

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**Nouvelles stratégies de synthèse d'antagonistes de l'endotheline-1 et leurs
Caractérisations pharmacologiques *in vitro* et *in vivo***

par

JEAN-PHILIPPE BROSSEAU

Département de pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

mai 2006



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-25961-0

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-25961-0

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	iii
LISTE DES PUBLICATIONS.....	v
LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	ix
RÉSUMÉ.....	xii
 INTRODUCTION.....	 1
1 Axe endothélinergique.....	1
1.1 Historique.....	1
1.2 Biosynthèse et sécrétion	4
1.3 Récepteurs et signalisation intracellulaire.....	7
2 BQ-123 et BQ-788.....	11
2.1 Découverte.....	11
2.2 Profil pharmacologique.....	14
2.3 Relation structure-activité.....	16
2.4 Stratégies de synthèse.....	26
2.5 Exemple de synthèse d'urée encombrée.....	33
3 Peptides fluorescents.....	35
4 Modèles animaux pour la caractérisation pharmacologique.....	38
4.1 <i>In vitro</i>	38
4.1.1 Artère carotide de lapin.....	38
4.1.2 Artère pulmonaire de lapin.....	39

4.2 <i>In vivo</i>	40
4.2.1 La souris anesthésiée.....	40
5 Buts et objectifs de l'étude.....	40
MÉTHODOLOGIE.....	43
RÉSULTATS.....	56
<i>Article 1</i> Development of an efficient strategy for the ET _B receptor antagonist BQ-788 and some related analogues.....	56
<i>Résultats supplémentaires</i> Développement d'antagonistes peptidiques fluorescents et sélectifs pour les récepteurs ET _A et ET _B de l'endothéline.....	87
DISCUSSION.....	102
1 Nouvelle stratégie de synthèse du BQ-123.....	102
2 Nouvelle stratégie de synthèse du BQ-788.....	103
3 Design et synthèse des analogues non-fluorescents et fluorescents du BQ-123 et du BQ-788.....	105
4 Activités biologiques du BQ-123, BQ-788 et nouveaux analogues.....	110
CONCLUSIONS.....	115
REMERCIEMENTS.....	117
BIBLIOGRAPHIE.....	118

LISTE DES PUBLICATIONS

Pour ce mémoire :

Brosseau J.-P., D'Orléans-Juste P. et Neugebauer W.A. (2005). Development of an efficient strategy for the synthesis of the ET_B receptor antagonist BQ-788 and some related analogues.

Peptides 26:1441-53.

Autres travaux:

Brosseau J.-P., Neugebauer W.A., Cadieux A. et D'Orléans-Juste P. A new strategy towards a high yield synthesis of the ET_B antagonist BQ-788. Dans M. Flegel, M. Fridkin, C. Gilon et J.

Slaninova (Eds): Peptides 2004. Prague (2004) p. 317-318.

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Introduction

Figure 1	Biosynthèse de l'ET-1 mature à partir du précurseur préproET-1.....	6
Figure 2	Voies de signalisations intracellulaires des récepteurs ET _A et ET _B	10
Tableau I	Séquence des acides aminés des endothélines et sarafotoxine S6b.....	3
Tableau II	Première série de relation structure-activité du BQ-123 (Ishikawa <i>et al.</i> , 1992).....	19
Tableau III	Deuxième série de relation structure-activité du BQ-123 (Fukami <i>et al.</i> , 1995, 1996).....	19
Schéma 1	Développement du BQ-123 et BQ-788 chez Banyu Pharmaceuticals.....	13
Schéma 2	Série de relation structure-activité du résidu 3 du BQ-788 (Ishikawa <i>et al.</i> , 1993).....	21
Schéma 3	Série de relation structure-activité du résidu 1 du BQ-788 (Ishikawa <i>et al.</i> , 1993).....	22
Schéma 4	Série de relation structure-activité du N-terminal du BQ-788 (Ishikawa <i>et al.</i> , 1993).....	23
Schéma 5	Série de relation structure-activité du résidu 2 du BQ-788 (Ishikawa <i>et al.</i> , 1993).....	24
Schéma 6	Série de relation structure-activité C-terminal du BQ-788 (Ishikawa <i>et al.</i> , 1993).....	25
Schéma 7	Synthèse du BQ-123 (Neugebauer <i>et al.</i> , 1996).....	28

Schéma 8	Synthèse du BQ-788 (Ishikawa <i>et al.</i> , 1993).....	30
Schéma 9	Synthèse du BQ-788 (He <i>et al.</i> , 1995).....	32
Schéma 10	Synthèse d'urée très encombré (Streith <i>et al.</i> , 1995).....	34

Article1

Figure 1	Structure de BQ-788.....	58
Schéma 1	Synthèse de Boc-Mle-D-Trp(COOMe)-D-Nle-ONBzl.....	74
Schéma 2	Synthèse de l'urée encombré 10 et subséquemment de BQ-788.....	74
Schéma 3	Synthèse de BQ-788 et analogues.....	76
Tableau 1	Affinités apparentes (valeur de pD_2 ou pA_2) de certains agonistes et antagonistes dans les artères carotide et pulmonaire de lapin.....	77
Tableau 2	Vue d'ensemble des étapes-clés et stratégies utilisées pour la synthèse du BQ-788.....	82

Supplément

Figure 3	Effets du BQ-123 sur l'augmentation de la variation maximale de pression artérielle induite par l'ET-1 chez les souris C57BL/6.....	98
Figure 4	Effet de BDN-123NF et BDN-123NLF sur l'augmentation de la pression artérielle moyenne induite par l'Ang II chez les souris C57BL/6.....	99
Figure 5	Effets du BQ-788 sur l'augmentation de la variation maximale de pression artérielle induite par l'IRL 1620 chez les souris CD-1.....	100
Figure 6	Effets du BDN-788NF sur l'augmentation de la variation maximale de pression induite par l'Ang II chez les souris CD-1.....	101

Tableau V	Affinité apparente d'agoniste (pD_2) et d'antagoniste (pA_2) des récepteurs de l'endothéline dans les artères carotide et pulmonaire de lapin.....	96
Schéma 11	Synthèse de BDN-123N et BDN-123NF, analogues du BQ-123.....	90
Schéma 12	Synthèse de BDN-123NL et BDN-123NLF, analogues du BQ-123.....	91
Schéma 13	Synthèse de BDN-788N et BDN-788NF, analogues du BQ-788.....	93
Schéma 14	Synthèse de BDN-788NL et BDN-788NLF, analogues du BQ-788.....	94

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Les abréviations des acides aminés et des peptides suivent les recommandations des commissions IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) et IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) de 1992.

Acétylcholine.....	(ACh)
Acétonitrile.....	(MeCN)
Acide aminocaproïque.....	(H-ε-Acp-OH)
Acide (2S,4S)-4-aminopyrrolidine-2-carboxylique.....	(H-Apro-OH)
Acide aminoundécanoïque.....	(H-Aua-OH)
Acide arachidonique.....	(AA)
Acide trifluoroacétique.....	(TFA)
Adénosine monophosphate cyclique.....	(AMPc)
Adénylate Cyclase.....	(AC)
Angiotensine II.....	(Ang II)
<i>N,N</i> -Carbonyldiimidazole.....	(CDI)
Chaîne légère de la myosine.....	(clm)
Chloroforme.....	(CHCl ₃)
Chlorure d'hydrogène 1 normal dans l'eau.....	(HCl _(aq))
Chlorure d'hydrogène dans l'éther éthylique.....	(HCl/éther)
Chlorure d'hydrogène dans le dioxane.....	(HCl/dioxane)
Chromatographie liquide à haute pression.....	(HPLC)
Chromatographie sur couche mince.....	(CCM)
Cyclooxygénase.....	(COX)
Diacylglycérol.....	(DAG)
1,8-Diazabicyclo[5.4.0.]undec-7-ène.....	(DBU)
Dichlorométhane.....	(DCM)
Diisopropyléthylamine.....	(DIPEA)
1-(3-Diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide.....	(EDCI)
4-Diméthylaminopyridine.....	(DMAP)

<i>N,N</i> -Diméthylformamide.....	(DMF)
Endothéline.....	(ET)
Enzyme de conversion de l'endothéline.....	(ECE)
Ester benzylique.....	(OBzl)
Ester 9-Fluorénylméthylrique.....	(OFm)
Ester 4-nitrobenzylique.....	(ONBzl)
Ester <i>tert</i> -butylique.....	(OtBu)
9-Fluorénylméthoxycarbonyl.....	(Fmoc)
Fluorure d'hydrogène.....	(HF _(l))
Guanosine monophosphate cyclique.....	(GMPc)
Guanylate cyclase soluble.....	(GCs)
Hexafluorophosphate de 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-oxytripyrrolidinophosphonium.....	(PyBOP)
Hexafluorophosphate de 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3,-tétraméthyluronium.....	(HBTU)
Hydrogénosulfate de tétrabutylammonium.....	(TBAHS)
1-Hydroxybenzotriazole anhydre.....	(HOBt)
Hydroxyde de sodium.....	(NaOH)
Hydroxyproline.....	(Hyp)
Iodure de sodium.....	(NaI)
2-Isobutoxy-1-isobutoxycarbonyl-1,2-dihydroquinoline.....	(IIDQ)
Isothiocyanate de fluoresceine.....	(FITC)
Kinase de la chaîne légère de la myosine.....	(kclm)
Lysine.....	(Lys)
Méthanol.....	(MeOH)
γ -Méthylleucine.....	(Mle)
<i>N</i> -Méthylmorpholine.....	(NMM)
Monoxyde d'azote.....	(NO)
Non-disponible.....	(n.d.)
Noradrénaline.....	(NA)
Norleucine.....	(Nle)
Ornithine.....	(Orn)
Oxyde nitrique synthase endothéliale.....	(eNOS)

Palladium sur charbon activé.....	(Pd/C)
Peptide relié au gène de la calcitonine.....	(CGRP)
Phosphatase de la chaîne légère de la myosine.....	(pclm)
Phospholipase A ₂	(PLA ₂)
Phospholipase C.....	(PLC)
Pipécoline.....	(Pip)
Pression artérielle moyenne.....	(PAM)
Prostacycline.....	(PGI ₂)
Protéine kinase A.....	(PKA)
Protéine kinase C.....	(PKC)
Protéine kinase G.....	(PKG)
Récepteur A de l'endothéline.....	(ET _A)
Récepteur B de l'endothéline.....	(ET _B)
Récepteurs couplés aux protéines G.....	(GPCR)
Résonance magnétique nucléaire.....	(RMN)
Spectre de masse à haute résolution.....	(SM HR)
Spectre de masse à ionisation chimique.....	(SM IC)
Spectre de masse à ionisation électronique.....	(SM IE)
Spectre de masse à ``matrix-assisted laser desorption/ionization``.....	(SM MALDI)
Synthèse peptidique en phase solide.....	(SPPS)
Tétrafluoroborate de 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3,-tétramethyluronium.....	(TBTU)
<i>Tert</i> -Butoxycarbonyl.....	(Boc)
Triéthylamine.....	(TEA)
1,4,5-Trisphosphateinositol.....	(IP ₃)

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**Nouvelles stratégies de synthèse d'antagonistes de l'endotheline-1 et leurs
caractérisations pharmacologiques *in vitro* et *in vivo***

par

JEAN-PHILIPPE BROSSEAU

Département de pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé

en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

RÉSUMÉ

Le BQ-123 et le BQ-788 sont des antagonistes puissants et sélectifs des récepteurs ET_A et ET_B de l'endothéline, respectivement. Dans le présent ouvrage, nous avons d'abord élaboré des stratégies de synthèse efficace nous permettant d'accéder à ces deux types de peptides. Puis, nous les avons dérivés directement avec le FITC ou indirectement à l'aide d'un espaceur, afin de produire de nouveaux antagonistes fluorescents. Les antagonistes de référence ainsi que les nouvelles molécules d'intérêts ont été caractérisés physico-chimiquement et pharmacologiquement *in vitro* et *in vivo*.

En utilisant une combinaison orthogonale de groupements protecteurs, nous avons pu synthétiser le BQ-123 ainsi qu'une nouvelle série d'analogues basée sur une méthodologie de cyclisation sur phase solide développée dans nos laboratoires. Pour le BQ-788, une toute nouvelle synthèse a été développée en misant sur un nouveau protocole permettant de coupler efficacement le tripeptide (Boc-Mle-D-Trp(1-COOMe)-D-Nle-ONBzl) et l'amine 2,6-*cis*-diméthylpiperidine dans un excellent rendement de 87%, ce qui nous a permis d'obtenir le BQ-788 en 7 étapes avec un rendement global de 53%. Tous les analogues synthétisés ont été caractérisés physico-chimiquement (RMN ¹H, SM, CCM et HPLC). De plus, la caractérisation pharmacodynamique de ces analogues a été effectuée *in vitro* dans l'artère carotide (A.C.L.) (une préparation riche en récepteur ET_A) et dans l'artère pulmonaire de lapin (A.P.L.) (riche en récepteur ET_B) et enfin *in vivo* dans un modèle murin pour leur capacité à diminuer l'augmentation de pression artérielle suite à l'injection d'un agent presseur (ET-1 ou IRL 1620).

Les nouvelles molécules fluorescentes et non-fluorescentes ont été systématiquement caractérisées *in vitro* et comparées aux composés de référence. Le plus puissant antagoniste ET_A de la série, le BDN-123NLF (pA₂ = 7.10, *r* = 0.98), est un analogue fluorescent du BQ-123 (pA₂ = 6.77, *r* = 0.99) qui n'est pas actif sur l'A.P.L. et qui n'a aucune activité agoniste. Le BDN-123NLF (1.0 mg/kg i.v.) est spécifique puisqu'il n'affecte pas l'élévation de pression artérielle induite par l'Ang II (0.05 nmol/kg i.v.). Le plus puissant et compétitif de la nouvelle série ET_B est le BDN-788N (pA₂ = 7.07, *r* = 0.99). Le BDN-788NF (pA₂ = 6.52, *r* = 0.98), son équivalent fluorescent, possède une affinité apparente inférieure au BQ-788 (pA₂ = 8.24, *r* = 0.97). Malgré tout, il conserve ces propriétés de sélectivité et de spécificité tout comme le BDN-123NLF.

Ces nouveaux antagonistes fluorescents pourraient s'avérer être de puissants outils pharmacologiques pour étudier le système endothélinergique *in situ*.

