H] ²⁺) | 627.9105 ([M+2H] ²⁺) | 0.32 |
| 5d |  | 10.0 (86) | 9.6 (67) | 1192.6572 | 1192.6605 | 2.88 |
| 8 |  | 10.0 (89) | 13.3 (84) | 1206.7245 | 1206.7263 | 2.49 |

Table 1: Peptide purity and characterization data.

2.4 : Effects of modified peptides on PGF2 α -induced contraction in murine myometrium

The peptide PDC-31 was previously demonstrated to reduce both the strength and length of spontaneous and PGF2 α -induced contractions in postpartum murine myometrium.³² Employing the latter assay, peptides conjugated to hydrophobic chains **5a-e** and **8** were evaluated for their abilities to inhibit PGF2 α -induced contractions⁶⁸ (Figure 2-5).

The parent L-peptide analog of PDC-31 **L-1** did not show any inhibitory activity against PGF2 α -induced contractions. Myometrial tissue is known to be rich in proteases,⁶⁹ which may degrade the linear L-peptide, rendering it inactive. On the contrary, *N*-dodecanoyl peptides **D-5b** and **L-5b** exhibited respectively slight and moderate activity (Figure 2). A second batch of **L-5b** was synthesized and its inhibitory activity on myometrial tissue was validated as demonstrated by comparable results (figure 3). The results were proven to be statistically significant by way of a *F*-test. *N*-hexyl peptide **5a** and *N*-octadecanoyl peptide **5c** did not show significant activity, although a trend seems to be visible in the case of **5a** (Figure 4). In the case of **5c**, the lack of activity might be explained by the poor water solubility of the compound. Moreover, neither PEGylated peptide **5d** nor farnesylated peptide **8** exhibited activity (Figure 5).

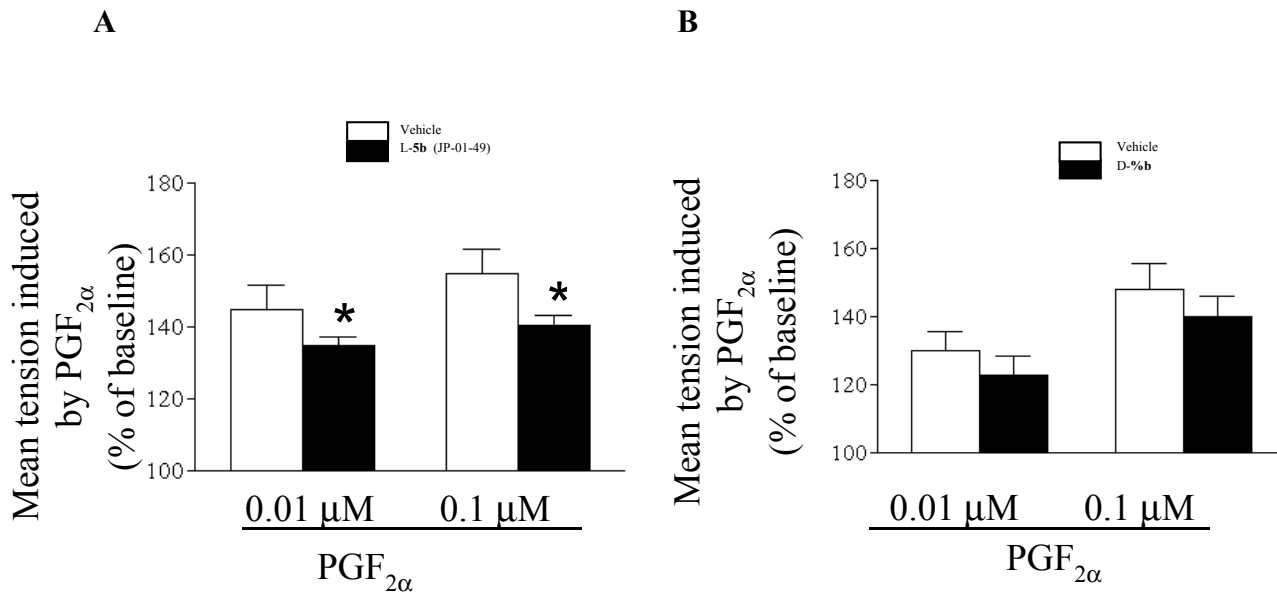


Figure 2: Effect of L- and D-N-dodecanyl peptides L- and D-5b (A L-5b and B D-5d) on PGF_{2α} induced contractions in postpartum murine myometrium.

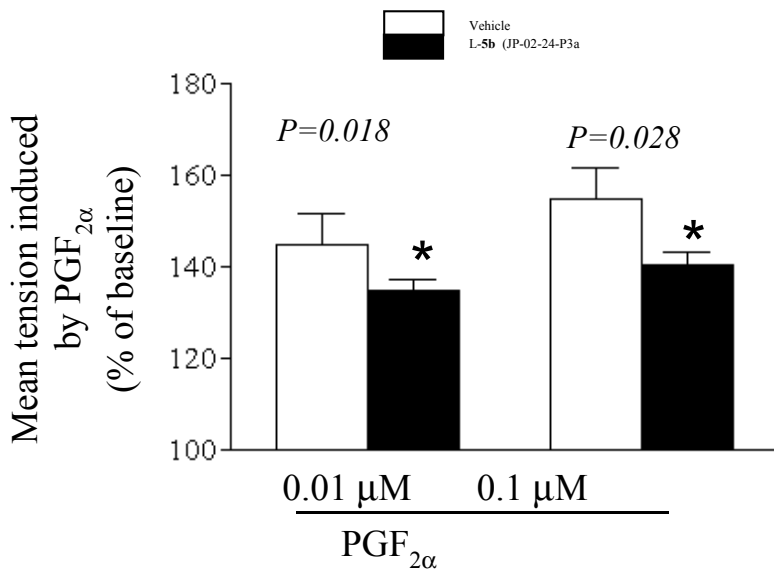


Figure 3: Effect and F-test values of a second batch of L-dodecanyl peptide 5b on PGF_{2α} induced contractions in postpartum murine myometrium.

Among possible mechanisms to explain the gain in activity of the L-enantiomer of PDC-31, *N*-alkylation may render the L-peptide more stable to degradation by proteases, relative to the unalkylated peptide. On the other hand, PDC-31 features three lipophilic amino acids (ile-leu-gly) at the *N*-terminus, which have been hypothesized to favour binding to the membrane-bound receptor. The alkyl chain may anchor the peptide in cell membranes and enhance activity. Notably, attachment of a dodecanyl chain onto PDC-31 (D-5b) exhibited lower activity than L-5b, and significantly less activity than the unmodified D-peptide, PDC-31.³² This result may be considered to result from interference of PDC-31 binding to its target, without enhancement of metabolic stability.³² Considering the latter, the influence of the *N*-alkyl graft on the L-peptide variant of PDC-31 may be due to enhanced resistance to proteolytic degradation.

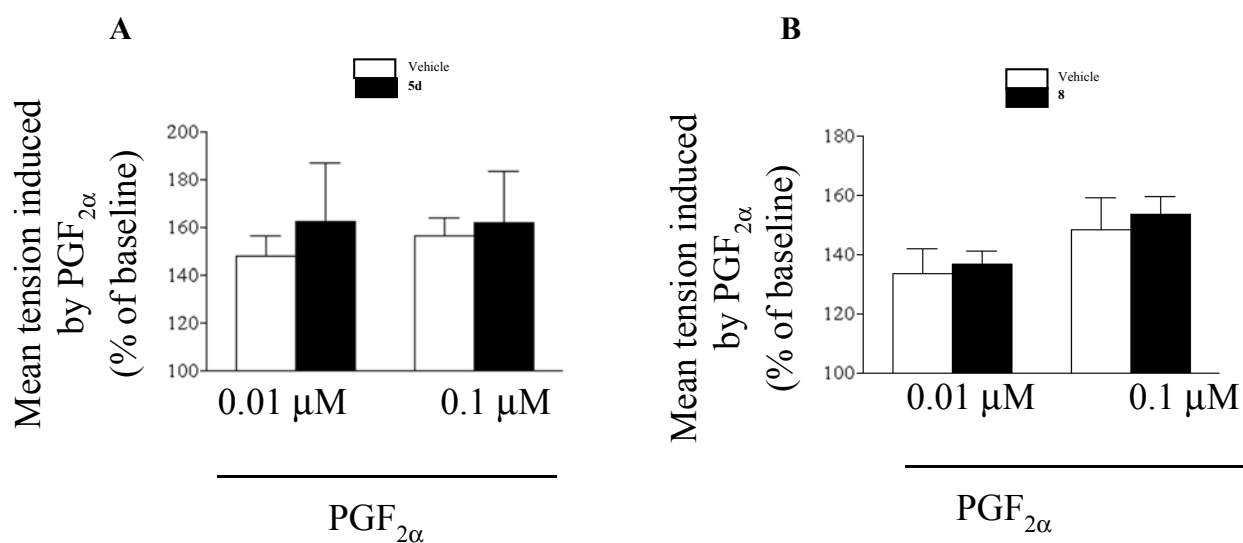


Figure 4: Effect on PEG-grafted peptide 5d (A) and farnesyl peptide 8 (B) on PGF_{2α} induced contractions in postpartum mice myometrium.

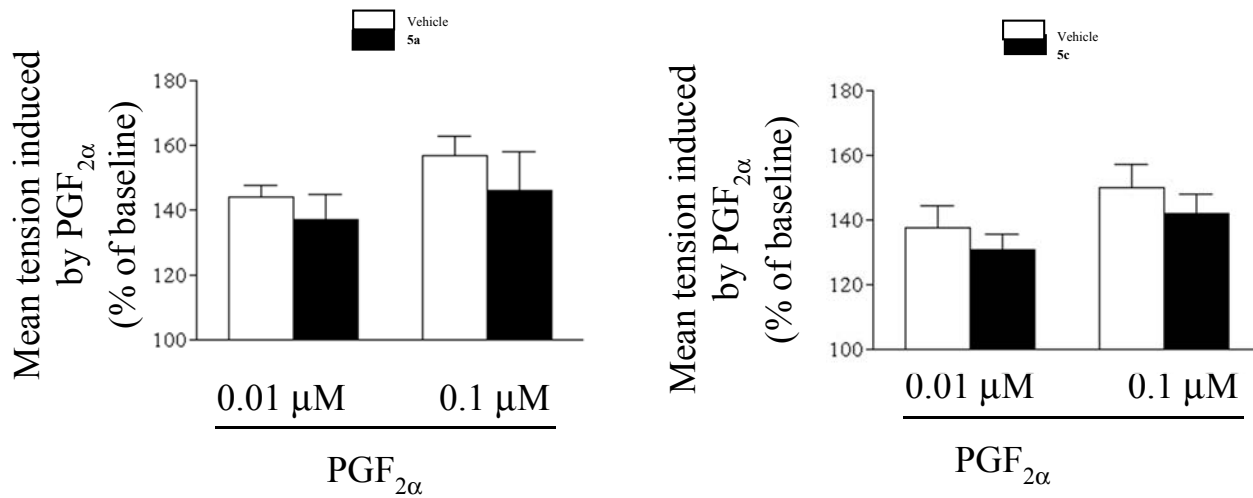


Figure 5: Effect of L-N-hexyl peptide **5a** (A) and L-N-octadecanyl peptide **5c** (B) on PGF_{2α} induced contractions in postpartum murine myometrium.

2.5 : Conclusion

In our efforts to develop a cost-effective treatment for preterm labor, we have studied the effects of different *N*-terminal grafts on the activity of the L-peptide L-1. Although PEGylation and farnesylation failed to improve activity, the attachment of linear alkyl chains onto the peptide provided analogs, which exhibited ability to delay myometrial contractions. *N*-Hexyl peptide **5a** and dodecyl peptide **5b** exhibited respectively slight and significant activities in the myometrial tissue contractility assay. Dodecyl D-peptide D-**5b** had similar activity to its L-counterpart L-**5b**, but was considerably less potent than its unalkylated D-peptide analog PDC-31, indicating that the alkyl chain likely disturbed receptor binding without improving the stability of the D-peptide. The increased activity of L-**5b** on placement of a dodecyl chain on peptide **5a** may come from enhanced proteolytic resistance and better metabolic stability. Consistent with results reported using *N*-acylation of peptides with longer alkyl chains,^{44b, 46} octadecanyl peptide **5c** was devoid of activity likely due to its loss of aqueous solubility. Notably, L-**5b** exhibits less than half the potency of PDC-31; however, the difference in the cost of its synthesis may make such analogs worthwhile cost effective alternatives for treating preterm labour. Moreover, the use of linear alkyl chains may enhance the pharmacodynamics properties of various biologically active peptides.