INTRODUCTION

1. Axe endothélinergique

1.1 Historique

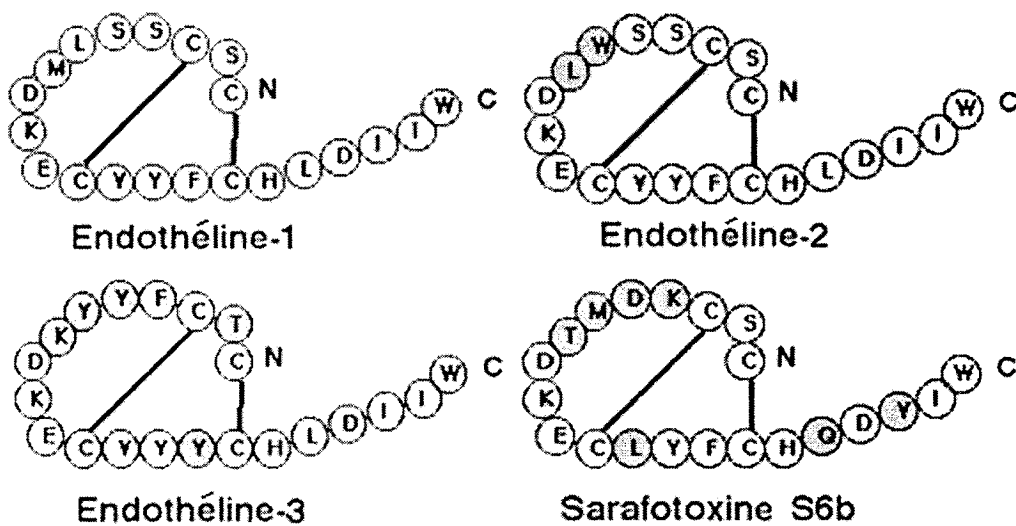
Au début des années 80, Robert Furchgott publie des résultats clé sur la relaxation endothélium-dépendante de vaisseaux sanguins par l'acétylcholine (Furchgott & Zawadzki, 1980). À cette époque, les observations de Furchgott contrastent avec le rôle alors documenté de l'endothélium en tant que simple barrière passive entre les fluides et le tissu musculaire lisse sous-jacent. Plusieurs laboratoires ont ensuite non seulement répétés ces observations, mais ont également observés des relaxations endothélium-dépendantes pour une vaste gamme d'hormones (peptides, nucléotides, cathécholamines). L'endothélium possède en effet la capacité de produire des agents vasorelaxants lorsque stimulé adéquatement. Une des première hormones de ce type à être caractérisée fut la prostacycline (PGI_2) (Moncada *et al.*, 1976), un dérivé de l'acide arachidonique. Le monoxyde d'azote (NO), un gaz vasorelaxant produit à partir d'un acide aminé (L-Arg), possède aussi de puissants effets relaxants sur le muscle lisse vasculaire.

L'endothélium peut également produire des agents vasopresseurs. Vers 1985, un premier groupe de recherche publie leurs travaux à l'égard d'un facteur contractile produit par les cellules endothéliales (Hickey *et al.*, 1985). Ceux-ci avancent qu'il s'agirait d'un peptide mais ne parviennent pas à son isolation. Dans une série de publications (Gillespie *et al.*, 1986, O'Brien *et al.*, 1987), un deuxième groupe divulgue

leurs efforts afin de caractériser ce facteur contractile dérivé de l'endothélium. Tout comme le premier groupe (Hickey *et al.*, 1985), ils ne parviennent qu'à caractériser partiellement cette nouvelle substance à l'aide de traitements enzymatiques, d'antagonistes et d'inhibiteurs choisis. Ce n'est qu'en 1988 que le groupe de Masaki publie la description et la caractérisation de ce nouveau peptide : l'endothéline (ET) (Yanagisawa *et al.*, 1988). Dans cet article, les auteurs y décrivent l'isolation, la purification ainsi que le séquençage de ce peptide de 21 acides aminés. La synthèse chimique et la comparaison du profil d'activité biologique confirment la séquence exacte (Yanagisawa *et al.*, 1988). De plus, un gène correspondant à la préproendothéline se retrouve dans les cellules endothéliales (Yanagisawa *et al.*, 1988).

Durant les deux années suivant cette découverte, plusieurs percées importantes ont eu lieu. D'abord, la découverte de deux autres gènes codant pour des isoformes de l'ET original et différant par 2 et 6 acides aminés ont respectivement été nommés ET-2 et ET-3 (Inoue *et al.*, 1989). Cette toute nouvelle famille de peptides possédant deux ponts disulfures reliant les Cys₍₁₋₁₅₎ et Cys₍₃₋₁₁₎ conservent tous les acides aminés Asp⁸, Glu¹⁰, His¹⁶, Asp¹⁸, Ile²⁰ et Trp²¹. La grande homologie avec une famille de peptides cardiotoxiques isolés du venin de *Atractaspis engaddensis*, les sarafotoxines, a ensuite été notée (Kloog *et al.*, 1988). Puis, deux gènes codant pour des récepteurs couplés à la protéine G ont été découverts et caractérisés comme étant des récepteurs activés par les ETs. Le récepteur A (ET_A) (Arai *et al.*, 1990) possède une plus grande affinité pour l'ET-1 et le récepteur B (ET_B) (Sakurai *et al.*, 1990) possède une affinité similaire pour les trois ETs.

Tableau I. Séquence des acides aminés des endothélines et sarafotoxine S6b.



1.1 Biosynthèse et sécrétion

La biosynthèse de chacune des endothélines suit la voie classique de maturation des peptides. Il y a d'abord synthèse d'un plus grand précurseur, la préproendothéline. Ce dernier est clivé par une peptidase signal, puis subséquemment au site Arg⁵²-Cys⁵³ et Arg⁹²-Ala⁹³ par une enzyme de maturation de la famille des pro-protéines convertase de type subtilisin, soit la furine et/ou PC7, toutes deux exprimées dans les cellules endothéliales (Blais *et al.*, 2002). Subséquemment, une carboxypeptidase clive les résidus Lys⁹¹-Arg⁹² en C-terminal (Kido *et al.*, 1997), donnant lieu au peptide non-mature communément appelé big-ET. Les big-ETs sont ensuite maturés par des enzymes de conversion de l'endothéline (ECEs) clivant au site atypique Trp²¹-Val²² (pour ET-1 et 2) ou Trp²¹-Ile²² (pour ET-3). L'ET-1 mature est relâchée par les cellules endothéliales à la membrane basolatérale et ce, de façon constitutive. Le principal mode de régulation de l'ET-1 se fait donc au niveau du gène. La big-ET-1 peut également être encapsulée avec une ECE dans des granules de sécrétion qui peuvent être régulées par divers agents comme l'angiotensine II (Ang II), le monoxyde d'azote (NO) et la noradrénaline (NA). Il existe au moins 3 ECEs distinctes (ECE-1, 2 et 3) et chacune des deux premières possèdent au moins 4 isoformes. L'ECE-1 se retrouve principalement au niveau de la cellule endothéliale, alors que l'ECE-2 semble être impliquée dans le cerveau, la glande surrénale, le rein et le foie. Les différentes isoformes diffèrent en ce qui a trait à leur localisation cellulaire (intracellulaire, membranaire) et leur affinité pour les différentes big-ETs. Des évidences portant sur des voies de maturation alternatives ont également été discutées (D'Orleans-Juste *et al.*, 2003). Il est notamment question du clivage au site

Tyr³¹-Gly³² par une chymase pour générer l'ET-1 (1-31) et subséquemment par une ECE et/ou NEP pour relâcher l'ET-1 (1-21) dite mature; et du clivage au site Gly³²-Leu³³ par une métalloprotéinase II matricielle pour générer ET-1 (1-32), un peptide vasoconstricteur.

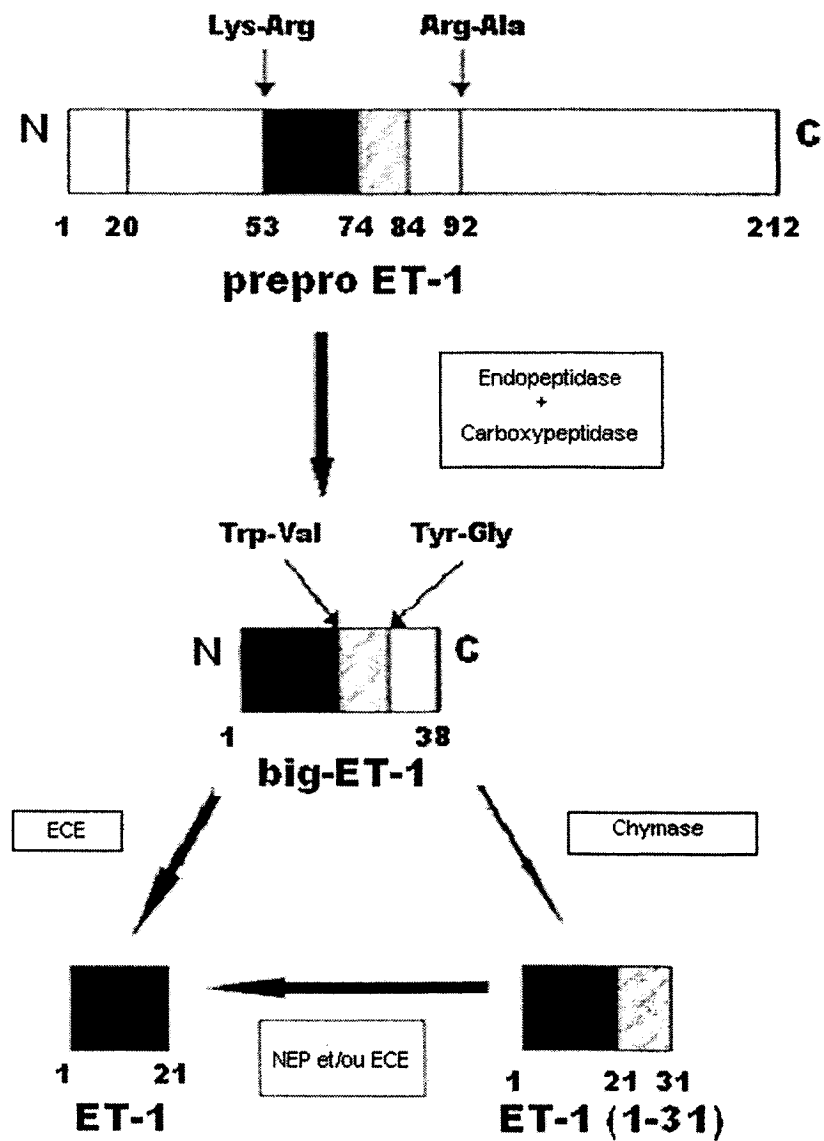


Figure 1. Biosynthèse de l'ET-1 mature à partir du précurseur préproET-1 adapté de (D'Orleans-Juste *et al.*, 2003).

1.3 Récepteurs et signalisation intracellulaire

Les ETs 1-21 (mature) déclenchent une cascade de signalisation menant à une réponse biologique (relaxation, contraction) via des récepteurs membranaires couplés aux protéines G (GPCR). La liaison de l'hormone avec le récepteur induit un changement conformationnel qui, dépendamment du ligand, du type cellulaire, et du sous-type de récepteur, provoquera une augmentation de l'affinité de la portion C-terminal du récepteur pour une ou plusieurs protéines $G\alpha$.

Au niveau du muscle lisse vasculaire, les deux sous-types de récepteurs aux ETs (les récepteurs ET_A et ET_B) médient la contraction par des mécanismes similaires. Après stimulation avec l'ET-1, il y a augmentation de l'affinité de la portion C-terminal du récepteur pour $G_{q\alpha}$ / $G_{11\alpha}$ ainsi que $G_{i1\alpha}$ et $G_{i2\alpha}$ (Shraga-Levine & Sokolovsky, 2000). Ces dernières protéines sont connues pour signaler par la voie de la phospholipase C (PLC), résultant en l'hydrolyse du phosphatidylinositol bisphosphate (PIP_2) en diacylglycérol (DAG) et en 1,4,5-trisphosphateinositol (IP_3). Ces deux seconds messagers interviennent dans la mobilisation du calcium intracellulaire et contribuent à la contraction du muscle vasculaire lisse selon un mécanisme impliquant la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (clm) par la kinase de la chaîne légère de la myosine (kclm). Plus précisément, l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ du à l'activation du récepteur à l' IP_3 active la protéine kinase C (PKC) via le couple Ca^{2+} -calmoduline, qui ultimement active la kclm. Le DAG peut quant à lui directement activer la PKC. Les récepteurs à l'ET peuvent également signaler par la voie de l'adénylate cyclase (AC) via G_s . L'augmentation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) ainsi produite active la

protéine kinase A (PKA). Cette enzyme peut alors phosphoryler la chaîne légère de la myosine, soit le même mécanisme que par la PKC.

Au niveau de la cellule endothéliale, il n'existe qu'un seul sous-type de récepteur, soit le récepteur ET_B et celui-ci médie la relaxation du muscle lisse sous-jacent. Lorsque stimulé avec ET-1 ou ET-3, celui-ci augmente son affinité pour G₁₃α (Shraga-Levine & Sokolovsky, 2000). Cette protéine est entre autre connue pour signaler en inhibant l'adénylate cyclase. Ceci a pour effet de diminuer le taux d'AMPc, désactivant ainsi la PKA et empêchant les événements de phosphorylation. À faible [Ca²⁺]_i, la phosphatase de la chaîne légère de la myosine est activée, s'en suivant une diminution de la contraction. Le récepteur ET_B situé sur les cellules endothéliales peut également produire des agents vasorelaxants tel que le NO et la PGI₂.

Le premier est le produit de l'oxydation de la L-Arginine en présence de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS). Cette enzyme est activée par la mobilisation de Ca²⁺. Le monoxyde d'azote peut alors diffuser jusqu'au muscle lisse sous-jacent et activer la guanylate cyclase soluble (GCs). Ainsi, l'augmentation de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) active la protéine kinase G (PKG), laquelle active la phosphatase de la chaîne légère de la myosine (pclm), qui finalement provoque la relaxation.

La prostacycline est produite à partir de l'action de la phospholipase A₂ (PLA₂) sur les phospholipides membranaires pour générer l'acide arachidonique (AA). Celui-ci subit l'action de la cyclooxygénase (COX) et finalement de la prostacycline synthase. La PGI₂ peut diffuser jusqu'aux cellules musculaires lisses sous-jacentes, se lier à son récepteur membranaire et activer l'adénylate cyclase via G_s. Ainsi, l'augmentation

de l'AMPc active la PKA, et subséquemment la pclm, passant ainsi par le même mécanisme que par la PKG.

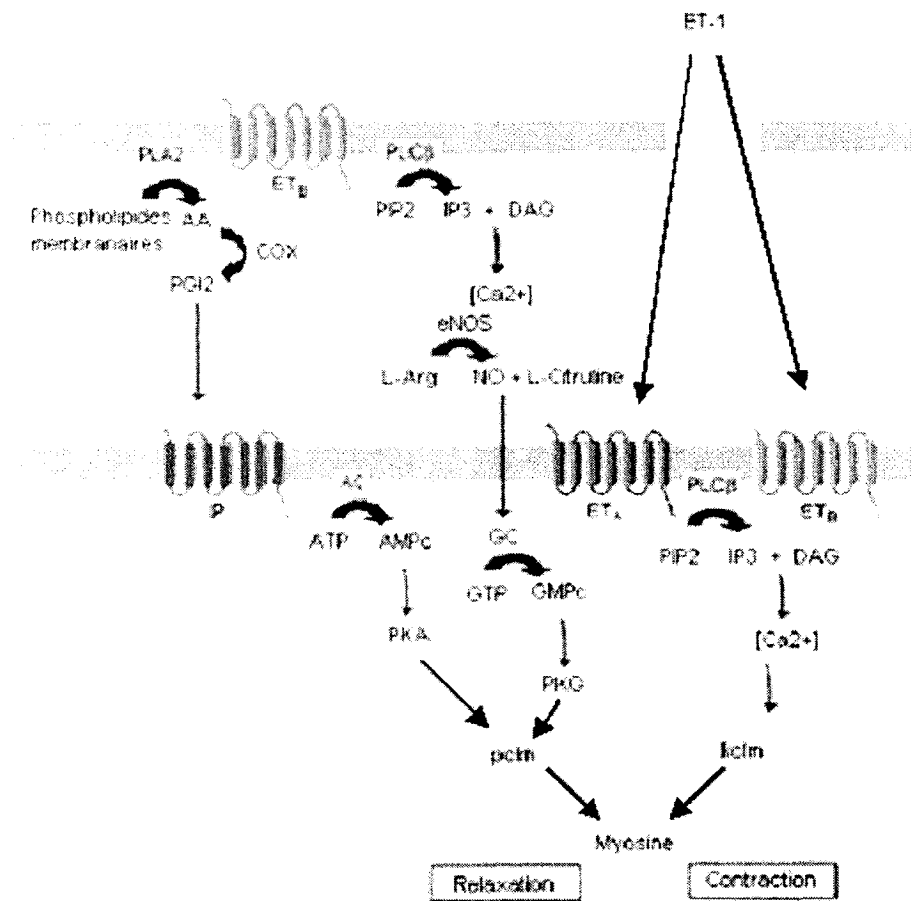


Figure 2. Voies de signalisations intracellulaires des récepteurs ET_A et ET_B .

2. BQ-123 et BQ-788

2.1 Découverte

Le pseudopeptide BQ-788 (schéma 1) a été développé chez Banyu Pharmaceuticals dans le cadre d'un programme visant à développer des antagonistes de l'endothéline (Ishikawa *et al.*, 1993). Dans un premier temps, ils ont identifiés des cyclopentapeptides dans le surnageant de culture de *Streptomyces Misakiensis* (Ihara *et al.*, 1991). Un de ceux-ci, BE-18257B, s'est avéré posséder une faible activité antagoniste des effets de l'ET-1 ($pA_2 = 5.9$, $IC_{50} = 1.4 \mu M$). De plus, BE-18257B, dont la séquence est *cyclo*(Ala-D-alloIle-Leu-D-Trp-D-Glu), possède une certaine sélectivité pour le récepteur ET_A puisqu'il antagonise très peu les effets de l'ET-1 sur une préparation riche en récepteur ET_B (membrane de cervelet de porc), et ce, même si le BE-18257B est en forte concentration. Par contre, sa faible solubilité dans l'eau et son manque de puissance stimule la recherche pour de meilleurs antagonistes des récepteurs ET_A .

Suite à une étude de relation structure-activité exhaustive sur les cyclopentapeptides, un composé possédant une forte affinité pour le récepteur ET_A (22 nM) et une faible affinité pour le récepteur ET_B (18 μM) fut mis au point par Banyu Pharmaceuticals, le BQ-123. Dans le but de simplifier le pharmacophore de ces peptides cycliques, il a été possible de concevoir des tripeptides linéaires retenant la sélectivité pour le récepteur ET_A dont un des représentants est le BQ-485. Lors de ces recherches, les scientifiques de Banyu ont remarqué que certaines modifications apportées au tripeptide diminuaient ou même renversaient le ratio de la sélectivité en faveur de ET_B .

Partant de ces dernières observations, ils ont synthétisé plus d'une centaine de peptides, un des plus puissant et le mieux connu étant le BQ-788 (Ishikawa *et al.*, 1994).

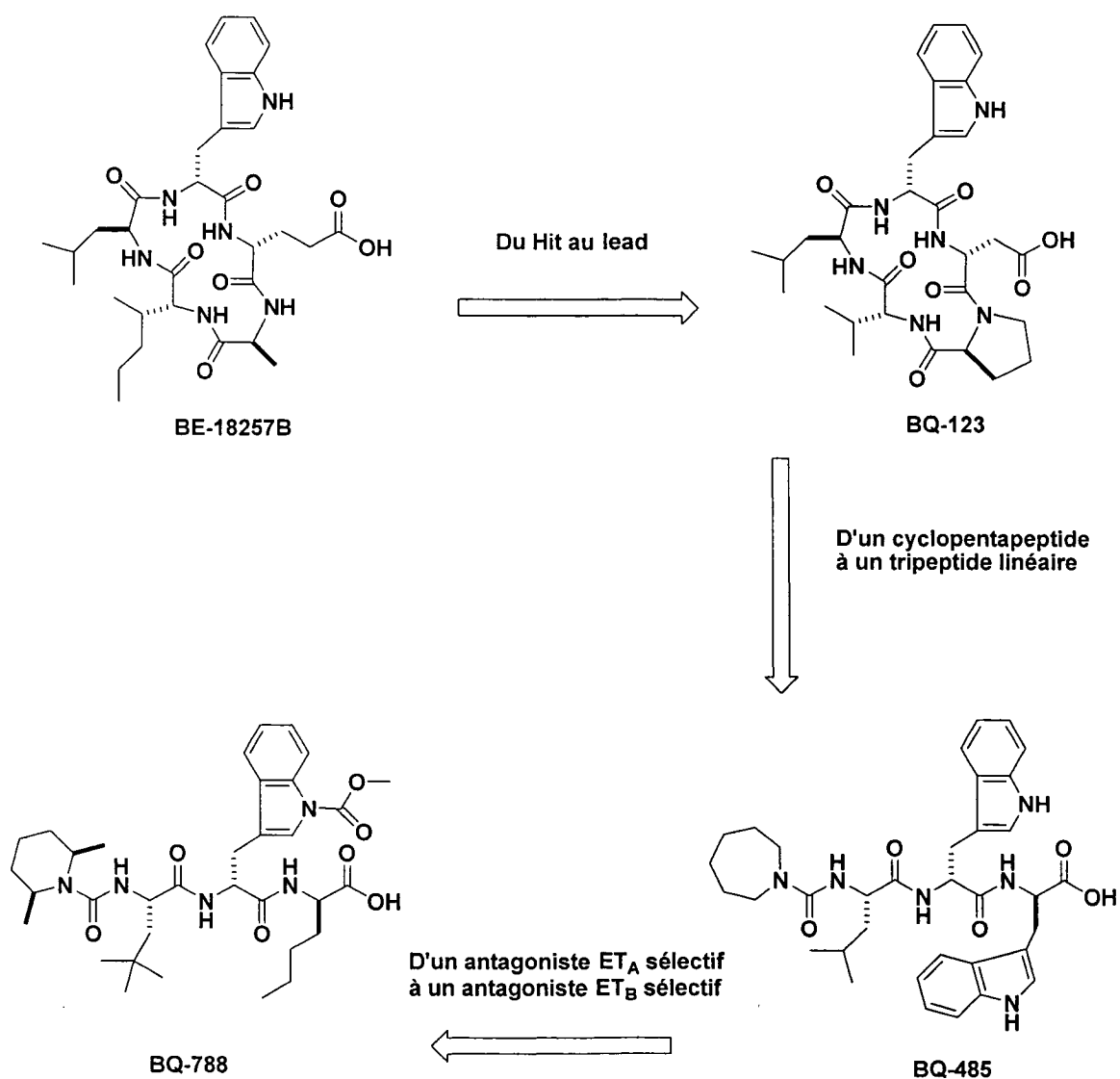


Schéma 1. Développement du BQ-123 et BQ-788 chez Banyu Pharmaceuticals

2.2 Profil pharmacologique

Le profil pharmacologique du BQ-123 a paru initialement en 1992 dans la revue *Life Sciences* (Ihara *et al.*, 1992), alors que le profil pharmacologique du BQ-788 a paru deux ans plus tard dans la prestigieuse revue *PNAS* (Ishikawa *et al.*, 1994). Ce dernier a récemment été l'objet d'un article de revue (Okada & Nishikibe, 2002).

D'abord, dans des essais de liaisons utilisant une préparation de membrane de cervelet de porc riche en récepteurs ET_B, le BQ-788 inhibe la liaison de l'ET-1 radioactive avec un IC₅₀ de 0.9 nM, contre 18000 nM pour le BQ-123. Ceci contraste avec l'inhibition de liaison de ces antagonistes contre l'ET-1 radioactive sur une préparation porcine riche en récepteurs ET_A, le muscle lisse de l'artère coronaire de porc (BQ-123, IC₅₀ = 22 nM; BQ-788, IC₅₀ = 280 nM). Dans des cellules Gurrardi de cœur humain, le BQ-788 inhibe la liaison de l'ET-1 radioactive avec un IC₅₀ de 1.2 nM, comparativement à 1300 nM dans la lignée cellulaire neuroblastome, riche en récepteurs ET_A. De plus, une analyse de Scatchard permet de conclure que l'inhibition de liaison est compétitive puisque le BQ-788 ne fait que réduire la pente sans changer significativement l'intersection de l'axe des x. Par convention, l'axe des x représente la liaison spécifique du BQ-788 alors que l'axe des y correspond à la liaison spécifique du BQ-788 divisé par la concentration d'ET-1 radioactive. En complément, une concentration de BQ-788 de 10 µM n'altère pas significativement la liaison spécifique des peptides radioactifs suivant: l'angiotensin II (Ang II) (membrane de cervelet de bœuf), le peptide relié au gène de la calcitonine (CGRP) (membrane de foie de rat) et le peptide YY (membranes hippocampal de porc). Une analyse de Scatchard du BQ-123

suggère aussi un antagonisme de type compétitif. De plus, il n'affecte pas la liaison spécifique de d'autres peptides radioactifs comme l'Ang II (membrane de cervelet de bœuf) et l'oxytocine (membrane d'utérus de rat) et ne possèdent pas d'activité agoniste même à forte concentration (10 μ M). Tout ceci suggère que le BQ-123 et le BQ-788 agissent comme des antagonistes sélectifs, spécifiques et compétitifs sur les récepteurs ET_A et ET_B, respectivement.

Dans des essais fonctionnels biochimiques, le BQ-788 seul à très fortes concentrations (100 μ M), n'a aucun effet sur la variation de $[Ca^{2+}]_i$ chez les cellules Girrardi de cœur humain. Il ne peut non plus altérer l'élévation de $[Ca^{2+}]_i$ induite par divers agonistes (neuropeptide Y, bradykinine, arginine-vasopressine, thrombine, histamine et acétylcholine). Il n'altère que faiblement l'élévation de $[Ca^{2+}]_i$ de l'ET-1 (100 nM) dans une préparation de cellules musculaires lisses d'artère coronaire de porc ($IC_{50} = 2500$ nM). Par contre, il bloque efficacement l'élévation de $[Ca^{2+}]_i$ de l'ET-1 (100 nM) dans les cellules Girrardi de cœur humain ($IC_{50} = 0.54$ nM).

Dans des essais de contractilité vasculaire, le BQ-788 (10 μ M) n'a aucun effet agoniste et ce, autant dans une préparation riche en ET_B (artère pulmonaire de lapin) que riche en ET_A (artère coronaire de porc). Dans cette dernière, le BQ-788 n'a aucun effet sur la courbe dose-réponse à l'ET-1 alors que le BQ-123 induit un déplacement parallèle vers la droite de la courbe contrôle de façon linéaire ($pA_2 = 7.4$; $r = 0.96$). Selon l'analyse de Schild, le BQ-788 ($pA_2 = 8.4$) déplace de façon dose-dépendante la courbe de contraction au BQ-3020, un agoniste sélectif ET_B. De plus, il n'affecte pas significativement la courbe dose-réponse à d'autres agents constricteur (norépinéphrine,

sérotonine, histamine et KCl). Ces résultats d'essais fonctionnels démontrent bien l'affinité, la sélectivité et la spécificité du BQ-123 et du BQ-788.

Lorsqu'injecté de façon intraveineuse chez le rat Wistar Kyoto conscient, l'ET-1 (0.3 nmol/kg) induit une réponse hémodynamique biphasique. Il y a d'abord une vasodilatation transitoire, suivie d'une élévation de la pression artérielle qui est soutenue dans le temps. La chute de pression momentanée peut être bloquée par un pré-traitement avec un antagoniste ET_B, tel le BQ-788 (1.0 mg/kg i.v.). Un pré-traitement au BQ-123 peut quant à lui significativement diminuer la phase hypertensive (1.0 mg/kg). Le BQ-788 augmente les taux circulants de l'ET-1, ce qui est un indice du bloc des récepteurs ET_B *in vivo* (Ishikawa *et al.*, 1994). En effet, il a été démontré chez le rat que les récepteurs ET_B sont fortement impliqués dans la clairance plasmatique de l'ET-1 (Fukuroda *et al.*, 1994a). En ce sens, chez les rats hypertendus sensibles au sel, le BQ-788 (3.0 mg/kg/h) seul augmente la pression artérielle de 20 mm de Hg (Okada & Nishikibe, 2002).