2.6 : Experimental section

General

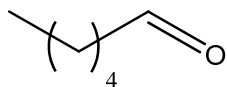
Unless otherwise noted, reagents were synthetic grade obtained from commercial sources and used without further purification. Anhydrous solvents (THF, DMF and DCM) were obtained by passage through solvent filtration systems (GlassContour, Irvine, CA). All solution phase reactions were performed under argon atmosphere. Final purity assessments were made using analytical RP-HPLC (Phenomenex Synergi Polar-RP, 4,6mm x 150mm, 4 um, UV detection at 250nm or 280 nm) using the following systems: system A, 5-50% water with 0.1% formic acid (FA) in acetonitrile with 0.1% FA over 20 min at 0.5ml/min; system B, 30-90% water with 0.1% FA in methanol with 0.1% FA. Reaction follow up were made using analytical RP-HPLC (Phenomenex SunFire C18, 2.1x50 mm, 3.5 um, uv detection at 254 or 280 nm), using system C, 20-90% water with 0.1% formic acid (FA) in acetonitrile with 0.1% FA over 10 minutes at 0.35mL/min. Accurate mass measurements were performed on a LC-MSD-TOF instrument from Agilent technologies using positive electrospray mode for high resolution MS (HRMS) at the Université de Montréal Mass Spectrometry facility. Protonated ions $[M+H]^+$ were used for empirical formula confirmation. Peptides were purified by RP-HPLC (Phenomenex Gemini C18, 21.5mm x 250mm, 4um, UV detection at 280nm) using a gradient of elution of 5-50% water with 0.1% FA in acetonitrile with 0.1% FA over 20 min at 0.5mL/min.

Propanal⁷⁰



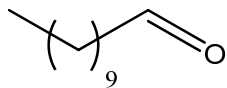
n-Propanol (12 g, 15 mL, 199 mmol) was heated at reflux in a three-necked round bottom flask equipped with condenser at 60°C, treated dropwise over a period of 45 min with a solution of sodium dichromate (19.6 g, 65.8 mmol) and sulfuric acid (24.5 g, 13.3 mL, 249 mmol) in water (12 mL), and heated at reflux for an additional 15 min. Propanal (10.321 g, 177 mmol, 89 %) was obtained as a clear, slightly yellow liquid with a fruity odour. The ¹H-NMR spectrum was in accordance with that in the literature,⁷¹ and the aldehyde was used in the next step without further purification.

Hexanal



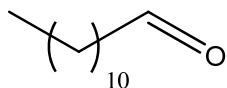
A solution of DMSO (2.97 mL, 41.8 mmol) in dry THF was cooled to -40°C in an acetonitrile/dry ice bath, treated with cyanuric chloride (2.64 g, 14.3 mmol), stirred for 30 min, treated with 1-hexanol (1.5 mL, 11.9 mmol), stirred for 30 min at -40°C, treated drop wise with triethylamine (11.6 mL, 83.6 mmol), stirred for 15 min at -40°C, brought to room temperature, and stirred for 30 min. The volatiles were evaporated. The residue was dissolved in dichloromethane (50 mL), washed with 15 mL of water and with 15 mL of brine, dried over magnesium sulphate, filtered and evaporated to dryness. Hexanal (1.124 g, 11.2 mmol, 94 %) was obtained as a yellow to orange oil. The ¹H-NMR spectrum was in accordance with that in the literature,⁷² and the aldehyde was used without further purification.

Undecanal



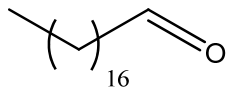
The protocol described above for the oxidation of hexanol was adapted for undecanol (12.0 mmol), which gave undecanal (1.897 g, 11.1 mmol, 96 %) as a yellow to orange oil, which exhibited a $^1\text{H-NMR}$ spectrum in accordance with that reported in the literature,⁷³ and the aldehyde was used without further purification.

Dodecanal



The protocol described for the oxidation of hexanol was adapted for dodecanol (15.1 mmol) and gave dodecanal (2.63 g, 14.3 mmol, 95 %) as a yellow oil with a high viscosity. The $^1\text{H-NMR}$ spectrum was in accordance with that in the literature,⁷⁴ and the aldehyde was used without further purification.

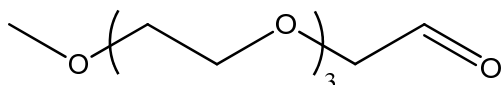
Octadecanal⁷⁵



A solution of octadecanol (1.00 g, 3.7 mmol) and pyridinium chlorochromate (PCC, 1.593 g, 7.39 mmol) in dry DCM (20 mL) was stirred over molecular sieves (1.2 g) under argon at room temperature for 3h, filtered through a plug of silica gel (6 x 3 cm), and the filter cake was washed

with EtOAc. The filtrate and washings were combined, and evaporated *ad vacuo* to octadecanal (903 mg, 3.36 mmol, 91 %) as a colorless solid, exhibiting a ¹H-NMR spectrum in accordance with that in the literature,⁷⁶ such that the aldehyde was used without further purification.

2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-al



The protocol described for the oxidation of hexanol was employed on 2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-ol (15.0 mmol) furnishing 2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-al (3.06 g, 14.9 mmol, 99 %) as yellow oil, exhibiting a ¹H-NMR spectrum with a clear aldehyde peak at 9.712 ppm (CDCl₃). The aldehyde was used without further purification.

Resin loading and capping

2-Chlorotryl chloride resin (GLS Biochem, 1g, 0.8 mmol) swollen in DMF was treated with Fmoc-L-Lysine(Boc)-OH (1.124 g, 2.4 mmol), HBTU (910 mg, 2.4 mmol) and diisopropyl ethylamine (835 μ L, 4.8 mmol) in 10 mL of DMF. The reaction mixture was agitated on an orbital shaker for 3 h, the resin was filtered, and the coupling was repeated. The resin was filtered, and washed with DMF (3 x 15 mL), isopropyl alcohol (3 x 15 mL) and DCM (3 x 15 mL). The resin swollen in DMF (25 mL) was treated with diisopropyl ethylamine (835 μ L, 4.8 mmol) in 10 mL methanol and agitated for 2 h. The resin was filtered and washed with DMF (3 x 15 mL), isopropyl alcohol (3 x 15 mL) and DCM (3 x 15 mL) and dried under vacuum.

The efficiency of the coupling was determined after Fmoc removal by UV analysis⁷⁷. A precisely weighted 100 mg aliquot of dry resin was transferred to a 10 mL gaged flask, treated with 2 mL of 2% 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) in DMF and gently agitated for 30 min. The solution was diluted to 10 mL using acetonitrile and 2 mL of the resulting solution was transferred to a 25 mL gaged flask, and diluted to 25 mL using MeCN. A second solution was prepared containing the exact same components except the resin to serve as a reference. The UV absorbance of these solutions was recorded at $\lambda = 304$ nm and the exact loading was determined by the following equation:

$$Fmoc \text{ Loading } (mmol/g) = (A_{sample} - A_{ref}) \times \frac{16.4}{mg \text{ of resin}}$$

Yields of final product were calculated using the manufacturer reported resin loading and the following equation:

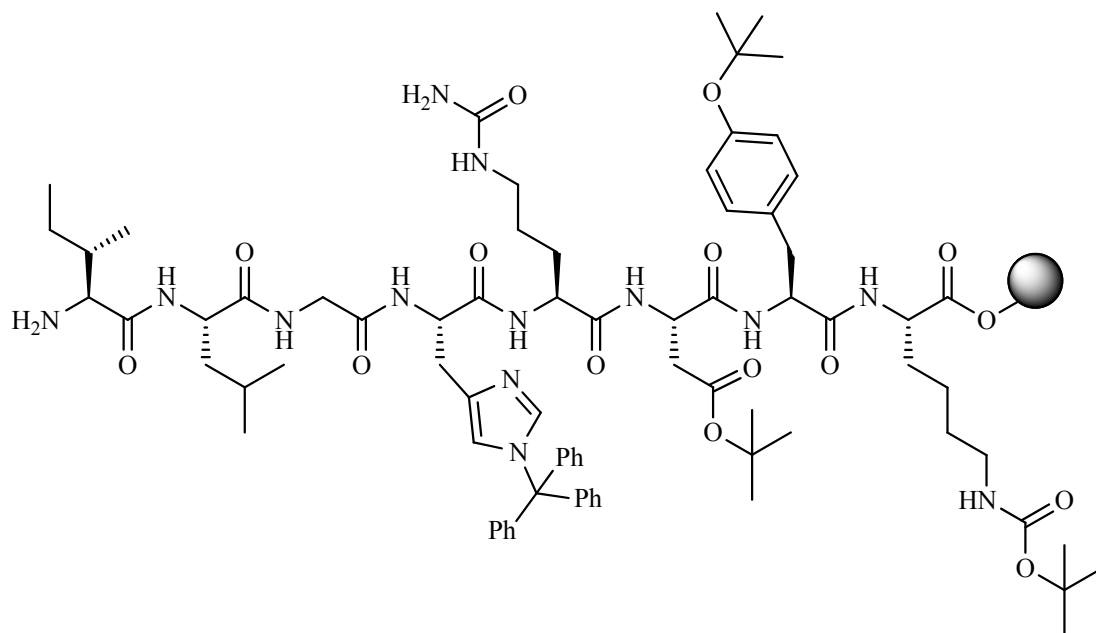
$$\frac{Mass \text{ of resin} * \text{Loading}}{mmol \text{ of product obtained}} \times 100$$

Automated peptide synthesis

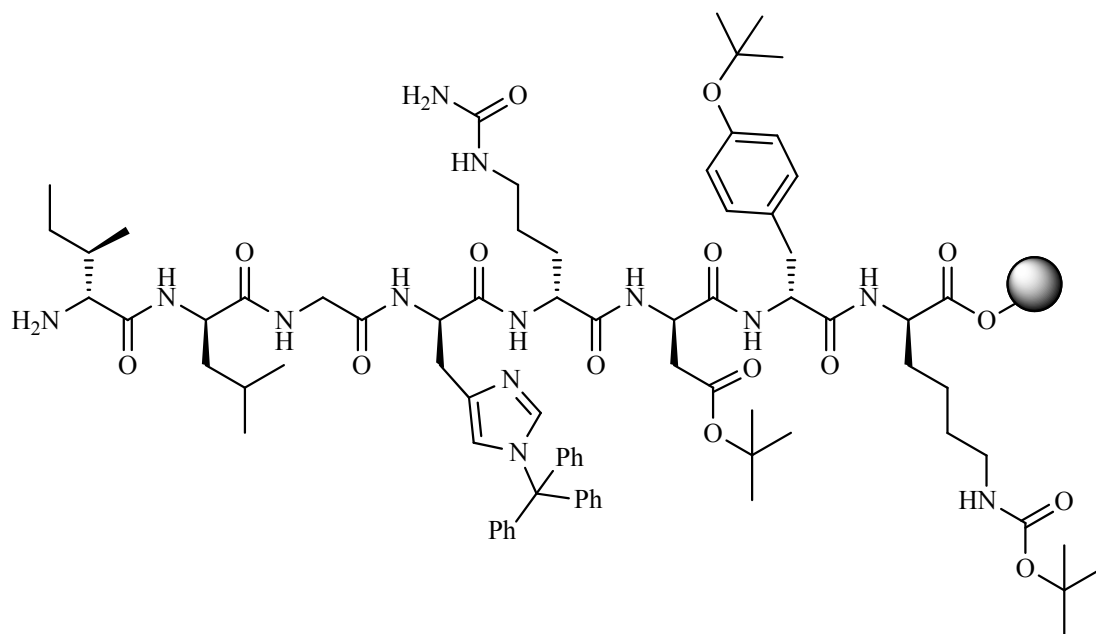
Peptide synthesis was carried out using a CEM Liberty microwave peptide synthesiser. The following amino acids were protected on the α -amine with the Fmoc group and the respective side chain protecting groups: Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(O^tBu)-OH, Fmoc-Asp(O^tBu)-OH, Fmoc-Cit-OH, Fmoc-His(OTrt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ile-OH. Fmoc removal was performed with two treatments with 20% piperidine in DMF solution irradiating at 75°C (35W) at first for 30 sec and then for 180 sec. After the resin was washed (4 x 25 mL DMF), couplings were performed in DMF with N^α-Fmoc amino acid (0.2 M), HBTU (0.5 M) and DIEA (2 M). Typically, the N^α-Fmoc amino acid solution (30 mL, 6 mmol) was added to the resin followed by the HBTU (12 mL, 6 mmol) and DIEA (6 mL, 12 mmol) solutions. For all amino acids except histidine, the coupling cycle was performed with irradiation at 75°C (25W) for 300 sec. In the case of histidine the coupling cycle was performed without irradiation initially at 50°C for 120 sec followed by irradiation at 50°C (25W) for 240 sec. The resin was washed (3 x 25 mL DMF) prior to each coupling step. All the residues were coupled using a single coupling cycle. Upon completion of the sequence, the resin was washed with 10 mL of DCM and transferred to the receiving flask using 3 x 10 mL volumes of DCM.