2.3 Relation structure-activité

Tel que mentionné précédemment, les tripeptides linéaires possédant une sélectivité pour ET_B ont été dérivés d'un tripeptide linéaire sélectif pour ET_A, lui-même provenant d'un cyclopentapeptide ET_A sélectif. Bien que le BE-18257B s'avère le plus puissant des 4 peptides isolés (Ihara *et al.*, 1991), c'est le BE-18257A qui a été retenu comme point de départ pour l'optimisation de sa puissance envers ET_A. Celui-ci est plus facile à synthétiser puisque sa séquence possède un D-Val plutôt qu'un D-alloIle. Une première

série de relations structure-activité a permis de conclure que la modification de D-Glu⁵ pour D-Asp⁵ et Ala¹ pour Pro¹ accroît le ratio de sélectivité par 10 et augmente la puissance par environ 60 fois (Ishikawa *et al.*, 1992). Le BQ-123 *cyclo*(Pro-D-Val-Leu-D-Trp-D-Asp) contient ces deux altérations et possède une forte affinité pour ET_A (22 nM) et une faible affinité pour ET_B (18 µM). De plus, le sel de sodium correspondant est très soluble dans l'eau (plus de 1 g/mL).

Une deuxième série d'études permet de conclure que le remplacement de Pro¹ pour à peu près n'importe quel acide aminé naturel n'affecte que très peu l'activité biologique, soit généralement 10 fois moins actif que le BQ-123 (Fukami *et al.*, 1995). De plus, la substitution de Pro¹ pour des acides aminés cycliques comme l'hydroxyproline (Hyp) ou l'acide pipécolinique (Pip) génère des composés tous aussi puissants sinon plus que le BQ-123 (Fukami *et al.*, 1995). En ce sens, cette observation fut exploitée et directement appliquée dans le but de produire de nouveaux analogues dont la demi-vie *in vivo* est augmentée. Ainsi, ils ont synthétisé plusieurs analogues du BQ-123 comportant des acides aminés basiques couplés par leur fonction carboxyle à l'hydroxyle de Hyp¹. Tous conservent leur puissance envers les récepteurs ET_A (Fukami *et al.*, 1996). Dans une autre série d'études, ils ont retiré Pro¹ de la séquence afin de générer des peptides linéaires encore plus simple à synthétiser. Bien que 100 fois moins puissant que le BQ-123, le tripeptide isovaleryl-Leu-D-Trp-β-Ala-OH reste une molécule sélective pour ET_A et propice à d'autres modifications. En effet, le remplacement de l'isovaleryl par d'autre groupement comme le 2,6-*cis*-diméthylpipéridine produit des composés presque aussi puissants que le BQ-123 (Nagase *et al.*, 1995).

Tableau II. Première série de relation structure-activité du BQ-123 (Ishikawa *et al.*, 1992).

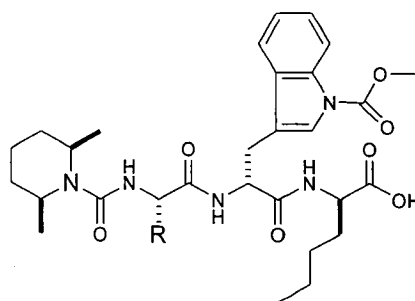
Séquence	Nom	IC ₅₀ ET _A	IC ₅₀ ET _B
—	—	(nM)	(nM)
<i>cyclo</i> (Ala-D-alloIle-Leu-D-Trp-D-Glu)	BE-18257B	1400	>100000
<i>cyclo</i> (Ala-D-Val-Leu-D-Trp-D-Glu)	BE-18257A	3000	>100000
<i>cyclo</i> (Ala-D-Val-Leu-D-Trp-D-Asp)	—	110	>100000
<i>cyclo</i> (Pro-D-Val-Leu-D-Trp-D-Asp)	BQ-123	22	18000

Tableau III. Deuxième série de relation structure-activité du BQ-123 (Fukami *et al.*, 1995, Fukami *et al.*, 1996).

cyclo(Xaa-D-Val-Leu-D-Trp-D-Asp)

Xaa	IC ₅₀ ET _A
-	(nM)
Gly	160
Ser	190
Asp	180
Met	130
His	240
MeAla	34
Pip	13
Thz	20
Hyp	18
Hyp(Gly)	27
Hyp(HomoLys)	24
Hyp(Orn)	22
Hyp(Lys)	28
Hyp(Arg)	13
Hyp(MeLys)	20
Hyp(His)	14

La structure du BQ-123 peut également être modifiée en vue d'en faire un peptide sélectif pour les récepteurs ET_B tel le BQ-788 (Ishikawa *et al.*, 1993, Ishikawa *et al.*, 1994). En effet, la β -Ala peut être avantageusement remplacée par la D-Nle, mais non par d'autres acides aminés hydrophobes comme D-Leu ou D-Val. Les acides aminés de configuration D présentant des éthers, thioéthers et allyl au niveau de la chaîne latérale affectent significativement l'affinité de l'antagoniste. La substitution de D-Trp par d'autres acides aminés aromatiques comme D-Tyr ou D-Phe génère des composés dont l'affinité pour le récepteur ET_B est fortement réduite (Ishikawa *et al.*, 1993). Fait intéressant, certaines substitutions en position 1 et 2 de l'indole peuvent complètement renverser la sélectivité en faveur du récepteur ET_A mais l'effet de ces substitutions sont difficilement prévisibles (Fukami *et al.*, 1996, Ishikawa *et al.*, 1993). Contrairement à β -Ala, la plupart des acides aminés hydrophobiques semblables à Leu sont bien tolérés sauf Phe. À noter qu'en plus d'augmenter l'affinité pour ET_B, la substitution de Leu pour Mle décroît également l'affinité pour ET_A. Au niveau du groupement urée en *N*-terminal, les dérivés pipéridino et anilino sont bien tolérés, mais le dérivé 2,6-*cis*-diméthylpipéridine est particulièrement puissant (Fukami *et al.*, 1996, Ishikawa *et al.*, 1993). Quant au *C*-terminal, les dérivés sous forme d'ester méthylique, éthylique et propylique semblent retenir l'affinité pour le récepteur ET_B (Ishikawa *et al.*, 1993). Les données retrouvées dans les schémas 2 à 6 ont été sélectionnées et modifiées de l'ouvrage de Ishikawa K. *et al.* (Ishikawa *et al.*, 1993). L'activité biologique est rapportée d'après le pourcentage d'inhibition de 1.1 μ M de composé contre l'ET-1 radioactive sur une préparation de membrane de cervelet de porc riche en récepteur ET_B.



2,6-*cis*-diméthylpipéridine-1-carbonyl-Xaa-D-Trp(1-COOMe)-D-Nle-OH

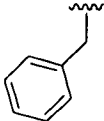
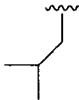
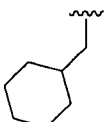
R =	% d'inhibition	R =	% d'inhibition	R =	% d'inhibition
	99%		97%		67%
(Mle)		(tBuGly)		(Phe)	
	98%		99%		97%
(Leu)		(Val)			

Schéma 2. Série de relation structure-activité du résidu 3 du BQ-788 (Ishikawa *et al.*, 1993).

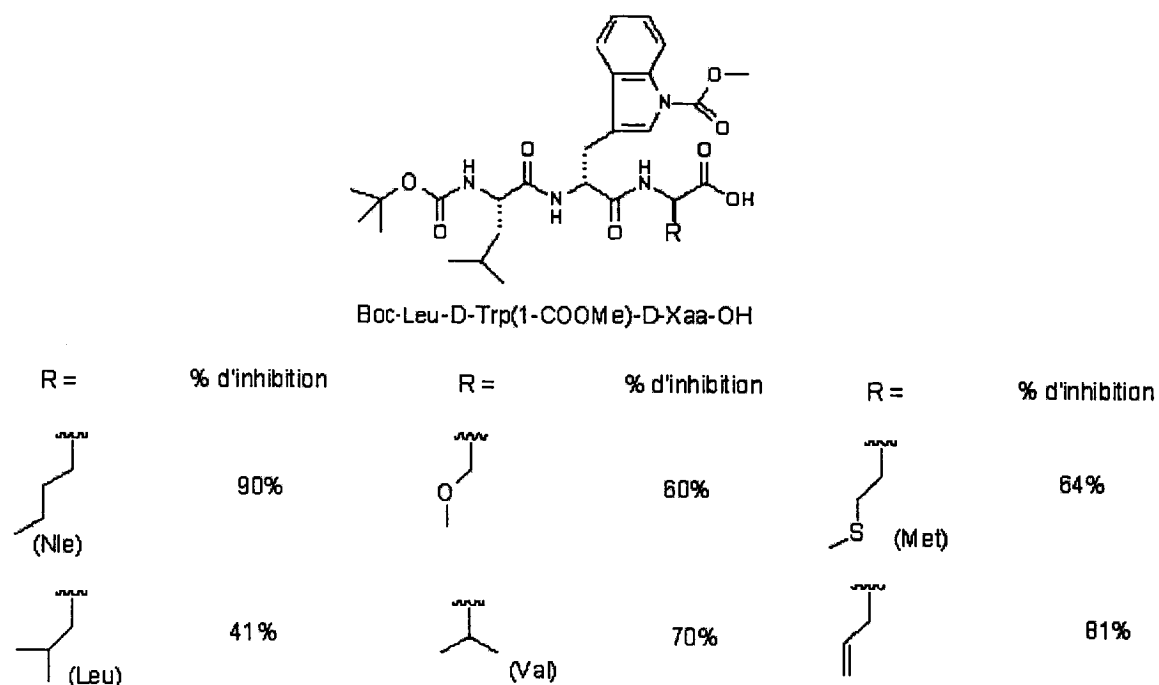
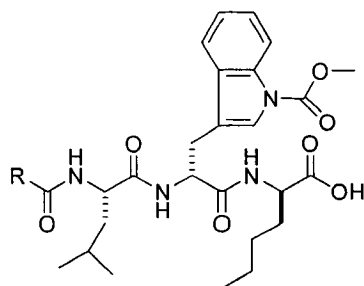


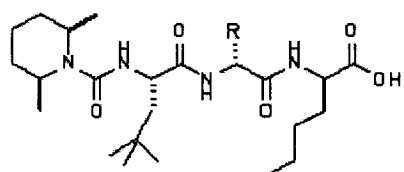
Schéma 3. Série de relation structure-activité du résidu 1 du BQ-788 (Ishikawa *et al.*, 1993).



Rcarbonyl-Leu-D-Trp(1-COOMe)-D-Nle-OH

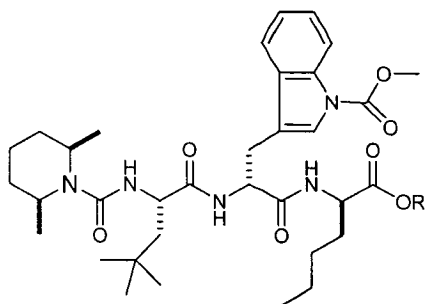
R =	% d'inhibition	R =	% d'inhibition	R =	% d'inhibition
	99%		99%		73%
	94%		96%		72%
	93%		89%		99%
	100%		97%		99%
	97%		98%		95%
	88%		90%		84%
	85%		35%		91%
	83%		91%		

Schéma 4. Série de relation structure-activité du *N*-terminal du BQ-788 (Ishikawa *et al.*, 1993).

2,6-*cis*-diméthylpipéridine-1-carboxyl-Mle-D-Xaa-D-Nle-OH

R =	% d'inhibition	R =	% d'inhibition	R =	% d'inhibition
	64%		69%		18%
	75%		94%		74%
	44%		84%		94%
	42%		96%		98%
	92%				

Schéma 5. Série de relation structure-activité du résidu 2 du BQ-788 (Ishikawa *et al.*, 1993).



2,6-*cis*-diméthylpipéridine-1-carbonyl-Mle-D-Trp(1-COOMe)-D-Nle-OR

R =	% d'inhibition	R =	% d'inhibition
H	99%		98%
	98%		94%

Schéma 6. Série de relation structure-activité du C-terminal du BQ-788 (Ishikawa *et al.*, 1993).

2.4 Stratégies de synthèse

Du point de vue chimique, les peptides cycliques “tête à queue” font partie d’une classe de composés difficile à synthétiser, particulièrement ceux contenant 5 acides aminés comme le BQ-123. Une des méthodes classiques pour parvenir à cycliser ce type de peptide est d’activer le C-terminal sous forme d’azoture et de diluer le mélange réactionnel pour défavoriser les réactions intermoléculaires. Cette stratégie fut employée avec succès par Banyu Pharmaceuticals afin de produire le BQ-123 avec un bon rendement (Fukami *et al.*, 1995). Peu de temps après la publication initiale (Ihara *et al.*, 1992), plusieurs groupes de recherche ont synthétisé la molécule d’intérêt et tenté d’élucider sa conformation en solution par RMN. La plupart ont opté pour une synthèse en phase solide du précurseur linéaire, suivi d’une cyclisation en solution donnant lieu à des rendements variables (Bradley *et al.*, 1994, Krystek *et al.*, 1992, Reily *et al.*, 1992, Sowemimo *et al.*, 1994).

Au début des années 1990, un nouveau concept est apparu pour la synthèse des peptides cycliques. Il s’agit d’accrocher une fonctionnalité de la chaîne latérale d’un acide aminé directement sur la résine. En protégeant le N et le C-terminal de façon orthogonale, cela permet de subséquemment allonger le peptide, déprotéger sélectivement le C-terminal et cycliser. C’est ce qu’on appelle la cyclisation « directement sur la résine ». Le BQ-123 possède justement un acide aminé propice à cette substitution (D-Asp) et certains groupes de recherche, dont le notre, ont exploité cette stratégie pour la synthèse du BQ-123 (Neugebauer *et al.*, 1996, Spatola & Crozet, 1996). De plus, une résine de type Merrifield possédant déjà Boc-D-Asp(OResin)-OFm

est disponible commercialement. Nous nous baserons sur cette stratégie pour synthétiser le BQ-123 et les nouveaux analogues fluorescents et non-fluorescents.