The final Fmoc removal was done manually, by swelling the resin in a solution of 20% piperidine in DMF (25 mL) and agitating for 30 min. The resin was filtered and washed with DMF (3 x 25 mL), isopropanol (3 x 25 mL), dichloromethane (3 x 25 mL) and ethyl ether (1 x 30 mL), dried under vacuum and stored at -20°C.

Ile-Leu-Gly-His(NTr)-Cit-Asp(OtBu)-Tyr(OtBu)-Lys(Boc) Resin L-2



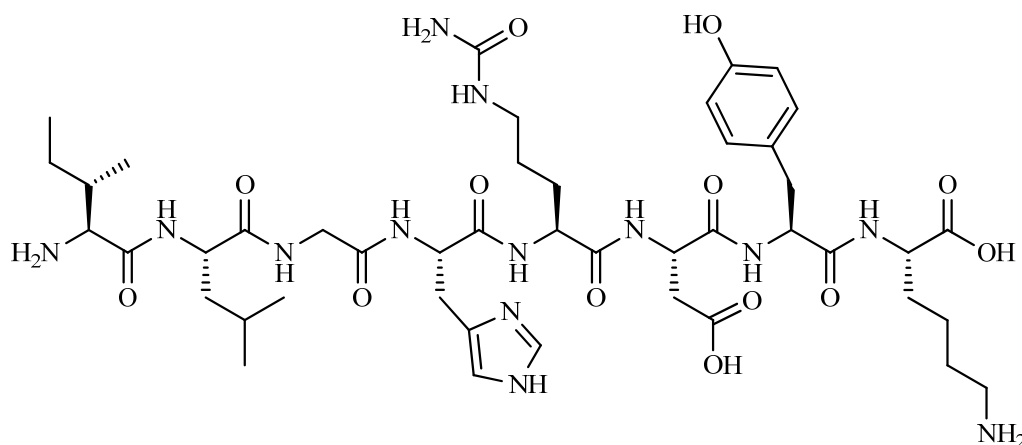
ile-leu-Gly-his(NTr)-cit-asp(OtBu)-tyr(OtBu)-lys(Boc) Resin D-2



Peptide cleavage and purification

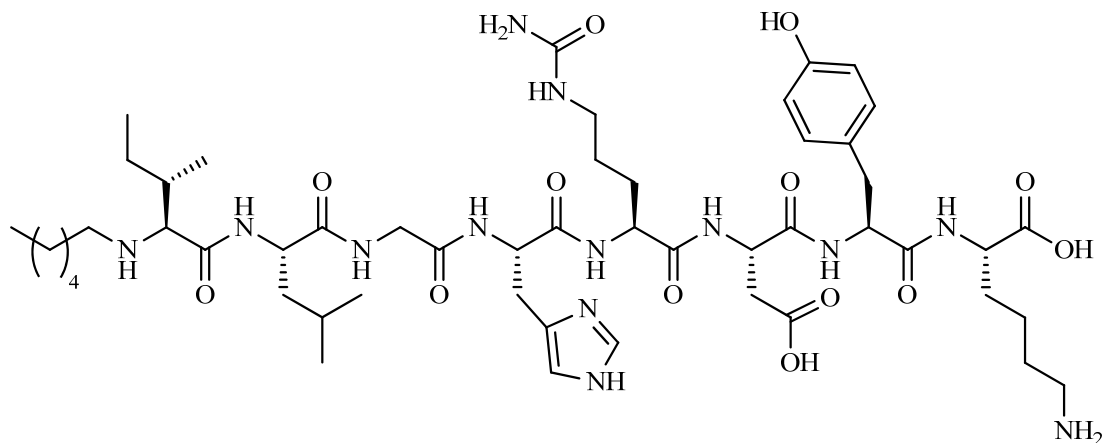
After removal of the terminal Fmoc group as described above, the resin was treated with a cleaving cocktail of TFA:TES:H₂O (95:2.5:2.5) for 2h and filtered. The resin was washed once with DCM. The washing and filtrate were combined, and evaporated to an oil, which was washed with cold ether and purified by RP-HPLC (Phenomenex Gemini C18, 250 mm X 21.2 mm column, 10 mL/min flow rate, detection at 254 nm or 280 nm, using 5-90% water with 0.1% FA in acetonitrile with 0.1% formic acid over 40 min).

Ile-Leu-Gly-His-Cit-Asp-Tyr-Lys (L-1, L-PDC31)



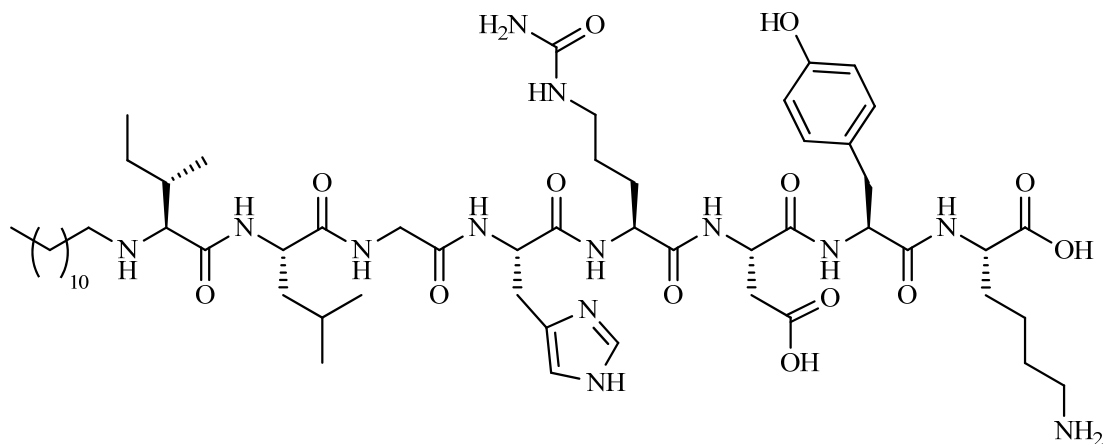
A mixture of 15 mL of TFA:TES:H₂O (95:2.5:2.5) and 221 mg (0.07 mmol) of resin L-2 were agitated for 2 h. The resin was filtered and washed with DCM (1 x 5 mL). The filtrate and washings were combined and evaporated to an oil, which was washed with cold ether and purified by RP-HPLC (5-50% MeCN + 0.1% FA in H₂O + 0.1% FA). Free-drying of the collected fractions gave L-1 as white solid (5.4 mg, Rt = 10.86 (System A), [M+H]⁺_{Calc.} = 1002.53671; [M+H]⁺_{Found} = 1002.53656, [M+2H]²⁺_{Calc.} = 501.77199, [M+2H]²⁺_{Found} = 501.77366; purity 97%).

***N*-Hexyl-Ile-Leu-Gly-His-Cit-Asp-Tyr-Lys (5a)**



A dry sample of 912 mg (0.3 mmol) of Ile-Leu-Gly-His(NTr)-Cit-Asp(OtBu)-Tyr(OtBu)-Lys(Boc) resin L-2 in a plastic syringe tube equipped with Teflon™ filter, stopcock and stopper was swollen in THF (15 mL) and treated with hexanal (613 mg, 6 mmol) agitated on an orbital shaker for 18h at room temperature, filtered and washed with DMF (3 x 15 mL), dichloromethane (3 x 15 mL) and THF (1 x 20 mL). The resin was swollen in THF (15 mL), treated with sodium cyanoborohydride (150 mg, 2.4 mmol), agitated on an orbital shaker for 18h, filtered and washed with DMF (3 x 15 mL), isopropanol (3 x 15 mL) and dichloromethane (3 x 15 mL). The resin was exposed to a mixture of TFA:TES:H₂O (95:2.5:2.5), stirred for 2h, filtered and washed with DCM (1 x 5 mL). The filtrate and washing were combined, evaporated to a residue, which was washed with cold ether, and purified by RP-HPLC (5-50% MeCN + 0.1 % FA / H₂O + 0.1 % FA). Freeze drying of the collected fractions gave **5a** as a white solid (1.1 mg, Rt = 9.84 (System A), [M+H]⁺_{Calc.}=1086.6306; [M+H]⁺_{Found} = 1086.6331, [M + 2H]²⁺_{Calc} = 543.8189, [M + 2H]²⁺_{Found} = 543.8217; purity 92%).

***N*-Dodecanyl-Ile-Leu-Gly-His-Cit-Asp-Tyr-Lys (L-5b)**



The protocol for the synthesis of hexanyl peptide **5a** described above was adapted for dodecanal.

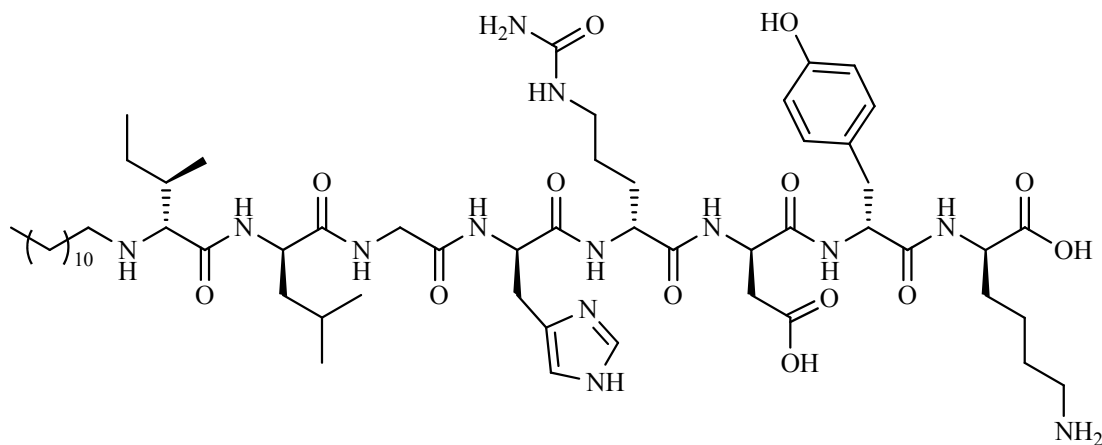
The obtained oil was purified by RP-HPLC (5-50% MeCN + 0.1% FA / H₂O + 0.1% FA).

Freeze-drying of the collected fractions gave L-**5b** as white solid (2.1 mg, Rt = 12.57 (System

A), [M+H]⁺_{Calc.}=1170.7245; [M+H]⁺_{Found} = 1170.7251, [M + 2H]²⁺_{Calc.} = 585.8659, [M +

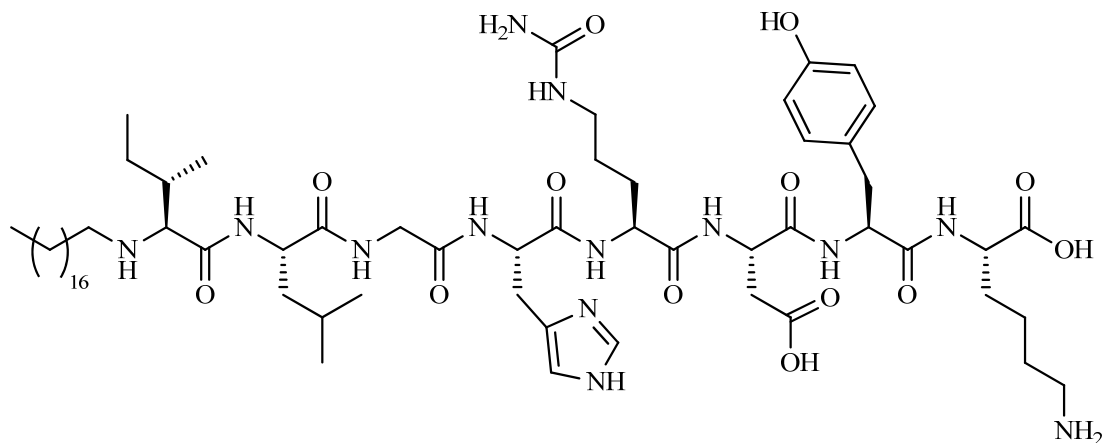
2H]²⁺_{Found} = 585.8687; purity 94%).

***N*-Dodecanyl-ile-leu-Gly-his-cit-asp-tyr-lys (D-5b)**



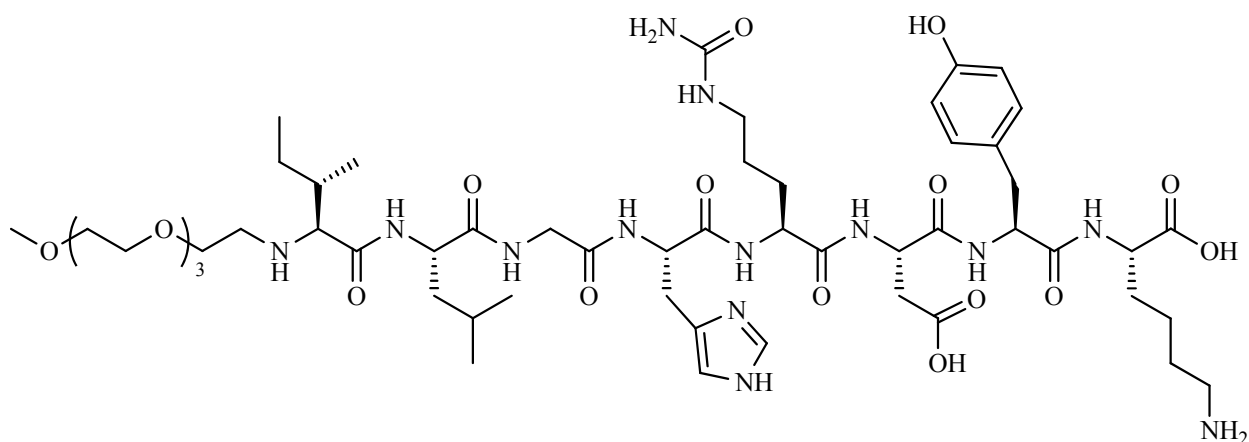
The protocol for the synthesis of hexanyl peptide **5a** described above was adapted adapted for dodecanal on ile-leu-Gly-his(NTr)-cit-asp(OtBu)-tyr(OtBu)-lys(Boc) resin **D-2**. The oil was purified by RP-HPLC (5-50% MeCN + 0.1% FA / H₂O + 0.1% FA). Freeze-drying of the collected fractions provided **D-5b** as a white solid (4.2 mg, Rt 13.00 (System A), [M+H]⁺_{Calc.} = 1170.7245; [M+H]⁺_{Found} = 1170.7238, [M + 2H]²⁺_{Calc.} = 585.8659 , [M + 2H]²⁺_{Found} = 585.8680; purity 94%).

***N*-Octadecanyl-Ile-Leu-Gly-His-Cit-Asp-Tyr-Lys (5c)**



The protocol for the synthesis of hexanyl peptide **5a** described above was adapted for octadecanal. The oil was purified by RP-HPLC (5-50% MeCN + 0.1%FA / H₂O + 0.1% FA). Freeze-drying of the collected fractions gave octadecanyl peptide **5c** as white solid (1.2 mg, Rt = 15.01 (System A), [M + 2H]²⁺_{Calc} = 627.9128, [M + 2H]²⁺_{Found} = 627.9105; purity 94%).

***N*-2,5,8,11-Tetraoxatridecan-13-yl-Ile-Leu-Gly-His-Cit-Asp-Tyr-Lys (5d)**

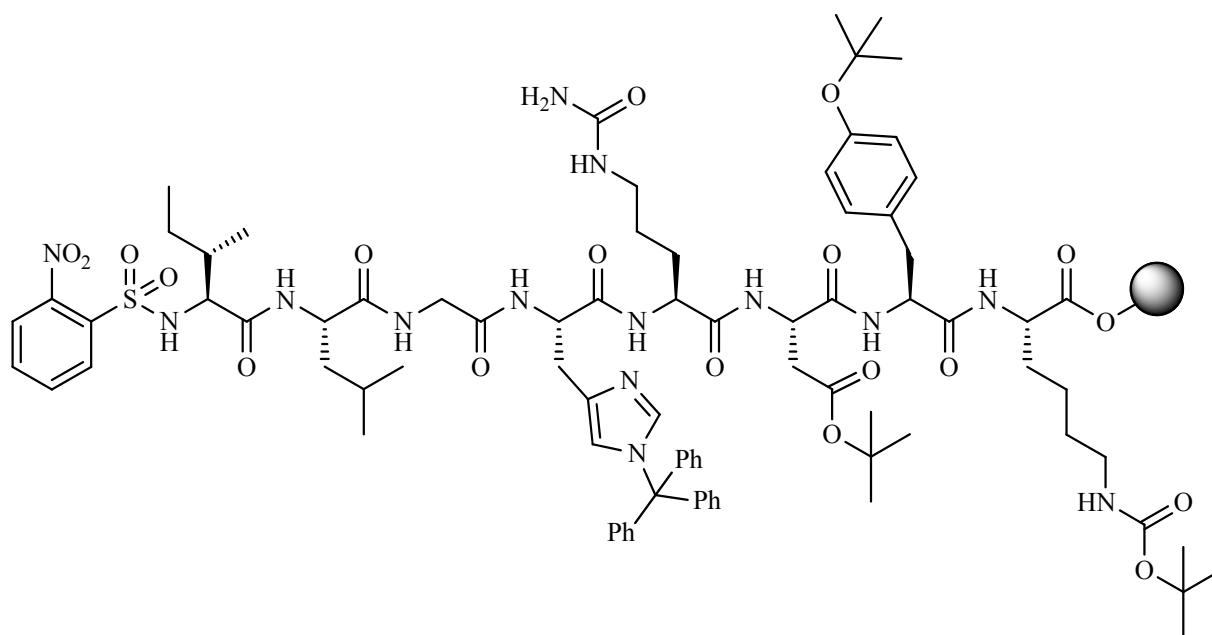


The protocol for the synthesis of hexanyl peptide **5a** described above was adapted for 2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-al. The resulting oil was purified by RP-HPLC (5-50% MeCN + 0.1% FA / H₂O + 0.1% FA). Freeze-drying of the collected fractions gave **5d** as white solid (10.3 mg, Rt =

10.03 (System A), $[M+H]^+_{\text{Calc.}}=1192.6572$; $[M+H]^+_{\text{Found}}=1192.6605$, $[M+2H]^{2+}_{\text{Calc.}}=596.8323$, $[M+2H]^{2+}_{\text{Found}}=596.8351$; purity 86%).

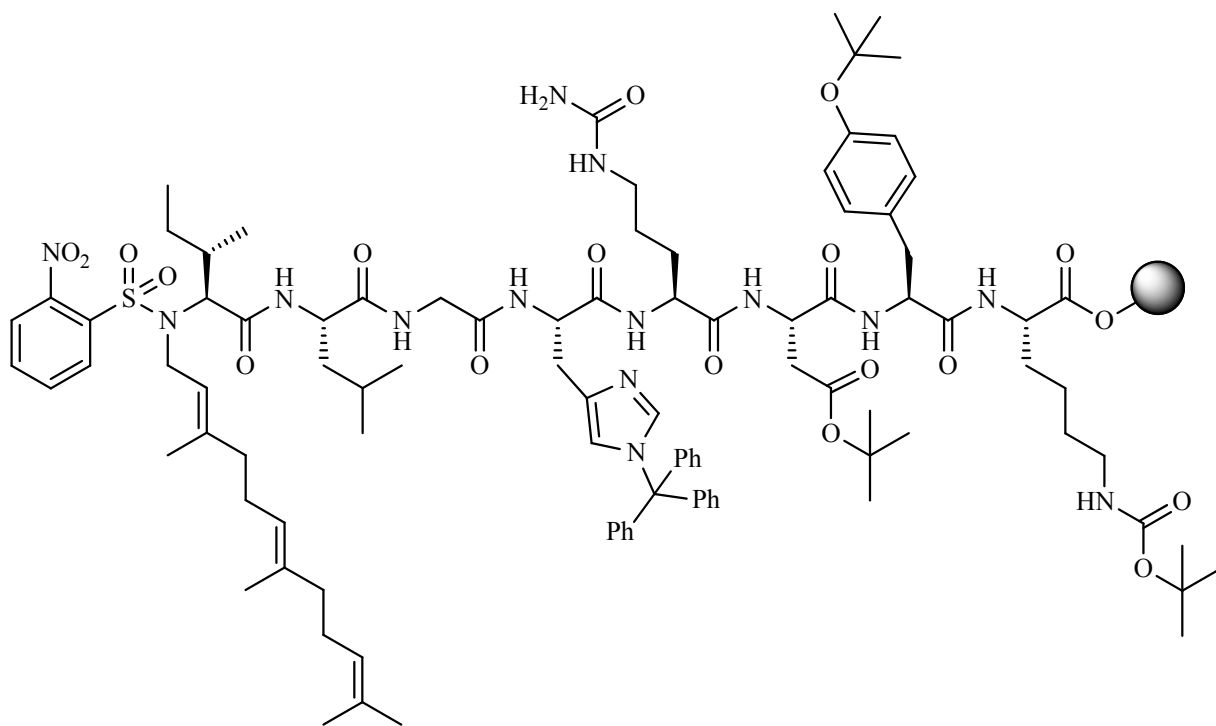
***N*-*o*-Nitrophenylsulfonyl-Ile-Leu-Gly-His(NTr)-Cit-Asp(OtBu)-Tyr(OtBu)-Lys(Boc)**

Resin 6



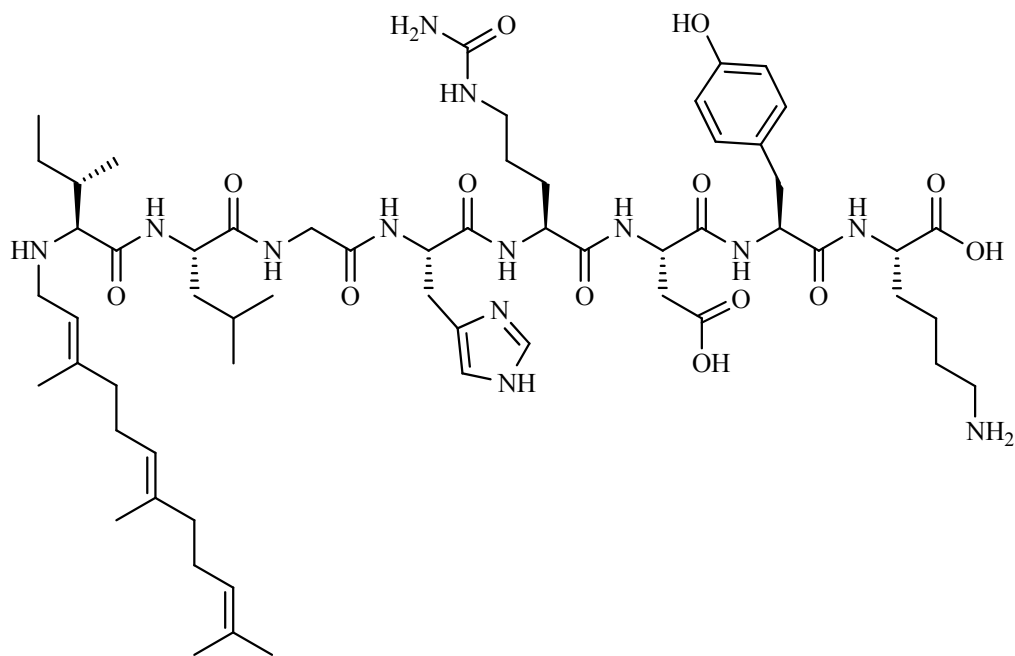
Resin L-2 (917 mg, 0.3 mmol) was swollen in DMF, treated with diisopropyl ethylamine (0.742 μL , 1.68 mmol) and 2-nitrobenzenesulfonyl chloride (190 mg, 0.85 mmol) in 10 mL DMF, agitated on an orbital shaker for 48 h at room temperature, filtered, and washed with DMF (3 x 15 mL), isopropyl alcohol (3 x 15 mL) and DCM (3 x 15 mL). An aliquot of resin was cleaved with 1 mL of cleaving cocktail A, filtered and evaporated to a residue, that was examined by LC-MS analysis, which showed complete conversion ($R_t = 4.33$ min (System C) $[M=]^+ m/z = 1187.5$). The resin was used in the next step without further treatment.