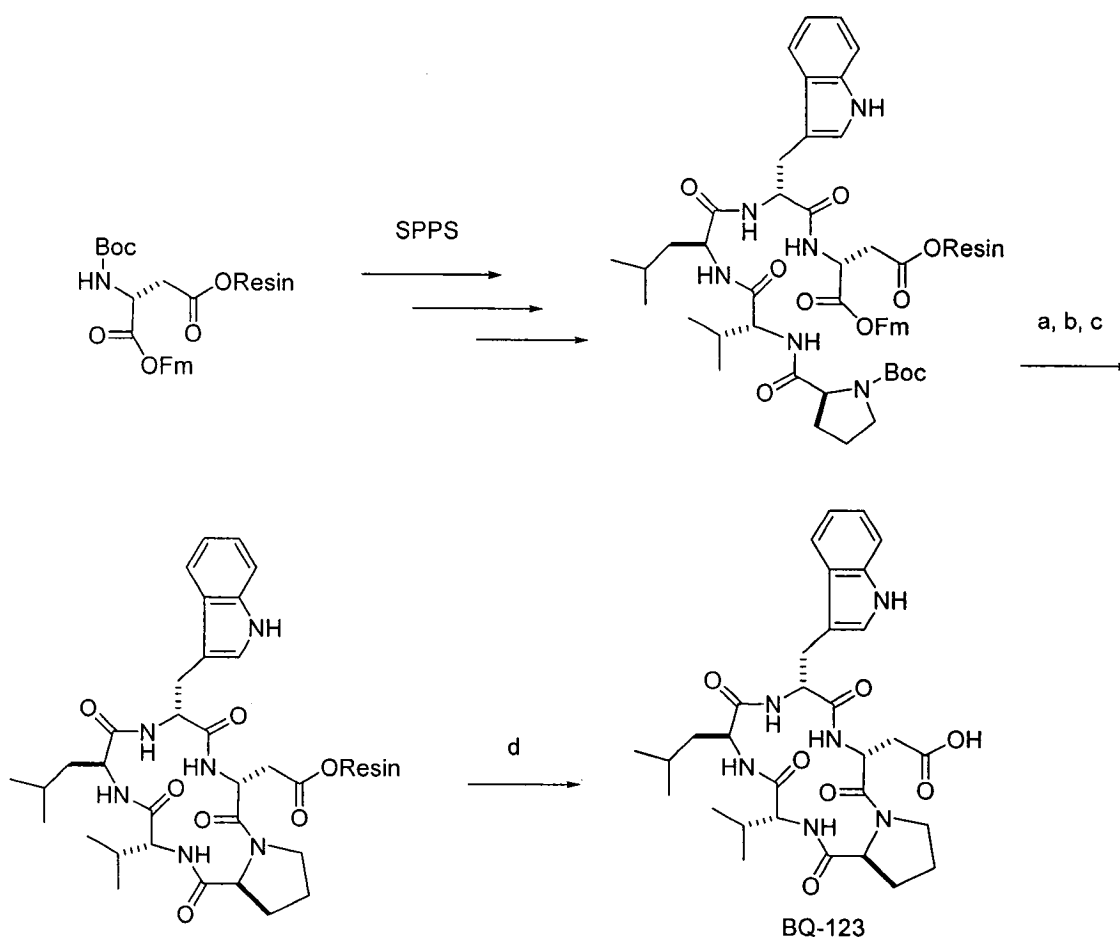


Schéma 7. Synthèse du BQ-123 (Neugebauer *et al.*, 1996).

Réactifs et conditions : (a) TFA/DCM (40/60) t.p. 30 min (b) pipéridine/DMF (50/50) t.p. 60 min (c) PyBOP, HOBt, DIPEA/ DMF t.p. 16 h (d) HF_(l) 0°C 30 min.

Pour le BQ-788, seulement deux stratégies de synthèse ont été rapportées. D'abord celle de Ishikawa K. *et al.* (Ishikawa *et al.*, 1993); puis celle de He J.X. *et al.* (He *et al.*, 1995). Non seulement est il impossible de calculer le rendement global à partir des données disponibles dans le brevet émis par Banyu en 1992 (Ishikawa *et al.*, 1993), mais la synthèse est de plus difficile et laborieuse. Le schéma 8 illustre la synthèse du BQ-788 par Ishikawa K. *et al.* (Ishikawa *et al.*, 1993). La stratégie générale consiste à synthétiser le BQ-788 en solution, en utilisant le *tert*-butoxycarbonyle (Boc) et l'ester *tert*-butylique (OtBu) comme groupements protecteurs pour l'amine et l'acide carboxylique, respectivement. L'élongation du peptide s'effectue du C au N-terminal, ce qui est en accord avec les règles de synthèse peptidique classiques (Bodanszsky 1993). La formation du carbamate méthylique en position indolique est effectuée directement sur le dipeptide (Boc-D-Trp-D-Nle-OtBu). Quant à la formation du lien urée encombré, TsOH•H-Mle-OBzl est d'abord activé avec du *N,N*-carbonyldiimidazole (CDI) et l'intermédiaire résultant est isolé. Puis, celui-ci est couplé à la très encombrée 2,6-*cis*-diméthylpipéridine pour former le 2,6-*cis*-diméthylpipéridine-1-carbonyl-Mle-OBzl. Une fois l'ester hydrogénolysé, celui-ci est couplé au dipeptide pour conduire au pseudotripeptide protégé. Ce dernier est soumis en condition acide pour générer le BQ-788.

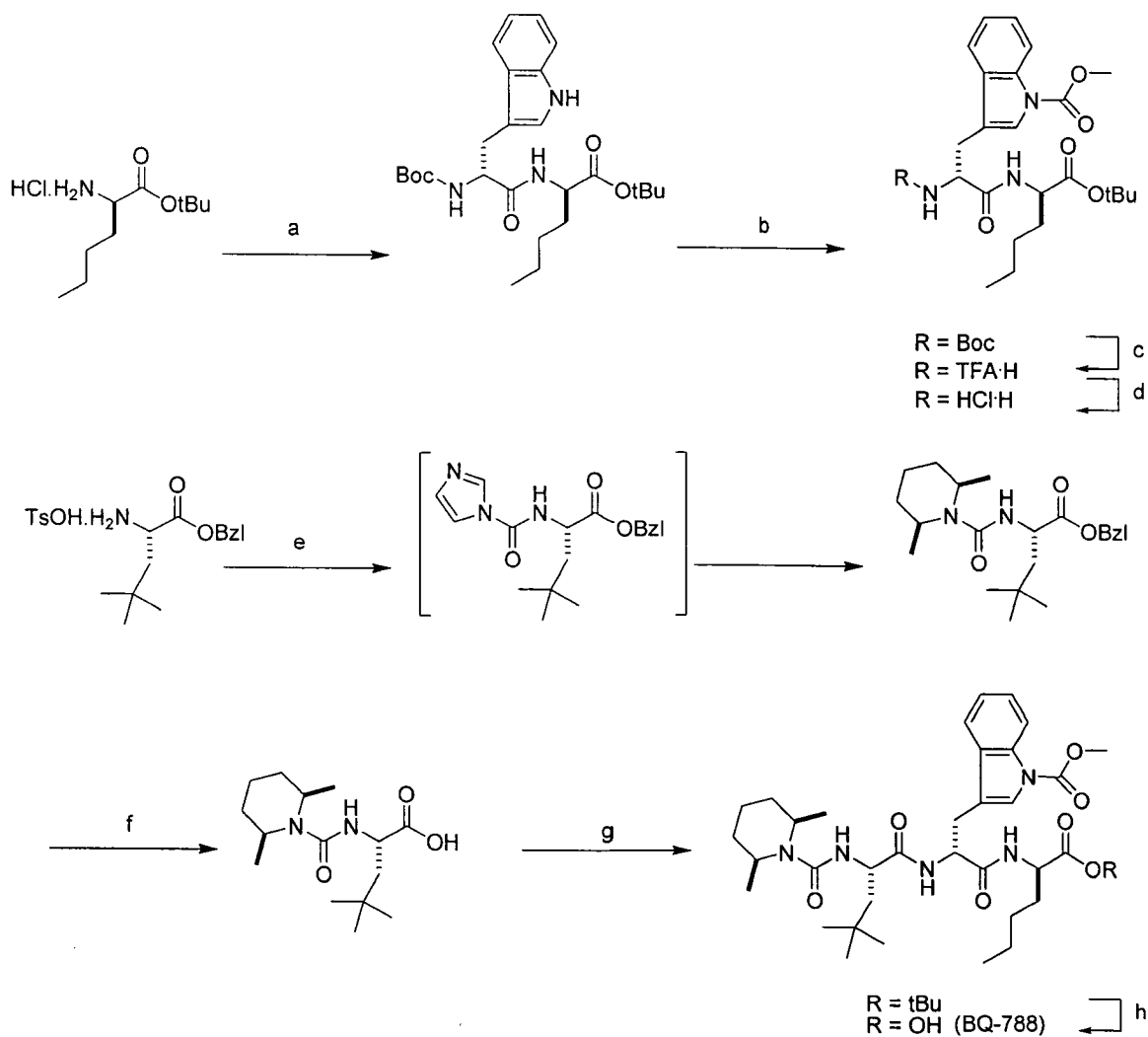


Schéma 8. Synthèse du BQ-788 (Ishikawa *et al.*, 1993).

Réactifs et conditions : (a) Boc-D-Trp-OH, NMM, HOBt·H₂O, EDCI·HCl / DCM 0°C 2 h, puis t.p. 1 h (b) Chloroformate de méthyle, NaOH, TBAHS / DCM t.p. 2 h (c) TFA 0°C 10 min (d) 3.78N HCl / Dioxane, 0°C (e) CDI, TEA / CHCl₃ t.p. 1 h, puis 2,6-*cis*-diméthylpipéridine t.p. 6 h (f) H₂ 10% Pd/C / MeOH t.p. 16 h (g) HCl·H-D-Trp(1-COOMe)-D-Nle-OtBu, NMM, HOBt·H₂O, EDCI·HCl / DCM 0°C 1.5 h (h) TFA t.p. 1 h.

Deux ans plus tard, une nouvelle synthèse du BQ-788 paraît dans le *Journal of Organic Chemistry* par des scientifiques de chez Parke-Davis (He *et al.*, 1995). Trouvant la précédente synthèse non-pratique et voulant recueillir quelques grammes de produit final pour des essais pré-cliniques, ce groupe proposa de synthétiser le BQ-788 par une stratégie différente. Le schéma 9 représente la synthèse du BQ-788 par He J.X. *et al.* (He *et al.*, 1995). Leur stratégie générale consiste à bâtir le pseudopeptide du *N* au *C*-terminal, ce qui est contraire aux règles classiques de synthèse peptidique. Ceci les conduirent à former d'abord l'intermédiaire 2,6-*cis*-diméthylpipéridine-1-carbonyl-Mle-OBzl en 5 étapes avec un rendement de 64%. Cet urée très encombré est issu de la condensation de l'amine secondaire sur l'isocyanate de H-Mle-OBzl, lui-même dérivé de Boc-Mle-OH. La préparation du HCl•H-D-Trp(COOMe)-OBzl se fait en trois étapes à partir de Boc-D-Trp-OH commercialement disponible. D'abord, ce dernier est estérifié via le sel de césium pour donner Boc-D-Trp-OBzl. Pour la carbamination, des conditions plus douces furent développées (diméthyldicarbonate, DMAP/MeCN) puisque l'application des conditions de Ishikawa *et al.* (Ishikawa *et al.*, 1993) conduisent, selon eux, à la racémisation de la molécule. Suivant la déprotection du Boc, le dipeptide 2,6-*cis*-diméthylpipéridine-1-carbonyl-Mle-D-Trp(COOMe)-OBzl est assemblé en présence du carbodiimide soluble dans l'eau, EDCI. Après plusieurs tentatives, les conditions optimales d'hydrogénolyse de l'ester benzylique ont été obtenue avec Pd/C 5% /MeOH. Ces conditions ne réduisent pas le lien C2-C3 de l'indole. Le dipeptide correspondant est subséquemment couplé en présence de HBTU et l'ester clivé dans les conditions précédemment développées pour mener au BQ-788.

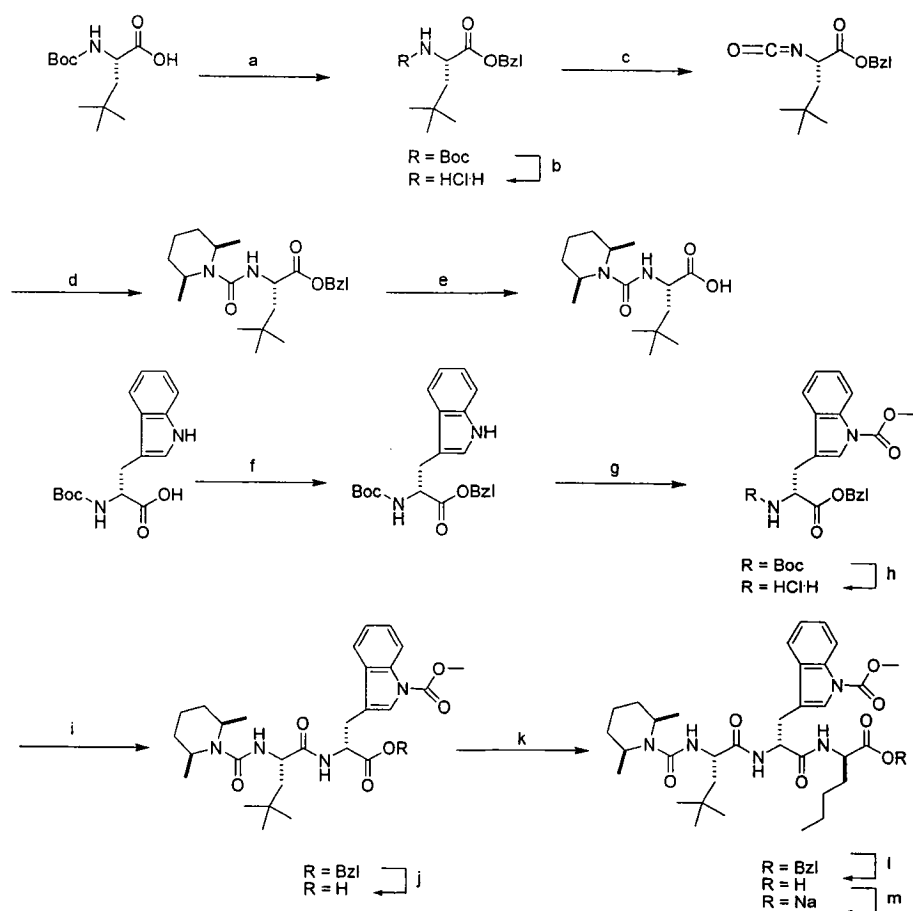


Schéma 9. Synthèse du BQ-788 (He *et al.*, 1995).