***N*-*o*-Nitrophenylsulfonyl-*N*-farnesyl-Ile-Leu-Gly-His(NTr)-Cit-Asp(O*t*Bu)-Tyr(O*t*Bu)-Lys(Boc) Resin 7**



The Mistunobu reaction was carried out using conditions previously reported.^{53a} In brief, resin **6** (0.3 mmol) was swollen in THF, treated with triphenylphosphine (441 mg, 1.68 mmol) and diisopropyl azodicarboxylate (DIAD, 330 μ L, 1.68 mmol) in 10 mL THF, agitated for 10 min on an orbital shaker, treated with farnesol (420 μ L, 1.68 mmol), and agitated at room temperature for 48 h. The resin was washed with DMF (3 x 15 mL), isopropyl alcohol (3 x 15 mL) and DCM (3 x 15 mL). An aliquot of resin was cleaved with 1 mL of cleaving cocktail A, filtered and evaporated to a residue, that was examined by LC-MS analysis, which showed 65% conversion ($R_t = 5.68$ min (System C), $[M+2H]^{2+}$ $m/z = 696.5$). The resin was used in the next step without further purification.

***N*-Farnesyl-Ile-Leu-Gly-His-Cit-Asp-Tyr-Lys (8)**



Resin **7** was swollen in 15 mL of DMF, treated with thiophenol (300 μ L, 2.93 mmol) and DBU (500 μ L, 3.34 mmol), agitated on an orbital shaker for 6h, filtered and washed with DMF (3 x 15 mL), isopropyl alcohol (3 x 15 mL) and DCM (3 x 15 mL). The resin was treated with cleaving cocktail A, agitated for 2h, filtered, and washed with DCM (1 x 5 mL). The filtrate and washing were combined and evaporated to an oil, which was washed with cold ether and purified by RP-HPLC (5-50% MeCN + 0.1% FA / H₂O + 0.1% FA). Freeze-drying of the collected fractions provided farnesyl peptide **8** as white solid (9.0 mg, Rt = 10.03, [M+H]⁺_{Calc.}=1206.7245; [M+H]⁺_{Found} = 1206.726], [M + 2H]²⁺_{Calc.} = 603.8659, [M + 2H]²⁺_{Found} = 603.8683, purity 89%).

Myometrial contraction preparations

Pregnant CD-1 mice (16-17 days gestation, term 19 days) were obtained from Charles River Inc. and used according to a protocol of the Animal Care Committee of Hôpital Sainte-Justine according to the principles of the Guide for the Care and Use of Experimental Animals of the Canadian Council on Animal Care. The animals were maintained on standard laboratory chow under a 12:12 light:dark cycle and allowed free access to chow and water.

Uterus from CD-1 mice was obtained from animals immediately after term delivery under anesthesia (2.5% isoflurane). Briefly, a midline abdominal incision was made, and the uterine horns were rapidly excised, cleansed carefully of surrounding connective tissues, and removed. Longitudinal myometrial strips (2 to 3 mm wide and 1 cm long) were dissected free from uterus and mounted isometrically in organ tissue baths. The initial tension was set at 2 g. The tissue baths contained 20 ml of Krebs buffer of the following composition (in mM): 118 NaCl, 4.7 KCl, 2.5 CaCl₂, 0.9 MgSO₄, 1 KH₂PO₄, 11.1 glucose, and 23 NaHCO₃ (pH 7.4). The buffer was equilibrated with 95% oxygen/5% carbon dioxide at 37°C. Isometric tension was measured by a force transducer and recorded by BIOPAC data acquisition system (**BIOPAC MP150**). Experiments were begun after 1 h equilibration. Mean tension of spontaneous contractions were measured using a BIOPAC digital polygraph system (AcqKnowledge); the same parameters were also determined after addition of PGF_{2α} in the presence or the absence of a 20 min pretreatment with different FP inhibitors.

Data analysis

At the start of each experiment, mean tension of spontaneous myometrial contractions were considered as a reference response. Changes in mean tension (g) were expressed as percentages of the initial reference response (% of baseline). All results are expressed as mean \pm SEM.

2.7 : References

1. Slattery, M. M. M., J.J., Preterm Labor. *The Lancet* **2002**, (360), 1489-1497.
2. Russell, R. B. G., N. S.; Steiner, C. A.; Meikle, S.; Howse,os, Marie-Christine; J. L.; Poschman, K.; Dias, T.; Potetz, L.; Davidoff, M. J.; Damus, K.;Petrini, J. R, Cost of hospitalization for preterm and low birth weight in infants in the United States. **2007**, (120), E1-E9.
3. Hack, M. F., D. J.; Schluchter, M.; Cartar, L.; Borawski,; E.; Klein, N., Outcomes in young adulthood for very-low-birth-weight infants. *New. Engl. J. Med.* **2002**, *346*, 149-157.
4. O'Connor, A. R. W., C.M.; Fielder, A.R., Ophthalmological problems associated with preterm birth. *Eye* **2007**, *21*, 1254-1260.
5. Marlow, M. W., D.; Bracelwell, M.A.; Samara, M., Neurologic and developmental disability at six years of age after extremely preterm birth. *New Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 9-19.
6. RichEdwards, J. W. S., M. J.; Manson, J. E.; Rosner, B.;; Hankinson, S. E. C., G. A.; Willett, W. C.; Hennekens, C. H., Birth weight and risk of cardiovascular disease in a cohort of women followed up since 1976. *Br. Med. J.* **1997**, *315*, 396-400.
7. Blencowe H, C. S., Oestergaard M, Chou D, Moller AB, Narwal R, Adler A, Garcia CV, Rohde S, Say L, Lawn JE, National, regional and worldwide estimates of preterm birth. *The Lancet* **2012**, *379*, 2126-2172.
8. Papatsonis, D. F., V.; Cole, S.; Liley, H., Oxytocin receptor antagonists for inhibiting preterm labour. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2005**, *CD004452*.
9. King, J. F. F., V.; Papatsonis, D.; Dekker, G.; Carbonne, B., Calcium channel blockers for inhibiting preterm labour; a systematic review of the evidence and a protocol for administration of nifedipine. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.* **2003**, *43*, 192-198.
10. Anotayanonth, S. S., N. V.; Garner, P.; Neilson, J. P.; Harigopal, S., Betamimetics for inhibiting preterm labour. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2004**, *CD004352*.
11. Crowther CA, H. J., Doyle LW Magnesium sulphate for preventing preterm birth in threatened preterm labour. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2002**, *CD001060*.

12. Loudon, J. A. Z. G., K.A.; Bennett, P.R., Prostaglandin inhibitors in preterm labour. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **2003**, *17*, 731-744.
13. (a) Haas, D. M. I., T. F.; Kirkpatrick, P. R.; Klein, R. W.; Zollinger, T. W.; Golichowski, A. M., Tocolytic Therapy: a meta-analysis and decision analysis. *Obstet. Gynecol.* **2009**, *113*, 585-594; (b) Simhan, H. N. C., S.N. , Prevention of Preterm Delivery. *New Engl. J. Med.* **2007**.
14. (a) Olson, D. M., The role of prostaglandins in the initiation of parturition. *Best Pract. Res., Clin. Obstet. Gynaecol.* **2003**, *17*, 717-730; (b) Olson, D. M. Z., D.B.; Shallow, M.C.; Cook, J.L.; Mitchell, B.F.; Grigsby, P.; Hirst, J., Myometrial Activation and Preterm Labour: Evidence Supporting a Role for the Prostaglandin F Receptor - A review. *Placenta* **2003**, *17*, S47-S54.
15. Sugimoto, Y. Y., A.; Segi, E.; Tsuboi, K.; Aze, Y.; Nishimura, T.; Oida, H.; Yoshida, N.; Tanaka, T.; Katsuyama, M.; Hasumoto, K.; Murata, T.; Hirata, M.; Ushikubi, F.; Negishi, M.; Ichikawa, A.; Narumiya, S., Failure of parturition in mice lacking the prostaglandin F receptor. *Science* **1997**, *277*, 681-683.
16. (a) Peri, K. G. Q., C.; Hou, X.; Abran, D.; Varma, D. R.; Lubell, W. D.; Chemtob, S., THG113: a novel selective FP antagonist that delays preterm labor. *Semin. Perinatol.* **2002**, *26*, 389-397; (b) Peri, K. P., F.; Lubell, W.; Thouin, E.; Chemtob, S. Peptides and Peptidomimetics Useful for Inhibiting the Activity of Prostaglandin F2R Receptor. 2003.
17. Presland, J., Identifying novel modulators of G protein-coupled receptors via interaction at allosteric sites. *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2005**, *8*, 567-576.
18. (a) Gokarn, Y. R.; McLean, M.; Laue, T. M., Effect of PEGylation on protein hydrodynamics. *Mol. Pharm.* **2012**, *9* (4), 762-73; (b) Moosmann, A. B., J.; Lindner, R.; Muller, E.; Bottinger, H., Aldehyde PEGylation kinetics: a standard protein versus a pharmaceutically relevant single chain variable fragment. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22* (8), 1545-58.
19. (a) Roberts, M. J. B., M.D.; Harris, J.M., Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Adv. Drug Del. Rev.* **2002**, *54*, 459-476; (b) Ryan, S. M.; Mantovani, G.; Wang, X.; Haddleton, D. M.; Brayden, D. J., Advances in PEGylation of important biotech molecules: delivery aspects. *Exoert Opin. Drug Deliv.* **2008**, *5*, 371-383.
20. Bailon, P.; Palleroni, A.; Schaffer, C. A.; Spence, C. L.; Fung, W. J.; Porter, J. E.; Ehrlich, G. K.; Pan, W.; Xu, Z. X.; Modi, M. W.; Farid, A.; Berthold, W.; Graves, M., Rational design of a potent, long lasting form of interferon: a 40kDa branched poly-ethylene glycol-

conjugated interferon alpha-2a for the treatment of hepatitis C. *Bioconjug. Chem.* **2001**, *12*, 195-202.

21. Trainer, P. J. *e. a.*, Treatment of Acromegaly with the Growth Hormone-Receptor Antagonist Pegvisomant. *N. Engl. J. Med.* **2000**, *342*, 1171-1177.

22. (a) Wang, J. H., D.J.; Tran, M.; Li, W.Y.; Yoshimura, R.F.; Johnstone, T.B.C.; Shen, W.C.; Gee, K.W., Reversible Lipidization for the Oral Delivery of leu-enkephalin. *J. Drug Target.* **2006**, *14*, 127-136; (b) al-Obeidi F, H. V., Yaghoubi N, Marwan MM, Hadley ME., Synthesis and biological activities of fatty acid conjugates of a cyclic lactam alpha-melanotropin. *J Med. Chem.* **1992**, *35*, 118-123.

23. Ward, B. P.; Ottaway, N. L.; Perez-Tilve, D.; Ma, D.; Gelfanov, V. M.; Tschop, M. H.; Dimarchi, R. D., Peptide lipidation stabilizes structure to enhance biological function. *Molecular metabolism* **2013**, *2* (4), 468-79.

24. Hadley, M. E.; F., A.-O.; V.J., H.; Weinrach, J. C.; Freedberg, D.; Jiang, J.; Stover, R. S., Biological Activities of Melanotropic Peptide Fatty Acid Conjugates. *Pigment Cell Res.* **1991**, *4*, 180-185.

25. Wright, T. H. B., A. E.; Didsbury, A. J.; Williams, G. M.; Harris, P. W.; Dunbar, P. R.; Brimble, M. A., Direct peptide lipidation through thiol-ene coupling enables rapid synthesis and evaluation of self-adjuvanting vaccine candidates. *Angew. Chem.* **2013**, *52* (40), 10616-9.

26. (a) Rezler, E. M.; Khan, D. R.; Lauer-Fields, J.; Cudic, M.; Baronas-Lowell, D.; Fields, G. B., Targeted Drug Delivery Utilizing Protein-Like Molecular Architecture. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4961-4972; (b) Versluis, F.; Voskuhl, J.; van Kolck, B.; Zope, H.; Bremmer, M.; Albrechtse, T.; Kros, A., In situ modification of plain liposomes with lipidated coiled coil forming peptides induces membrane fusion. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (21), 8057-62.

27. Johannessen, L.; Remsberg, J.; Gaponenko, V.; Adams, K. M.; Barchi, J. J., Jr.; Tarasov, S. G.; Jiang, S.; Tarasova, N. I., Peptide structure stabilization by membrane anchoring and its general applicability to the development of potent cell-permeable inhibitors. *Chem. Bio. Chem.* **2011**, *12* (6), 914-21.

28. (a) Cox, A. D. a. D., C.D., Protein prenylation: more than just glue? *Curr. Opin. Cell Biol.* **1992**, *4*, 1008-1016; (b) Lane, K. T.; Beese, L. S., Thematic review series: lipid posttranslational modifications. Structural biology of protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase type I. *J. lipid res.* **2006**, *47* (4), 681-99; (c) London, N.; Lamphear, C.

- L.; Hougland, J. L.; Fierke, C. A.; Schueler-Furman, O., Identification of a novel class of farnesylation targets by structure-based modeling of binding specificity. *PLoS comput. Biol.* **2011**, *7* (10), e1002170; (d) Marshell, C. J., Protein prenylation: a mediator of protein-protein interactions. *Science* **1993**, *259*, 1865-1866.
29. Ochocki, J. D.; Igbavboa, U.; Gibson Wood, W.; Wattenberg, E. V.; Distefano, M. D., Enlarging the scope of cell-penetrating prenylated peptides to include farnesylated 'CAAX' box sequences and diverse cell types. *Chem. Biol. Drug Des.* **2010**, *76* (2), 107-15.
30. Shen, G.; Huhman, D.; Lei, Z.; Snyder, J.; Sumner, L. W.; Dixon, R. A., Characterization of an isoflavonoid-specific prenyltransferase from *Lupinus albus*. *Plant physiology* **2012**, *159* (1), 70-80.
31. (a) Benfenati, E.; Gini, G.; Piclin, N.; Roncaglioni, A.; Vari, M. R., Predicting logP of pesticides using different software. *Chemosphere* **2003**, *53* (9), 1155-1164; (b) Medié-Sarié, M.; Mornar, A.; Badovinac-Crnjević, T.; Jasprica, I., Experimental and Calculation Procedures for Molecular Lipophilicity: A Comparative Study for 3,3'-(2-Methoxybenzylidene)bis(4-hydroxycoumarin). *Croatica Chemica Acta* **2004**, *77*, 367-370.
32. Lubell, W. D.; BLankenship, J. W.; Fridkin, g.; Kaul, R., Peptides. *Science of Synthesis* **2005**, *21.11* (Chemistry of Amides), 713-809.
33. Roberts, M. J.; Bentley, M. D.; Harris, J. M., Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Adv. Drug Del. Rev.* **2002**, *54*, 459-476.
34. (a) Arya, P. W., C.Q.; Barnes, M.L.; Darowska, M., A Solid Phase Library Synthesis of Hydroxyindoline-Derived Tricyclic Derivatives by Mitsunobu Approach. *J. Comb. Chem.* **2004**, *6*, 65-72; (b) Bisegger, P.; Manov, N.; Bienz, S., Solid-phase synthesis of cyclic polyamines. *Tetrahedron* **2008**, *64* (32), 7531-7536; (c) Lencina, C. L.; Dassonville-Klimpt, A.; Sonnet, P., New efficient enantioselective synthesis of 2-oxopiperazines: a practical access to chiral 3-substituted 2-oxopiperazines. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19* (14), 1689-1697; (d) Tumkevicius, S.; Masevicius, V.; Petraityte, G., 4-Amino-5-(arylaminoethyl)-2-(methylthio)furo[2,3-d]pyrimidines via Mitsunobu Reaction of 4-Amino-5-(hydroxymethyl)-2-(methylthio)furo[2,3-d]pyrimidine with N-Mesyl- and N-Nosylarylamines. *Synthesis* **2012**, *44* (09), 1329-1338.

35. Ying, J.; Gu, X.; Cai, M.; Dedek, M.; Vagner, J.; Trivedi, D. B.; Hruby, V. J., Design, Synthesis, and Biological Evaluation of New Cyclic Melanotropin Peptide Analogues Selective for the Human Melanocortin-4 Receptor. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6888-6896.
36. Goupil, E. T., D.; Bourguet, C.; Quiniou, C.; Wischart, V.; Petrin, D.; Le Gouill, C.; Devost, D.; Zingg, H. H.; Bouvier, M.; Saragovi, H. U.; Chemtob, S.; Lubell, W. D.; Claing, A.; Hebert, T. E.; Laporte, S. A., A novel biased allosteric compound inhibitor of parturition selectively impedes the prostaglandin F₂α-mediated Rho/ROCK signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (33), 25624-36.
37. O'Brien, M.; Morrison, J. J.; Smith, T. J., Expression of prothrombin and protease activated receptors in human myometrium during pregnancy and labor. *Biol. Reprod.* **2008**, *78* (1), 20-6.
38. Hurd, C. D.; Meinert, R. N., Propionaldehyde. *Organic Syntheses* **1943**, *Coll. Vol. 2*, 541.
39. Kovtunov, K. V.; Barskiy, D. A.; Salnikov, O. G.; Khudorozhkov, A. K.; Bukhtiyarov, V. I.; Prosvirin, I. P.; Koptyug, I. V., Parahydrogen-induced polarization (PHIP) in heterogeneous hydrogenation over bulk metals and metal oxides. *Chem. Comm.* **2014**, *50* (7), 875-8.
40. Polshettiwar, V. V., R.S., Nanoparticle-supported and magnetically recoverable palladium (Pd) catalyst: a selective and sustainable oxidation protocol with high turnover number *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 37-40.
41. (a) Undecanal 1H-NMR. SDBS No. 6992HSP-01-716 ; (b) Inokuchi, T.; Matsumoto, s.; Nishiyama, T.; Torii, S., A Selective and Efficient Method for Alcohol Oxidations Mediated by N-Oxoammonium Salts in Combination with Sodium Bromite. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 462-466.
42. Vertegaal, L. B. J. V. D. G., A., Acid-Catalyzed Solvolysis of Polyenol Ethers. II. Effect of the Degree of Insaturations. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 7301-7312.
43. Marukawa, K. T., H.; Mori, K., Synthesis of the Enantiomer of Some Methyl-branched Cuticular Hydrocarbons of the Ant, *Diacamma* sp. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *62*, 305-314.
44. Khan, A. A.; Chee, S. H.; Stocker, B. L.; Timmer, M. S. M., The Synthesis of Long-Chain α-Alkyl-β-Hydroxy Esters Using Allylic Halides in a Fráter-Seebach Alkylation. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012* (5), 995-1002.
45. Gude, M. R., J.; White, P.D., An accurate method for the quantitation of Fmoc-derivatized solid phase supports. *Lett. Pept. Sci.* **2002**, *9*, 203-206.

2.8 : Contribution des co-auteurs

J'ai effectué l'ensemble des manipulations comprenant les synthèses, les purifications et les caractérisations. J'ai aussi été amené à participer activement au développement des méthodologies. J'ai aussi participé à la rédaction de l'article en écrivant la version originale de l'introduction, de la partie expérimentale et des résultats.

Les tests biologiques ont été effectués par Dr Xin Hou, sous la supervision de professeur Sylvain Chemtob. Il a aussi participé à la rédaction de la partie expérimentale relative aux manipulations biologiques.

Le professeur William D. Lubell a supervisé les travaux de synthèses, apporté une contribution significative au développement des méthodologies et participé à la rédaction de l'article en effectuant les corrections qu'il jugeait nécessaires à l'ensemble du texte.

Chapitre 3

Conclusion et perspectives

3.1 : Travaux futurs

L'étude présentée a permis la découverte du peptide **5b**, actif dans l'essai d'inhibition des contractions myométriales induites par la prostaglandine F2 α . L'introduction d'une chaîne dodécyle sur l'amine terminale du peptide a potentiellement accru sa résistance à la dégradation enzymatique et sa stabilité métabolique tout en laissant possible la liaison du peptide à son site actif sans avoir à être clivée par voie métabolique.^{44a} Le peptide comportant une chaîne undécyle a été synthétisé, et est en voie d'être testé dans le même essai, dans le but de sonder l'activité de peptides ayant un logP similaire au composé **5b**.

Afin de confirmer le gain de stabilité envers la dégradation enzymatique, un test de stabilité au sérum⁷⁸ de souris comparant le peptide **1** au **5b** sera effectué.

Pour ce faire, le peptide est incubé en présence de sérum de souris dans plusieurs aliquots. À certains temps prédéterminés, la réaction est stoppée par l'ajout d'un volume d'acétonitrile contenant une quantité bien précise d'étalon interne (qui peut être un des analogues inactifs donnant un signal MSD connu) pour précipiter les protéines. Après centrifugation, le surnageant est évaporé et le résidu dissous dans un volume connu d'un solvant composé d'acétonitrile et d'eau dans des proportions correspondant aux conditions initiales de l'analyse LC-MS. Les différents aliquots sont injectés en LCMS en mode SIM (« single ion monitoring ») en utilisant une méthode prédéterminée. Les rapports du signal du peptide (qui diminue avec la dégradation) et du signal de l'étalon interne (qui reste fixe tout au long de l'expérience) sont mesurés et portés dans un graphique. La courbe obtenue permet de suivre la dégradation du peptide dans le temps.⁷⁹ En comparant cette dernière à la courbe de dégradation du peptide non alkylé, on peut observer quantitativement l'effet de la N-alkylation sur la stabilité plasmique.

Comme le peptide L-**5b** est celui qui a démontré la plus grande activité dans l'essai tissulaire, la prochaine étape de son évaluation pharmacologique sera de vérifier si ses effets protecteurs contre les contractions du myomètre induites à la prostaglandine F2 α s'étendent à un modèle animal. Le choix logique serait la souris, puisque ces animaux présentent de nombreux avantages comme modèle de première ligne pour les accouchements prématurés. En effet, leur faible coût, le fait que seules de petites quantités de produits soient nécessaires pour produire leur effet, leur bonne tolérance à la chirurgie et la facilité relative avec laquelle ils peuvent être manipulés génétiquement en font les animaux parfaits pour une première étude animale.⁸⁰

S'il s'avérait qu'il y ait une activité chez la souris, cela donnerait la possibilité d'explorer les différentes voies d'administration possibles pour ce composé. Bien qu'il serait surprenant qu'un peptide linéaire L, fut-il N-alkylé, atteigne la circulation systémique après une administration *per os*, survivant ainsi au premier passage hépatique,⁸¹ d'autres voies d'administration, par exemple les voies transdermale⁸² (avec un timbre cutané), ou intravaginale⁸³ (avec un suppositoire) pourraient permettre d'offrir une alternative à l'injection intraveineuse.

Une voie d'administration alternative pourrait se voir cruciale pour fournir un composé pouvant remplir un rôle préventif auprès d'une clientèle défavorisée et n'ayant potentiellement pas d'accès sécuritaire à la voie intraveineuse.