Réactifs et conditions : Bromure de benzyl, Cs_2CO_3 / DMF t.p. 2 h (91%) (b) HCl / Dioxane t.p. 30 min, puis reflux 1 h (94%) (c) Diphosgène, charbon activé / toluène t.p. 1 h, puis reflux 4 h (92%) (d) 2,6-*cis*-diméthylpiperidine / AcOEt 0°C 1 h, puis t.p. 1 h (94%) (e) H_2 (50 psi) 20% Pd/C / MeOH t.p. 2 h (88%) (f) Alcool benzylique, EDCI•HCl, HOBt, NMM / DMF t.p. 12 h (85%) (g) Diméthylcarbonate, DMAP cat. / MeCN t.p. 3 h (90%) (h) HCl / Dioxane t.p. 1.5 h (90%) (i) 2,6-*cis*-diméthylpiperidine-1-carbonyl-Mle-OH, NMM, EDCI•HCl, HOBt, / DMF t.p. 12 h (92%) (j) H_2 5% Pd/C / Ether t.p. 2 h (89%) (k) HCl•H-D-Nle-OBzl, HBTU, DIPEA / DMF t.p. 3 h (87%) (l) H_2 5% Pd/C / Ether t.p. 2 h (85%) (m) 5% NaHCO_3 / MeOH, H_2O t.p. 1 h (100%).

2.5 Exemple de synthèse d'urée encombrée

Streith J. et collaborateurs ont développé un protocole pour produire des urées tétrasubstituées hautement encombrées (Streith *et al.*, 1995). Pour ce faire, ils ont activé la (2S)-2-méthylpipéridine avec le phosgène dans un mélange de toluène et de dichlorométhane (DCM) à basse température durant 1 journée. Cet intermédiaire est isolé, purifié et soumis à l'action de la 2,5-*trans*-diméthylpyrrolidine en présence de base forte et d'iodure de sodium (NaI) dans le DCM pendant deux journées supplémentaires. Ceci permet d'obtenir l'urée désirée dans un rendement global de 35%. Puisque ce dernier (2,5-diméthylpyrrolidine-1-carbonyl-2-méthylpipéridine) (schéma 10) est très similaire au groupement urée du BQ-788, nous nous sommes inspirés de cette méthodologie pour synthétiser le BQ-788 et analogues.

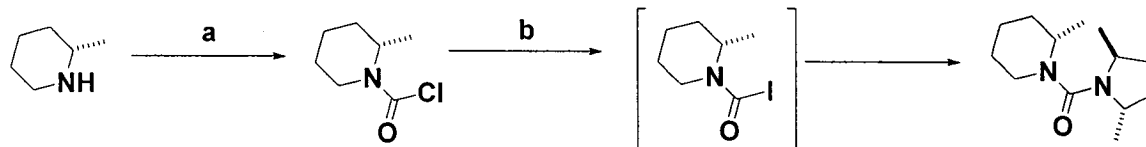


Schéma 10. Synthèse d'urée tétrasubstituées très encombrées (Streith *et al.*, 1995).

Réactifs et conditions : (a) Phosgène / toluène, TEA / DCM -20°C , puis t.p. 20 h (70%)

(b) 2,5-*trans*-diméthylpyrrolidine, DBU, NaI / DCM t.p. 48 h (50%).

3. Peptides fluorescents

Certaines molécules sont en mesure d'absorber une quantité suffisante d'énergie pour faire passer un électron de l'état basal à un niveau supérieur. L'électron dans l'état excité peut alors relaxer en libérant une partie de son énergie sous forme de radiation et revenir à l'état fondamental. Ce processus en 3 étapes se nomme la fluorescence. Comme l'électron perd une partie de son énergie avant d'émettre de la lumière, l'énergie émise est plus faible (de plus grande longueur d'onde) que celle absorbée. Ceci permet la détection de la molécule d'intérêt à une longueur d'onde significativement différente de celle émise. Le phénomène de fluorescence est particulièrement susceptible de se produire avec des molécules possédant des systèmes aromatiques fusionnés puisque la transition du niveau π au niveau π^* est de faible énergie. C'est le cas de la fluoresceine, la coumarine et le bodipy, par exemple, qui sont connus pour leur facilité à émettre à une longueur d'onde donnée lorsqu'irradié adéquatement. Ainsi, les méthodes de détection basées sur la fluorescence peuvent permettre l'analyse de paramètres biologiques avec une haute sensibilité (Daly & McGrath, 2003, Haughland, 1996, Skoog *et al.*, 1998).

En ce sens, une des premières applications en biologie de ces sondes fluorescentes consista à les coupler à des ligands connus pour reconnaître une certaine protéine (récepteur), dans le but ultime de connaître la localisation exacte dans un tissu hétérogène. Historiquement, ceci a conduit plusieurs groupes de recherche à lier ces sondes à des hormones du système nerveux afin de connaître avec précision les sites de liaisons de l'acétylcholine (ACh) (Anderson & Cohen, 1974), de l'adrénaline (Melamed *et al.*, 1976) et de l'histamine, par exemple (Petty & Francis, 1986). Il est également

possible d'extraire de l'informations concernant l'affinité du ligand pour le récepteur par cette méthode. De plus, ces techniques basés sur la fluorescence ont permis de visualiser l'internalisation de récepteurs membranaires (Haigler *et al.*, 1978). Ces nouvelles possibilités ont stimulés la recherche pour produire de nouveaux outils pharmacologiques fluorescents puissants, spécifiques et sélectifs pour des récepteurs d'intérêt. Quelques excellents ouvrages de revue portant sur des ligands conjugués avec un fluorophore sont disponibles (Baindur & Triggle, 1994, Daly & McGrath, 2003, McGrath & Daly, 2003, Middleton & Kellam, 2005).

Une problématique fréquemment rencontrée lors de la dérivatisation d'un ligand avec un fluorophore est la perte d'affinité dû à l'ajout du groupement fluorescent. En effet, le poids moléculaire de ces groupements fluorophores est généralement élevé comparativement à la molécule de départ, ce qui interfère souvent avec l'activité biologique des composés marqués. Les peptides sont des ligands de choix puisqu'ils sont généralement de haut poids moléculaires. Ainsi, plusieurs peptides ayant des effets au niveau du système cardiovasculaire comme l'angiotensine II (Ang II) (Forget *et al.*, 1975), l'Arg-vasopressine (AVP) (Eggena & Buku, 1989), la neurotensine (NT) (Faure *et al.*, 1994) et le peptide vasoactif intestinal (VIP) (Fabry *et al.*, 2000) ont déjà été dérivés avec un agent fluorescent produisant des analogues retenant les propriétés agonistes du peptide original. Pour le système endothélinergique, un analogue fluorescent de l'ET-1 a été développé pour permettre la détermination de l'affinité de nouveaux ligands pour le récepteur ET_A intégré à la membrane de particules de virus (Zemanova *et al.*, 2004). Bien qu'un agoniste ET_B, l'IRL 1620 (Boivin *et al.*, 2004) et un antagoniste ET_A, le TTA-386 (Tessier *et al.*, 2000) ont été dérivés avec des sondes photosensibles, aucune molécule

fluorescente sélective pour les récepteurs ET_A ou ET_B n'a été rapportée jusqu'à présent. Fait intéressant, il n'existe peu d'agonistes sélectifs pour le récepteur ET_A possédant une haute affinité (Langlois *et al.*, 2003) alors que plusieurs agonistes du récepteur ET_B et antagonistes des récepteurs ET_A et ET_B hautement sélectif ont été développés (Davenport, 2002). En ce sens, nous avons choisi de concevoir, synthétiser et caractériser pharmacologiquement de nouvelles molécules sélectives couplés à des sondes fluorescentes basées sur des antagonistes ET_A et ET_B sélectifs. De plus, ces antagonistes auront l'avantage de ne pas activer les voies de signalisation.

La stratégie générale la plus efficace pour dériver un peptide en molécule fluorescente consiste à le conjuguer de manière covalente à un groupement connu pour émettre de la fluorescence. Le peptide doit donc contenir un groupement fonctionnel susceptible à la conjugaison comme l'amine primaire du *N*-terminal ou d'une lysine; l'acide carboxylique du *C*-terminal, d'un acide aspartique ou d'un acide glutamique; ou plus rarement l'hydroxyle d'une sérine, d'une thréonine ou d'une tyrosine. Ce groupement fonctionnel réagira avec un ester activé pour former un ester ou un amide; un isocyanate pour former un carbamate ou un urée; un isothiocyanate pour former un isourée. À priori, la dérivatisation du BQ-123 et du BQ-788 peut sembler impossible puisqu'ils ne possèdent pas de *N*-terminal libre ni de fonctionnalité susceptible d'être dérivée sur une des chaînes latérales (l'acide carboxylique est libre mais critique pour l'activité et/ou la solubilité de ces composés). Il est par contre possible de substituer un des acides aminés ou fragment de la molécule afin d'introduire une fonctionnalité propice à la conjugaison, sans que cela n'interfère avec la caractéristique antagoniste souhaitée. Il est donc primordial de bien connaître la relation structure-activité des peptides à dériver.

En nous appuyant sur les données de la littérature, nous avons tenté dans le présent ouvrage, de synthétiser des analogues fluorescents et non-fluorescents du BQ-123 et BQ-788 retenant les caractéristiques d'affinité, de sélectivité et de spécificité des composés de référence.

4. Les modèles animaux pour la caractérisation pharmacologique

Mis à part les essais de liaison présentés dans la section 2.2, d'autres approches permettent d'identifier les caractéristiques pharmacodynamiques des endothélines et analogues dérivés. La prochaine section est un bref résumé des essais biologiques impliquant des animaux qui sont couramment utilisés dans la littérature pour identifier les caractéristiques de spécificité, de sélectivité et d'affinité des peptides de la famille des endothélines.

4.1 *In vitro*

4.1.1 Artère carotide de lapin

L'artère carotide isolé du lapin (A.C.L.) est une préparation pharmacologique sur laquelle l'effet de l'ET-1 est beaucoup plus puissant que l'effet de l'ET-3 (Calo *et al.*, 1996), ce qui est caractéristique d'une réponse médié par les récepteurs ET_A. Qui plus est, l'IRL 1620 et la sarafotoxine S6c, deux agonistes sélectifs pour le récepteur ET_B, sont

pratiquement inactifs dans cet essai biologique (White *et al.*, 1993, Calo *et al.*, 1996). Par ailleurs, les antagonistes sélectifs du récepteur ET_B comme le BQ-788, contrairement aux antagonistes du récepteur ET_A comme le BQ-123 et le BMS-182874, sont totalement inactifs dans cette préparation pharmacologique (Calo *et al.*, 1996, Maurice *et al.*, 1997, Webb *et al.*, 1995). L'artère carotide de lapin est donc une préparation de type monoréceptorielle ET_A.

4.1.2 Artère pulmonaire de lapin

Les effets contractiles de l'ET-1 sur l'artère pulmonaire de lapin (A.P.L.) ont été rapporté pour la première fois par Maggi et collaborateurs (Maggi *et al.*, 1989). En effet, dans ce vaisseau isolé et découpé en bandelette hélicoïdale, l'ET-1 possède une affinité apparente (pD_2) de 8.5. Une des propriétés les plus intéressantes de cet essai pharmacologique est certainement sa sélectivité pour détecter les agonistes activant le récepteur ET_B. La réponse de ce vaisseau (A.P.L.) face aux endothélines est majoritairement signalée via le récepteur ET_B puisque les trois endothélines ont pratiquement la même affinité apparente sur ce vaisseau, ce qui est caractéristique d'une réponse de type ET_B. Toutefois, les effets contractiles de l'ET-1 ne sont complètement bloqué qu'en présence d'antagonistes des deux sous-types de récepteurs (Fukuroda *et al.*, 1994b). Il est possible de palier à cela en utilisant un agoniste sélectif du récepteur ET_B tel l'IRL 1620 ou le BQ-3020. Dans le contexte de réponses contractiles induites par un agoniste sélectif pour le récepteur ET_B, les antagonistes sélectifs du récepteur ET_A comme le BQ-123 et le BMS 182874 sont totalement inactifs dans cette préparation

pharmacologique contrairement aux antagonistes pour le récepteur ET_B tel le BQ-788 (Calo *et al.*, 1996, Maurice *et al.*, 1997).

4.2 *In vivo*

4.2.1 La souris anesthésiée

La caractérisation pharmacologique des analogues de l'endothéline peut aussi se faire par le biais de modèles expérimentaux *in vivo* : chez le lapin (Gratton *et al.*, 2000), le cobaye (Honore *et al.*, 2002), le hamster (Honore *et al.*, 2004), la souris (Labonte *et al.*, 2001) et enfin l'homme (Haynes *et al.*, 1991). Plus particulièrement, notre groupe de recherche a démontré la contribution importante des récepteurs ET_A et ET_B de l'endothéline dans la réponse pressive à ce peptide chez la souris anesthésiée (Berthiaume *et al.*, 2000, Labonte *et al.*, 2001). De plus, il a été démontré dans ce modèle que les récepteurs ET_B endothéliaux jouaient un rôle antagoniste physiologique à l'encontre de la réponse pressive à l'endothéline (Berthiaume *et al.*, 2000). La souris anesthésiée est donc propice à la caractérisation des récepteurs de l'endothéline.

5. Buts et objectifs de l'étude

Le but à long terme de ce projet consiste à concevoir et synthétiser des molécules fluorescentes sélectives pour les récepteurs ET_A et ET_B de l'endothéline afin de les utiliser dans l'identification de ces récepteurs. Pour ce faire, nous avons choisi de dériver

le BQ-123 et le BQ-788, des antagonistes des récepteurs ET_A et ET_B, respectivement ; connu pour leur effet puissant et sélectif.