D'autre part, une voie alternative est aussi essentielle à l'éventuelle utilisation du composé pour traiter d'autres maux associés aux contractions utérines non désirées, notamment les crampes menstruelles (dysménorrhées), qui représenteraient un marché énorme. En effet, environ deux tiers des adolescentes sont affectées.⁸⁴ L'implication des prostaglandines F2 α est

reconnue, à la fois chez les adolescentes (type primaire) et chez les femmes plus âgées (type secondaire) qui continuent à souffrir de dysménorrhées.⁸⁵

Le traitement ordinairement prescrit consiste normalement en un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS), traitement qui n'est pas efficace chez plusieurs patientes et comporte son lot d'effets secondaires.⁸⁶ Avoir un traitement alternatif, à la fois efficace et sélectif, serait révolutionnaire pour le traitement des dysménorrhées. Le PDC-31 a déjà montré un potentiel à traiter les dysménorrhées primaires, mais doit être administré sous forme d'infusion.⁸⁷

La purification de peptides amphiphiles s'est avérée difficile. Les peptides comportant une portion lipophile (trois derniers acides aminés et chaîne alkyle) et une portion chargée (acide carboxylique terminale et résidus chargés) ont un comportement amphiphile (Figure 1). Une illustration de ce comportement peut être observée (Figure 2). Dans un solvant ionisant, le composé **5b** forme une émulsion lorsqu'agit.

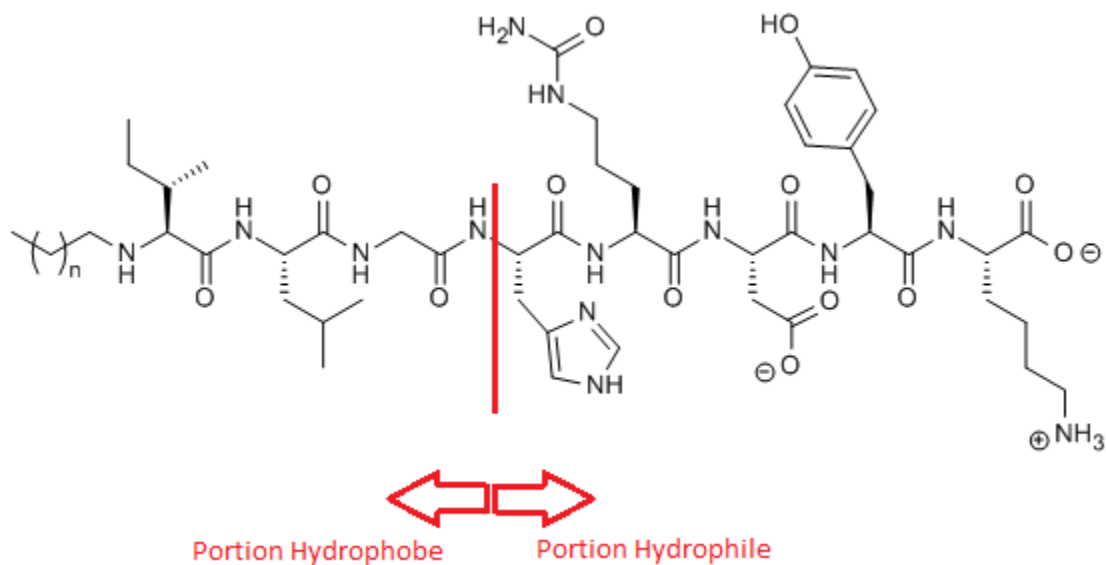
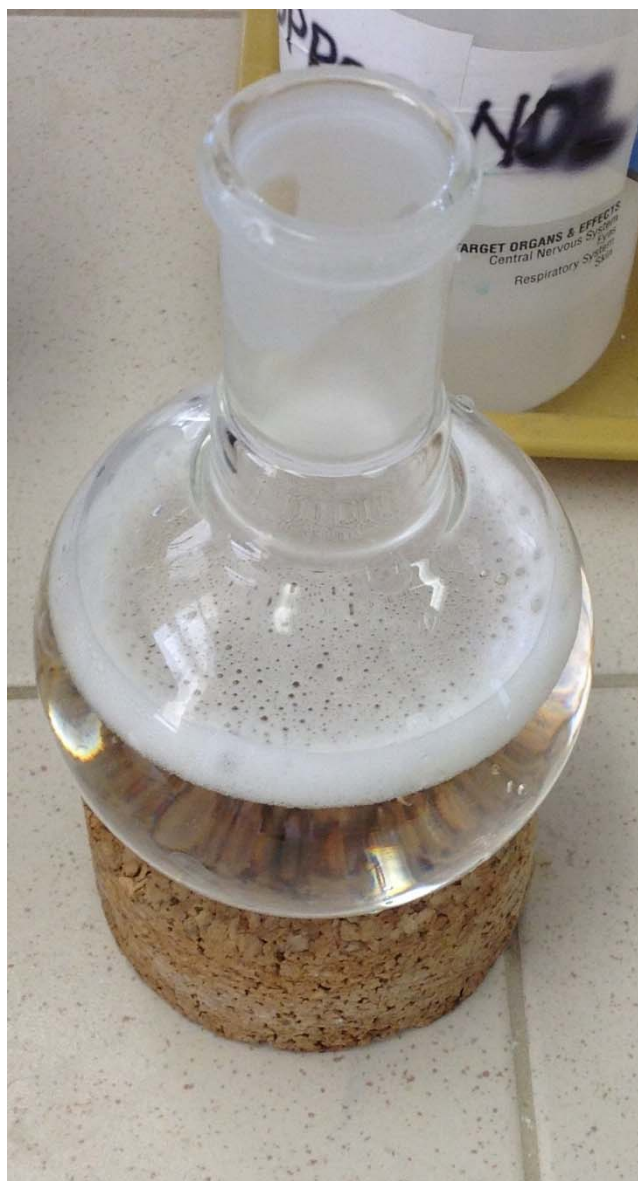


Figure 1: Comportement amphiphile des peptides alkylés



*Figure 2: Peptide **5b** dans un mélange eau :acétonitrile*

Les colonnes utilisées (Synergi Polar-RP et Gemini C18. Phenomenex) n'ont pas permis de développer des conditions de purification idéales et la faible absorbance du peptide dans l'UV a rendu l'exercice ardu. Une séparation par SFC fut tentée pour le composé **5b**, mais aucune condition d'élution n'a permis de l'éluer de manière satisfaisante, probablement en raison de la forte polarité de la portion C-terminale.

D'autres types de colonnes ont été utilisés par certains auteurs pour purifier des peptides amphiphiles, comme une colonne C-8 qui pourrait potentiellement offrir une meilleure séparation des molécules d'intérêt. ⁸⁸

3.2 : Conclusions

Le peptide L (L-1), énantiomère du peptide D (D-1), ne possède aucune activité dans l'essai tissulaire *ex vivo*, probablement en raison de sa faible stabilité métabolique.

Des modifications étudiées dans le but d'accroître la stabilité métabolique du peptide, soit la lipitation, la PEGylation et la farnesylation, seule la lipitation a permis l'obtention d'un composé comportant une activité statistiquement significative dans l'essai tissulaire de contractions myométriales induites à la prostaglandine F_{2α}.

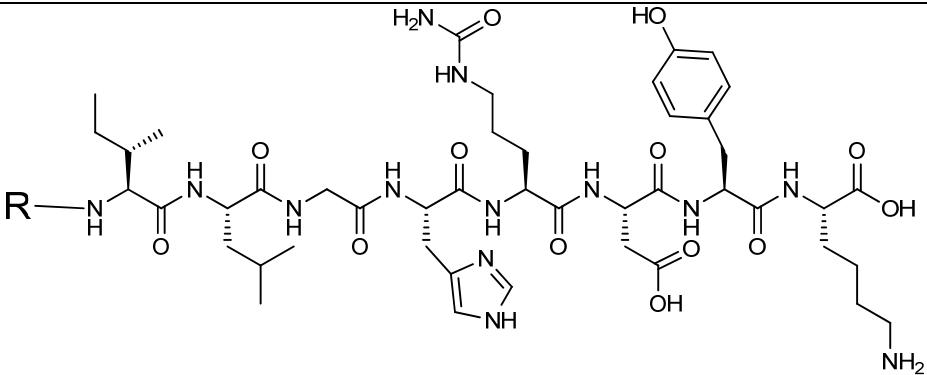
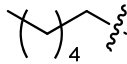
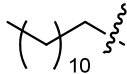
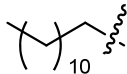
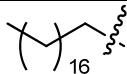
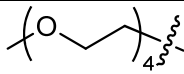
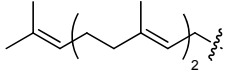
|  | | |
|--|---|-----------------------|
| Peptide | Chaîne latérale (R) | Méthode de synthèse |
| L-1 | H | SPPS |
| 5a |  | Amination Réductrice |
| L-5b |  | Amination Réductrice |
| D-5b |  | Amination Réductrice |
| 5c |  | Amination Réductrice |
| 5d |  | Amination Réductrice |
| 8 |  | Réaction de Mitsunobu |

Tableau 1 : Peptides synthétisés et méthode de synthèse.

Un seul composé s'est avéré posséder une activité quantifiable. Le peptide L-**5b**, avec sa chaîne de 12 carbones présentait une activité statistiquement significative, et ce résultat fut validé en répétant la synthèse et les tests biologiques. Les composés **5a** et D-**5b** ont montré une tendance, mais ne présentaient pas d'activité statistiquement significative. Des essais cellulaires impliquant un plus grand nombre de répliques pourraient toutefois permettre de quantifier leurs effets relatifs (ou l'absence d'effet).

Dans le cas du peptide D-**5b**, la lipodation a considérablement réduite l'activité en comparaison à l'analogue non-alkylé (PDC-31). En effet, le peptide D étant déjà stable métaboliquement, l'ajout de la chaîne alkyle n'apporte pas de stabilisation supplémentaire. La présence de la chaîne peut toutefois gêner la liaison entre le peptide et le récepteur, ce qui peut expliquer la perte d'activité.

Par contre, pour le peptide L, qui n'a aucune activité dans l'essai tissulaire, l'ajout d'une chaîne alkyle permet de former un composé modérément actif (L-**5b**).

Il est possible que la N-lipodation permet d'augmenter la stabilité métabolique du peptide, tout en permettant la liaison de ce dernier au site allostérique du récepteur FP. La longueur de la chaîne semble avoir un effet protecteur, comme le montre le gain d'activité entre les composés possédant des chaînes de 6 et 12 carbones (**5a** et **5b**), dans la mesure où la lipophilicité du composé n'est pas trop augmentée.

L'ajout d'un adduit PEG ou farnesyle ont respectivement donnés les composés **5d** et **8**, tous deux inactifs dans l'essai de contractions myométriales.

Le composé **5c**, avec sa chaîne de 18 carbones, s'est aussi avéré inactif, probablement en raison de sa faible hydrophilicité qui implique une solubilité aqueuse inférieure aux autres composés.

Des deux méthodologies développées afin d'alkylation l'amine terminale avec un alcool, la première, soit l'oxydation suivie par l'amination réductrice à l'avantage de se faire en une seule étape. Elle est toutefois limitée quant aux chaînes pouvant être ajoutées, qui doivent pouvoir former un aldéhyde suffisamment stable et réactif. Certains aldéhydes particulièrement volatils mèneront à l'obtention d'un mélange de produits (peptide non-alkylé, mono-alkylé et bisalkylé) probablement parce qu'ils restent piégés par la résine et ne peuvent complètement être enlevés par lavage.

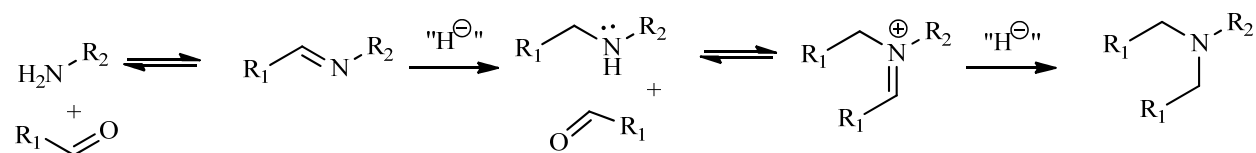


Schéma 1: Mécanisme de bisalkylation passant par l'intermédiaire iminium.

De plus, les aldéhydes conjugués mènent à l'obtention d'imines conjuguées ne pouvant pas être réduites avec des réactifs de type borohydrure.

La deuxième méthode, soit la réaction de Mitsunobu entre l'alcool et l'amine portant un groupement *O*-NBS, a l'avantage d'être plus versatile et d'accommoder une plus vaste gamme de substrats. Par cette méthode, il n'y a pas de risque de double alkylation. Toutefois, elle

nécessite plus d'étapes (installation et clivage du groupement *O*-NBS) et de temps (voir chapitre 2, schéma 3).