Dans un premier temps, nous voulions développer de nouvelles stratégies de synthèse permettant d'obtenir ceux-ci efficacement. De plus, nous voulions synthétiser de nouveaux analogues dérivés avec un agent fluorescent tout en préservant les caractéristiques de puissance, de sélectivité et de spécificité de leur activité biologique. En ce sens, un profil pharmacologique *in vitro* (pA₂) et *in vivo* sera produit pour chacune des nouvelles molécules d'intérêts en utilisant des protocoles déjà établi par notre groupe de recherche.

Plus précisément, nous voulons :

- 1) Développer des méthodologies efficaces pour synthétiser le BQ-123 et le BQ-788.
- 2) Valider la méthodologie utilisée pour la synthèse du BQ-788 en synthétisant quelques analogues dont la portion urée est modifiée.
- 3) Comparer les données physico-chimiques (RMN ¹H, SM, CCM et HPLC) et pharmacologiques *in vitro* et *in vivo* du BQ-123 et du BQ-788 suite à leur synthèse issus de nos protocoles avec les données originales.
- 4) Concevoir et synthétiser des analogues du BQ-123 et du BQ-788 couplés directement à un fluorophore ou indirectement à l'aide d'un espaceur en exploitant les voies de synthèse développées en 1).
- 5) Caractériser la puissance, la compétitivité et la sélectivité des nouvelles molécules d'intérêts sur des préparations monoréceptorielles riches en récepteur ET_A

(A.C.L.) et/ou en récepteur ET_B (A.P.L.) et les comparer avec le BQ-123 et le BQ-788.

- 6) Caractériser la spécificité des molécules d'intérêts particuliers dans un modèle murin *in vivo*.

MÉTHODOLOGIE

1. Procédure générale pour la synthèse peptidique

L'acide (2S,4S)-Boc-4-amino-1-Fmoc-pyrrolidine-2-carboxylique (Fmoc-Apro(Boc)-OH) a été acheté chez Multiple Peptide Synthesis. L'acide Boc-D-Val-OH, Boc-Leu-OH•H₂O, Boc-aminocaproïque (Boc-ε-Acp-OH) et le tétrafluoroborate 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium (TBTU) ont été achetés chez Chem-Impex International. Boc-D-Asp(OResin)OFm fut obtenu de Peptides International. L'1-hydroxybenzotriazole anhydre (HOBt) fut obtenu de Richelieu Biotechnologies et l'acide Fmoc-Pro-OH de Novabiochem. L'hexafluorophosphate de 2-(1H-benzotriazol-1-yloxy-tripyrrolidinophosphonium (PyBOP), l'acide aminoundécanoïque (H-Aua-OH), le tert-butyl méthyl éther (grade HPLC) et la pipéridine furent achetés de Sigma-Aldrich Canada Ltd. L'isopropanol (IPA) (grade ACS) fut acheté d'Anachemia. Le *N,N*-diméthylformamide (DMF) (grade ACS) a été fraîchement filtré sur tamis moléculaire (4 Å) avant utilisation. La purification des cyclopentapeptides a été faite sur une colonne C18 semi-préparative 25 x 250 mm avec un gradient de 20/80 à 60/40 MeCN (0.05% TFA)/H₂O (0.05% TFA) durant 90 min ou sur une plaque CCM préparative selon le système de solvant (F). La pureté des cyclopentapeptides a été vérifiée par le biais d'un HPLC Agilent série 110 avec une colonne analytique Eclipse XDB-C18 (5 µm, 4,6 x 150 mm) avec un gradient de 10/90 à 60/40 MeCN (0.1% TFA)/H₂O (0.1% TFA) à un flot de 1.0 mL/min pendant 20 min à différentes longueurs d'ondes (λ = 210-280 nm). La pureté des tripeptides linéaires a été vérifiée par le biais d'un HPLC Agilent série 110 avec une colonne analytique Eclipse XDB-C18 (5 µm, 4,6 x 250 mm) avec un gradient

de 10/90 à 60/40 MeCN (0.1% TFA)/H₂O (0.1% TFA) à un flot de 1.0 mL/min pendant 30 min à différentes longueurs d'ondes (λ = 210-280 nm). La pureté de tous les peptides a aussi été vérifiée sur plaque CCM avec un des systèmes de solvants suivants (E) n-BuOH/H₂O/AcOH (5/3/2), (F) DCM/MeOH/AcOH (16/2/1), (G) DCM/MeOH/AcOH (35/2/1), (H) AcOEt/Hex (75/25), (I) DCM/MeOH (90/10). Les rotations optiques $[\alpha]_D$ furent déterminés avec un polarimètre Perkin-Elmer 343. Les spectres de RMN ¹H et ¹³C ont été acquis dans le CDCl₃ ou le DMSO-d₆ à l'aide d'un spectromètre Bruker à 300 MHz et 75 MHz, respectivement. Les spectres de masse ont été obtenus à partir d'un spectromètre Micromass (Gaston Boulay) sous forme de SM IC, SM IE ou SM HR, ou d'un spectromètre Micromass Tof Spec 2F (Klaus Klarskov, Witold Neugebauer) sous forme de SM MALDI. Les acides aminés sont tous de configuration L sauf lorsqu'indiqué autrement.

1.1 Préparation de *cyclo*(Pro-D-Val-Leu-D-Trp-D-Asp) (BQ-123)

Boc-D-Asp(OResin)OFm 0.66 méq/g (3.600 g; 2.376 mmol) a été placé dans un flasque réactionnel approprié, suspendu dans du DCM (100 mL) et agité pendant 10 min. La déprotection du Boc a été effectuée en traitant la résine avec du TFA/DCM (40/60) (100 mL) pour 30 min. La résine fut subséquemment lavée avec du DCM (100 mL) pendant 10 min, et neutralisée avec du DIPEA/DCM 20/80 (100 mL) pendant 15 min, puis lavée avec de l'IPA (100 mL) durant 10 min, lavée avec du DCM (100 mL) pendant 10 min et enfin lavée avec du DMF (100 mL) pendant 10 min. Suite à cela, le Boc-D-Trp-OH (1.446 g; 4.752 mmol) dissous dans du DMF (10 mL) et le TBTU (0.801 g; 2.495 mmol) dissous dans du DMF (10 mL) ont été ajoutés, ainsi que du DIPEA (0,800

mL; 5.940 mmol). Le flasque contenant la résine et les réactifs a ensuite été agité pendant 90 min. La résine fut subséquemment lavée avec du DMF (100 mL) durant 10 min et ensuite lavée avec du DCM (100 mL) pendant 10 min. À ce moment, un test de Kaiser (Kaiser *et al.*, 1970) a été effectuée pour s'assurer que la réaction a été complétée. Le cycle de synthèse dans son intégrité a subséquemment été répété avec les acides aminés appropriés : Boc-Leu-OH (1.185 g; 4.752 mmol), Boc-D-Val-OH (1.033 g; 4.752 mmol) et finalement Fmoc-Pro-OH (1.603 g; 4.752 mmol). Finalement, la résine fut traitée avec de la pipéridine/DCM 50/50 (100 mL) pendant 45 min pour retirer les groupes protecteurs Fmoc et OFm. Par la suite le tout a été lavé avec du DCM (100 mL) pendant 10 min, et enfin avec du DMF (100 mL) pour une durée de 10 min. L'étape de cyclisation a ensuite été initié par l'addition de PyBOP (4.940 g; 9.504 mmol) dissous dans du DMF (10 mL) et HOBt (1.280 g; 9.504 mmol) dissous dans du DMF (10 mL) suivi de DIPEA (0,800 mL; 5.940 mmol). Le flasque a ensuite été agité 16 h. La résine fut ensuite lavée avec du DMF (100 mL) pour 10 min, avec du DCM (100 mL) pour 10 min, avec de l'IPA (100 mL) pour 10 min et enfin pendant 10 min avec du DCM (100 mL). Puis, la résine a été transférée dans un flasque de plastique spécialement conçu pour le clivage par HF_(l) et asséchée sous vide pour 20 min. Du HF_(l) (40 mL) a ensuite été ajouté dans le flasque et agité pour une période de 30 min à 0°C. Par la suite, le flasque a été réchauffé lentement jusqu'à la température de la pièce et le HF_(l) résiduel a été complètement chassé sous un jet d'azote anhydre pour deux heures. La résine résultante fut d'abord lavée au tert-butyl éther méthylique (50 mL) et filtrée. La résine fut ensuite extraite avec une solution de méthanol aqueuse (50/50) (75 mL) et les eaux d'extraction ont été séparée de la phase éther. La phase éther fut subséquemment centrifugée et le précipité

résultant a été solubilisé dans l'eau et finalement ajoutée à la fraction aqueuse principale. Cette dernière fraction fut concentrée *in vacuo* avec l'ajout de MeCN, et lyophilisée pour donner (1.160 g; 80%) de produit brut. Celui-ci a été purifié sur une colonne HPLC C18 semi-préparative et lyophilisé pour donner le BQ-123 (0.125 g; 9%) sous forme de poudre blanche: CCM R_f = 0.85 (E); HPLC t_R = 19.75 min; RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 0.59 (d, 3H, J = 6.5 Hz); 0.60-1.20 (m, 4H); 0.71 (d, 3H, J = 6.4 Hz); 0.81 (d, 3H, J = 6.7 Hz); 0.85 (d, 3H, J = 6.7 Hz); 1.50-2.00 (m, 4H); 2.20-2.30 (m, 1H); 2.32 (dd, 1H, J_1 = 3.8 Hz, J_2 = 16.1 Hz); 2.70-2.95 (m, 2H); 3.00-3.40 (m, 3H); 3.90-4.40 (m, 3H); 4.75 (d, 1H, J = 7.2 Hz); 4.90-5.05 (m, 1H); 6.94 (dd, 1H, J_1 = 7.1 Hz, J_2 = 7.7 Hz); 7.03 (dd, 1H, J_1 = 7.0 Hz, J_2 = 7.5 Hz); 7.12 (s, 1H); 7.30 (d, 1H, J = 7.9 Hz); 7.50-7.65 (m, 2H); 7.71 (d, 1H, J = 8.9 Hz); 8.75-8.90 (m, 2H); 10.80 (s, 1H); SM MALDI m/z 611 (M) $^+$.

1.2 Préparation de *cyclo*(Apro-D-Val-Leu-D-Trp-D-Asp) (BDN-123N)

La synthèse a été effectuée selon la procédure 1.1 jusqu'au dernier lavage en utilisant la résine Boc-D-Asp(OResin)OFm 0.66 méq/g (0,650 g; 0.430 mmol) et à l'exception de Fmoc-Apro(Boc)-OH (0.286 g; 0.860 mmol) comme dernier acide aminé. La déprotection finale du Boc a été effectué en traitant la résine avec du TFA/DCM (40/60) (25 mL) durant 30 min. Par la suite, le tout a été lavé avec du DCM (10 mL) pendant 10 min, neutralisé avec du DIPEA/DCM 20/80 (25 mL) pendant 15 min, lavé avec de l'IPA (25 mL) pendant 10 min, et enfin lavé avec du DCM (25 mL). Les étapes subséquentes furent identiques à la procédure 2.2. La phase aqueuse a été concentrée *in vacuo* et lyophilisée pour donner (0.091 g; 34%) de produit brut. Celui-ci a été purifié sur une colonne HPLC C18 semi-préparative et lyophilisé pour donner le produit final (0.024

g; 9 %) sous forme de poudre blanche: CCM R_f = 0.66 (E); HPLC t_R = 17.40 min; RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 0.58 (d, 3H, J = 6.4 Hz); 0.70-1.20 (m, 4H); 0.73 (d, 3H, J = 6.4 Hz); 0.84 (d, 3H, J = 6.6 Hz); 0.91 (d, 3H, J = 6.6 Hz); 1.45-1.60 (m, 1H); 1.70-1.85 (m, 1H); 2.20-2.40 (m, 2H); 2.70-3.00 (m, 2H); 3.20-3.50 (m, 2H); 3.70-3.85 (m, 1H); 3.90-4.10 (m, 3H); 4.20-4.35 (m, 1H); 4.90-5.10 (m, 2H); 6.95 (dd, 1H, J_1 = 7.2 Hz, J_2 = 7.6 Hz); 7.04 (dd, 1H, J_1 = 6.9 Hz, J_2 = 8.0 Hz); 7.13 (d, 2H, J = 2.0 Hz); 7.31 (d, 1H, J = 8.0 Hz); 7.40-7.60 (m, 2H); 7.81 (brs, 3H); 7.93 (d, 1H, J = 9.3 Hz); 8.71 (d, 1H, J = 4.0 Hz); 8.86 (d, 1H, J = 7.7 Hz); 10.84 (s, 1H); 12.35 (brs, 1H); SM MALDI m/z 626 (M) $^+$; $[\alpha]_D = +47.33^\circ$, (c = 1.010 dans le MeOH).

1.3 Préparation de *cyclo*(Apro(H- ϵ -Acp)-D-Val-Leu-D-Trp-D-Asp) (BDN-123NL)

La synthèse fut effectuée sur la résine Boc-D-Asp(OResin)OFm 0.66 méq/g (0,650 g; 0.430 mmol) selon la procédure 1.2 jusqu'à la déprotection finale du Boc. Par la suite, le Boc- ϵ -Acp-OH (0.099 g; 0.860 mmol) dissous dans du DMF (5 mL) et le TBTU (0.145 g; 0.451 mmol) dissous dans du DMF (5 mL) furent ajoutés suivi de DIPEA (0,187 mL; 1.075 mmol). Le flasque de réaction contenant la résine et les réactifs fut agité pendant 60 min. La résine fut lavée avec du DMF (25 mL) pendant 10 min et avec du DCM (25 mL) pendant 10 min. Les étapes subséquentes sont identiques à la procédure 2.2. La phase aqueuse a été concentrée *in vacuo* et lyophilisée pour donner (0.085 g; 27%) de produit brut. Celui-ci a été purifié sur une colonne HPLC C18 semi-préparative et lyophilisé pour donner le produit final (0.033 g; 10%) sous forme de poudre blanche: CCM R_f = 0.66 (E); HPLC t_R = 17.26 min; RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 0.59 (d, 3H, J = 6.5 Hz); 0.72 (d, 3H, J = 6.4 Hz); 0.83 (d, 3H, J = 6.6 Hz); 0.88 (d,

3H, $J = 6.7$ Hz); 0.90-1.10 (m, 1H); 1.10-1.30 (m, 4H); 1.45-1.60 (m, 4H); 1.60-1.80 (m, 1H); 2.00-2.20 (m, 3H); 2.35-2.65 (m, 2H); 2.70-3.00 (m, 5H); 3.60-3.75 (m, 1H); 3.90-4.05 (m, 1H); 4.10-4.30 (m, 3H); 4.70-4.90 (m, 1H); 4.90-5.10 (m, 1H); 6.94 (dd, 1H, $J_1 = 6.9$ Hz, $J_2 = 7.1$ Hz); 7.03 (dd, 1H, $J_1 = 6.9$ Hz, $J_2 = 7.6$ Hz); 7.14 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz); 7.30 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz); 7.40-7.70 (m, 5H); 7.70-7.90 (m, 2H); 8.69 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz); 8.80 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz); 10.82 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz); 12.34 (brs, 1H); SM MALDI m/z 740 (M)⁺; $[\alpha]_D = +46.42^\circ$, ($c = 1.019$ dans le MeOH).