Finalement, bien que la PEGylation et la farnesylation se sont avérées inefficaces à améliorer l'activité du peptide L-1, soit parce qu'elles ne protégeaient pas suffisamment le peptide contre l'activité protéolytique, ou parce qu'elles ne permettaient pas la liaison avec le site actif ou encore parce qu'elles accélèrent l'élimination par d'autres mécanismes, la lipodation a permis d'identifier quelques composés à l'activité prometteuse.

Les composés L-5b et D-5b, avec leurs chaînes docécyle, se sont avérés avoir des activités comparables. Dans le cas du peptide L, la modification a permis d'accroître sa résistance à la dégradation enzymatique tout en permettant la liaison avec le site actif, donnant un composé à l'activité significative. Dans le cas du peptide D, il s'agit d'une perte d'activité par rapport à la version non-alkylée (PDC-31), ce qui est explicable par le fait que ce peptide était déjà métaboliquement stable, et qu'il n'a vraisemblablement pas bénéficié d'un gain de stabilité métabolique. La présence de la chaîne alkyle pourrait toutefois nuire à la liaison avec le récepteur, ce qui donne un composé alkylé moins actif.

Néanmoins, le peptide L-5b pourrait s'avérer une alternative plus rentable au PDC-31, surtout dans la mesure où il peut être produit à l'aide d'installations relativement simples, par une procédure en majeure partie automatisée, et à partir de composants peu coûteux et disponibles commercialement. La présence de la chaîne alkyle pourrait aussi s'avérer utile pour d'autres méthodes d'administration que la voie parentérale.

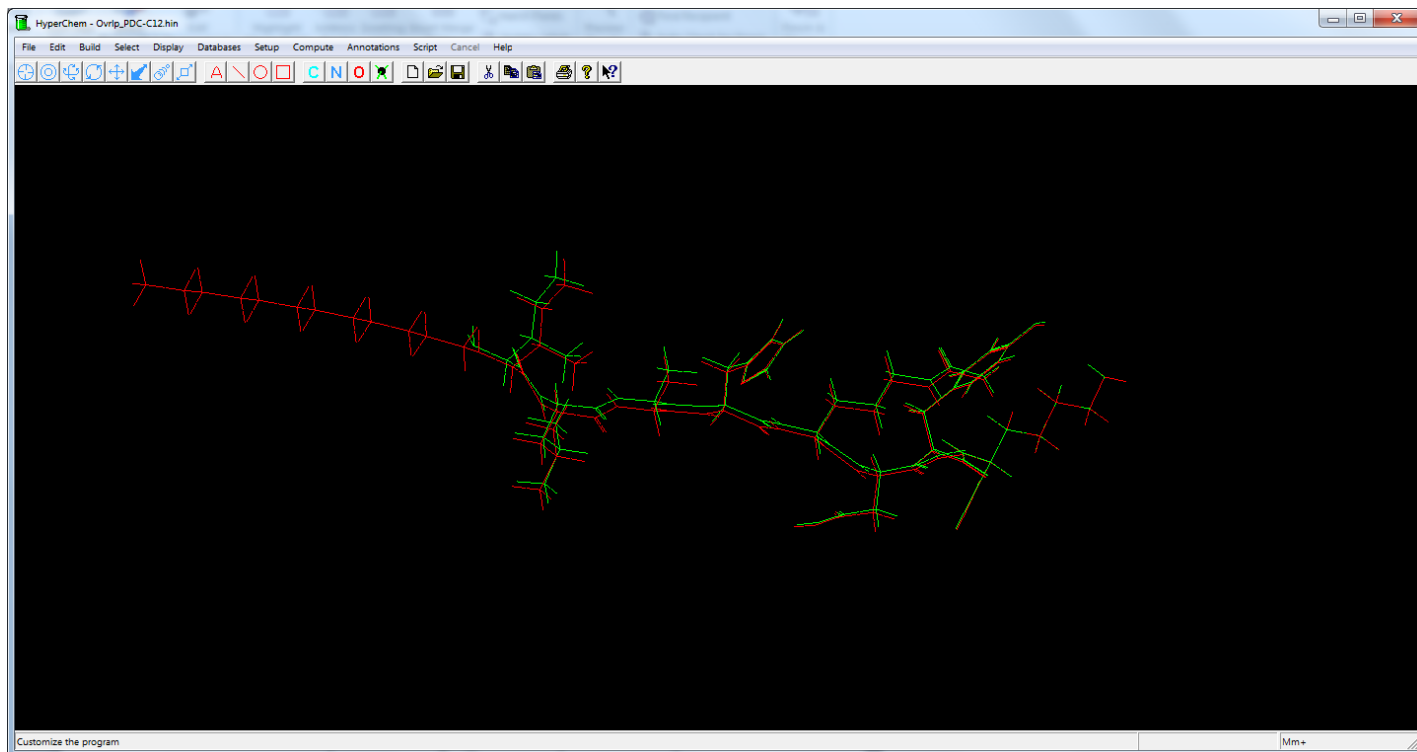
3.3 : Références

1. Wang, J. H., D.J.; Tran, M.; Li, W.Y.; Yoshimura, R.F.; Johnstone, T.B.C.; Shen, W.C.;Gee, K.W., Reversible Lipidization for the Oral Delivery of leu-enkephalin. *J. Drug Target.* **2006**, *14*, 127-136.
2. (a) Di, L.; Kerns, E. H.; Hong, Y.; Chen, H., Development and application of high throughput plasma stability assay for drug development. *Int. J. Pharm.* **2005**, *297*, 110-119; (b) Jenssen, H.; Aspino, S. I., Serum stability of peptides. *Methods Mol. Biol.* **2008**, *494*, 177-186.
3. Kailasam, S.; Frost, K. Rapid method development to study plasma stability of diverse pharmaceutical compounds using Rapid Resolution LC and triple quadrupole MS. 2009.
4. Elovitz, M. A.; Mrinalini, C., Animal models of preterm birth. *Trends endocrinol. Metab.* **2004**, *15* (10), 479-87.
5. Hamman, J. H.; Enslin, G. M.; Kotzé, A. F., Oral delivery of peptide drugs: barriers and developments. *BioDrugs* **2005**, *19*, 165-177.
6. (a) Herwadkar, A.; Banga, A. K., Peptide and protein transdermal drug delivery. *Drug discov. today. Technol.* **2012**, *9* (2), e71-e174; (b) Bodde, H. E.; Verhoef, J. C.; Ponec, M., Transdermal peptide delivery. *Biochem. Soc. Trans.* **1989**, *5*, 943-945; (c) Schuetz, Y. B.; Naik, A.; Guy, R. H.; Kalia, Y. N., Emerging strategies for the transdermal delivery of peptide and protein drugs. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2005**, *2*, 533-548.
7. Choudhury, A.; Das, S.; Kar, M., A Review on Novelty and Potentiality of Vaginal Drug Delivery. *Int. J. Pharm. Tech. Res.* **2011**, *3*, 1033-1044.
8. Sharma, P.; Malhotra, C.; Taneja, D. K.; Saha, R., Problems related to menstruation amongst adolescent girls. *Indian J. Pediatr.* **2008**, *75*, 125-129.
9. Spilman, C. H.; Duby, R. T., Prostaglandin mediated luteolytic effect of an intrauterine device in sheep. *Prostaglandins* **1972**, *2*, 159-168.
10. Marjoribanks, J.; Proctor, M.; Farguhar, C.; Derks, R. S., Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for dysmenorrhoea. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2010**, *1*, CD001751.
11. GmbH, P. B., PDC Biotech GmbH announces successful clinical Phase I for its lead compound PDC31. <http://www.pdcbiotech.com/PressRelease-Dec102012.pdf>, 2012.
12. Yu, Y.-C.; Berndt, P.; Tirrell, M.; Fields, G. B., Self-Assembling Amphiphiles for Construction of Protein Molecular Architecture. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12515-12520.

Annexe

Superposition des structures minimisées

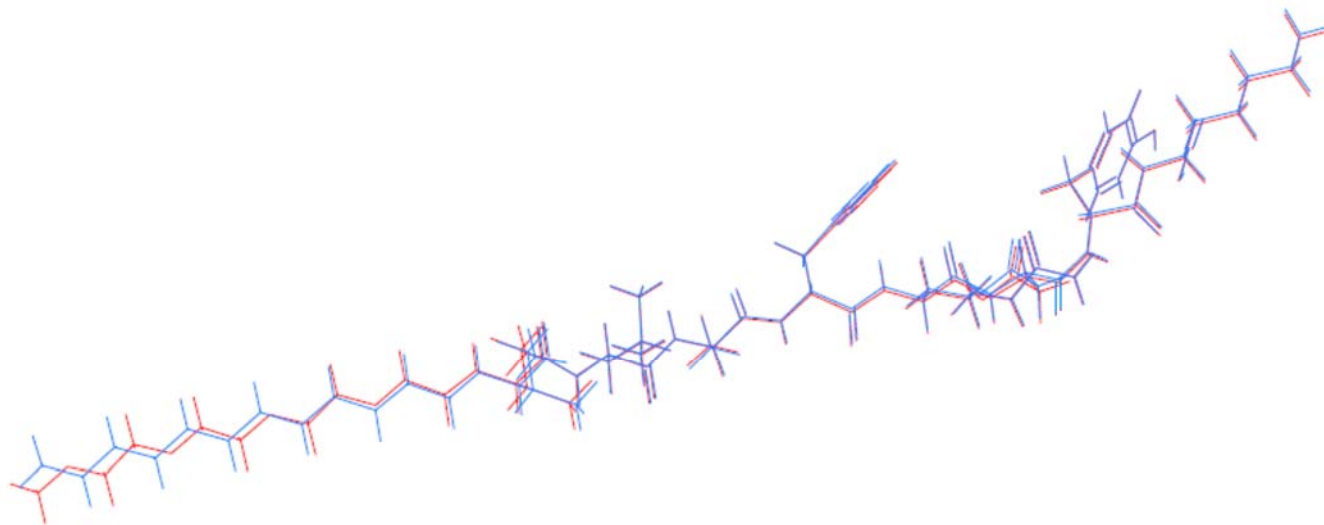
Annexe 1 : Superposition des structures minimisées du peptide non-alkylé et d'un peptide alkylé



L-PDC-31 (vert) et L-5b (rouge)(Hyperchem 8.0, Algorithme Polak-Ribiere)

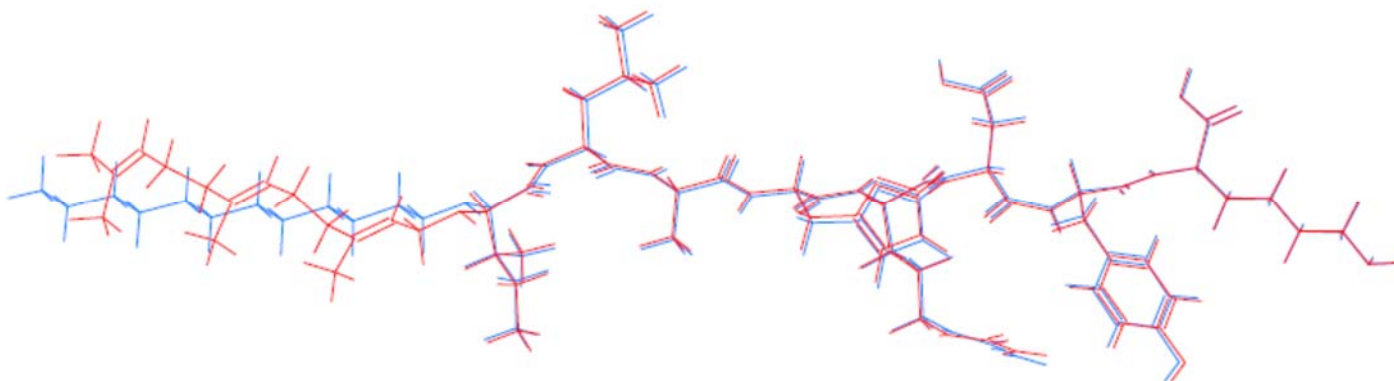
Annexe 2 : Superposition de structures minimisées de différents peptides alkylés

a)



L-5b (Bleu) et 5d (rouge) (Hyperchem 8.0, Algorithme Polak-Ribiere)

b)



L-5b (bleu) et 8 (rouge) (Hyperchem 8.0, Algorithme Polak-Ribiere).