1.4 Préparation de *cyclo*(Apro(FITC)-D-Val-Leu-D-Trp-D-Asp) (BDN-123NF)

Le *cyclo*(Apro-D-Val-Leu-D-Trp-D-Asp) (8.40 mg; 13.4 μ mol) a été traité avec de la pyridine (20 μ L), suivi de MeCN (250 μ L) et d'eau (250 μ L). Subséquentement, le FITC (15.70 mg; 40.2 μ mol) et le DIPEA (20 μ L) ont été ajoutés. La solution orange résultante a été agitée à température pièce à la noirceur. Après une heure, de l'eau (5 mL) a été ajouté et la solution a été lyophilisée. Le produit brut a été purifié par CCM préparative (DCM/MeOH/AcOH) (16/2/1) et lyophilisé pour donner le composé final (11.93 mg; 87 %) sous forme de poudre orange: CCM $R_f = 0.46$ (F); HPLC $t_R = 22.74$ min; RMN ¹H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 0.60 (d, 3H, $J = 6.3$ Hz); 0.65-1.00 (m, 1H); 0.71 (d, 3H, $J = 6.3$ Hz); 0.81 (d, 3H, $J = 8.4$ Hz); 0.86 (d, 3H, $J = 7.0$ Hz); 1.20-1.40 (m, 3H); 1.60-1.90 (m, 1H); 2.10-2.70 (m, 4H); 3.90-4.40 (m, 4H); 4.80-5.10 (m, 3H); 6.20-6.35 (m, 3H); 6.64 (d, 1H, $J = 9.6$ Hz); 6.83 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz); 6.93 (dd, 1H, $J_1 = 7.0$ Hz, $J_2 = 7.8$ Hz); 7.02 (dd, 1H, $J_1 = 7.1$ Hz, $J_2 = 8.2$ Hz); 7.04 (d, 1H, $J = 9.3$ Hz); 7.13 (s, 1H); 7.29 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz); 7.40-7.70 (m, 2H); 7.53 (d, 1H, $J = 7.4$ Hz); 7.83 (d, 1H, $J = 9.5$

Hz); 7.93 (d, 1H, $J = 9.3$ Hz); 8.00-8.15 (m, 1H); 9.70-9.90 (m, 1H); 10.82 (s, 1H); SM MALDI m/z 1015 (M)⁺.

1.5 Préparation de *cyclo*(Apro(FITC- ϵ -Acp)-D-Val-Leu-D-Trp-D-Asp) (BDN-123NLF)

L'étape de conjugaison au FITC a été effectuée tel que décrite pour le *cyclo*(Apro(FITC)-D-Val-Leu-D-Trp-D-Asp) en prenant le *cyclo*(Apro(H- ϵ -Acp)-D-Val-Leu-D-Trp-D-Asp) (8.85 mg; 12.0 μ mol). Le produit brut a été purifié par CCM préparative (DCM/MeOH/AcOH) (16/2/1) et lyophilisé pour donner le composé final (11.81 mg; 87 %) sous forme de poudre orange: CCM $R_f = 0.44$ (F); HPLC $t_R = 21.95$ min; RMN ¹H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 0.62 (d, 3H, $J = 6.1$ Hz); 0.72 (d, 3H, $J = 6.2$ Hz); 0.81 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz); 0.85 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz); 1.00-1.15 (m, 1H); 1.20-1.40 (m, 4H); 1.40-1.90 (m, 5H); 2.05-2.60 (m, 8H); 2.80-3.10 (m, 2H); 3.50-3.90 (m, 1H); 4.00-4.30 (m, 4H); 4.60-4.75 (m, 1H); 4.90-5.10 (m, 1H); 6.00 (s, 1H); 6.09 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz); 6.64 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz); 6.93 (dd, 1H, $J_1 = 7.0$ Hz, $J_2 = 7.6$ Hz); 6.95 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz); 7.02 (dd, 1H, $J_1 = 7.3$ Hz, $J_2 = 7.5$ Hz); 7.12 (s, 1H); 7.28 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz); 7.45-7.60 (m, 1H); 7.52 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz); 7.80-8.20 (m, 4H); 8.60-9.00 (m, 2H); 10.88 (s, 1H); SM MALDI m/z 1128 (M)⁺.

1.6 Préparation de 4-Boc-2,6-*cis*-diméthylpipérazine-1-carbonyl-Mle-D-Trp(1-COOMe)-D-Nle-ONBzl

La formation de l'urée a été effectuée telle que décrite pour le 2,6-*cis*-diméthylpipéridine-1-carbonyl-Mle-D-Trp(COOMe)-D-Nle-ONBzl en prenant le *N*-4-Boc-2,6-*cis*-diméthylpipérazine (0.086 g; 0.40 mmol). Le produit brut a été

chromatographié sur gel de silice avec un mélange AcOEt/hexane (50/50) pour donner le composé final (0.268 g; 52% global) sous forme de solide jaune pâle: CCM R_f = 0.15 (C); RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 0.80 (t, 3H, J = 7.1 Hz); 0.91 (s, 9H); 1.05-1.30 (m, 5H); 1.10 (d, 6H, J = 6.7 Hz); 1.40-1.90 (m, 8H); 1.44 (s, 9H); 2.60-2.80 (m, 2H); 3.18 (dd, 1H, J_1 = 5.6 Hz, J_2 = 14.6 Hz); 3.46 (dd, 1H, J_1 = 5.7 Hz, J_2 = 14.6 Hz); 3.60-4.00 (m, 5H); 4.01 (s, 3H); 4.40-4.50 (m, 1H); 4.62 (d, 1H, J = 6.3 Hz); 4.80-4.95 (m, 1H); 5.18 (d, 2H, J = 3.1 Hz); 6.15 (d, 1H, J = 9.1 Hz); 7.25 (ddd, 1H, J_1 = 1.0 Hz, J_2 = 7.3 Hz, J_3 = 7.7 Hz); 7.35 (ddd, 1H, J_1 = 1.1 Hz, J_2 = 7.7 Hz, J_3 = 7.7 Hz); 7.45-7.60 (m, 1H); 7.47 (d, 2H, J = 8.7 Hz); 7.48 (s, 1H); 7.59 (d, 1H, J = 7.7 Hz); 8.17 (d, 1H, J = 8.1 Hz); 8.23 (d, 2H, J = 8.8 Hz); RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 13.74, 19.79, 22.13, 26.42, 27.72, 28.26 (3 carbones), 29.65 (3 carbones), 30.39, 30.83, 45.39, 46.30, 46.97, 47.86, 52.72, 53.58, 53.73, 64.88, 80.05, 115.28, 116.10, 119.04, 123.18, 123.77 (2 carbones), 124.13, 125.01, 127.79 (2 carbones), 130.31, 135.45, 143.00, 147.53, 151.11, 155.12, 157.07, 171.08, 171.60, 173.80; SM MALDI m/z 778 (M-Boc) $^+$; $[\alpha]_D = +14.4^\circ$, (c = 1.147 dans le CHCl_3).

1.7 Préparation de Boc-4-Aua-2,6-*cis*-diméthylpipérazine-1-carbonyl-Mle-D-Trp(1-COOMe)-D-Nle-ONBzl

L'étape de couplage peptidique a été effectuée telle que décrite pour le Boc-Mle-D-Trp(COOMe)-D-Nle-ONBzl en prenant le 4-Boc-2,6-*cis*-diméthylpipérazine-1-carbonyl-Mle-D-Trp(1-COOMe)-D-Nle-ONBzl (0.447 g; 0.53 mmol) et le Boc-Aua-OH (0.316 g; 1.05 mmol). Le produit brut a été chromatographié sur gel de silice avec un mélange AcOEt/hexane (50/50) à (75/25) pour donner le composé final (0.213 g; 38% global)

sous forme de solide jaune pâle: CCM $R_f = 0.18$ (H); RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 0.80 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz), 0.91 (s, 9H), 1.00-1.85 (m, 30H), 1.43 (s, 9H), 2.28 (dd, 2H, $J_1 = 7.1$ Hz, $J_2 = 7.6$ Hz), 2.45-3.10 (m, 2H), 3.10-4.50 (m, 7H), 3.18 (dd, 1H, $J_1 = 5.6$ Hz, $J_2 = 14.7$ Hz), 3.45 (dd, 1H, $J_1 = 5.5$ Hz, $J_2 = 14.6$ Hz), 4.01 (s, 3H), 4.50-4.60 (m, 1H), 4.65-4.80 (m, 1H), 4.85-5.00 (m, 1H), 5.10-5.20 (m, 2H), 6.10-6.30 (m, 1H), 7.25 (ddd, 1H, $J_1 = 0.9$ Hz, $J_2 = 7.4$ Hz, $J_3 = 7.7$ Hz), 7.34 (ddd, 1H, $J_1 = 0.7$ Hz, $J_2 = 7.3$ Hz, $J_3 = 7.7$ Hz), 7.40-7.60 (m, 1H), 7.47 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 7.48 (s, 1H), 7.59 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz), 8.17 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 8.22 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz); RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 13.75, 19.60, 19.72, 19.82, 19.87, 22.13, 25.02, 26.43, 26.70, 27.72, 28.36 (3 carbones), 29.57 (3 carbones), 29.96, 30.34, 30.79, 30.84, 32.55, 40.53, 45.08, 46.04, 46.47, 46.57, 48.32, 52.69, 53.67, 64.79, 78.78, 115.18, 116.35, 119.03, 123.07, 123.71 (2 carbones), 124.01, 124.87, 127.64, 127.76, 130.28, 135.36, 143.03, 147.42, 151.06, 155.95, 157.09, 171.23, 171.62, 172.43, 174.09; SM MALDI m/z 961 (M-Boc) $^+$; $[\alpha]_D = +13.9^\circ$, ($c = 1.466$ dans le CHCl_3).

1.8 Préparation de 2,6-*cis*-diméthylpipérazine-1-carbonyl-Mle-D-Trp(1-COOMe)-D-Nle-OH (BDN-788N)

Le 4-Boc-2,6-*cis*-diméthylpipérazine-1-carbonyl-Mle-D-Trp(1-COOMe)-D-Nle-ONBzl (0.104 g; 0.12 mmol) a été dissous dans une solution de HCl/éther éthylique 2N (25 mL) et agité pendant 24 heures. Le mélange réactionnel a été concentré *in vacuo*. Des portions d'éther éthylique (3 x 100 mL) et de DCM (2 x 100 mL) supplémentaires ont été subséquentement ajoutés et évaporés manière répétitive pour éliminer l'excès de HCl. Le sel de chlorure d'hydrogène correspondant a été utilisé sans purification supplémentaire.

L'étape d'hydrogénation a été effectuée tel que décrite pour le *N*-1,1,5-triméthylhexylamine-1-carbonyl-Mle-D-Trp(COOMe)-D-Nle-OH à l'exception du solvant (DCM). Le produit brut été chromatographié sur gel de silice avec un mélange de DCM/MeOH/AcOH (16/2/1) et lyophilisé pour donner le composé final (0.039 g; 49% total) sous forme de poudre brune pâle: CCM R_f = 0.17 (F); HPLC t_R = 28.54 min; RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 0.75 (s, 9H), 0.80 (t, 3H, J = 6.6 Hz), 1.00-1.30 (m, 5H), 1.04 (d, 6H, J = 6.6 Hz), 1.33 (dd, 1H, J_1 = 10.1 Hz, J_2 = 13.9 Hz), 1.45-1.80 (m, 4H), 2.50-2.80 (m, 4H), 2.91 (dd, 1H, J_1 = 10.0 Hz, J_2 = 14.3 Hz), 3.11 (dd, 1H, J_1 = 3.0, J_2 = 14.6 Hz), 3.70-3.90 (m, 3H), 3.93 (s, 3H), 4.30-4.40 (m, 1H), 4.45-4.60 (m, 1H), 5.95 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 7.21 (dd, 1H, J_1 = 7.1 Hz, J_2 = 8.3 Hz), 7.29 (dd, 1H, J_1 = 7.1 Hz, J_2 = 7.4 Hz), 7.47 (s, 1H), 7.60-7.75 (m, 1H), 7.64 (d, 1H, J = 7.5 Hz), 8.03 (d, 1H, J = 8.0 Hz); SM MALDI m/z 643 (M) $^+$.

1.9 Préparation de 4-Aua-2,6-*cis*-diméthylpipérazine-1-carbonyl-Mle-D-Trp(1-COOMe)-D-Nle-OH (BDN-788NL)

Le retrait du Boc et l'étape d'hydrogénation ont été effectués tel que décrits pour la préparation du 2,6-*cis*-diméthylpipérazine-1-carbonyl-Mle-D-Trp(1-COOMe)-D-Nle-OH en prenant le 4-Aua-2,6-*cis*-diméthylpipérazine-1-carbonyl-Mle-D-Trp(1-COOMe)-D-Nle-ONBzl (0.134 g; 0.13 mmol). Le produit brut a été chromatographié sur gel de silice avec un mélange de (DCM/MeOH/AcOH) (16/2/1) et lyophilisé pour donner le composé final (0.080 g; 77% global) sous forme de poudre blanche: CCM R_f = 0.19 (F); HPLC t_R = 31.59 min; RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 0.74 (s, 9H), 0.79 (t, 3H, J = 6.5 Hz), 0.90-1.80 (m, 30H), 2.20-2.40 (m, 2H), 2.40-3.90 (m, 10H), 3.93 (s, 3H), 4.00-4.60 (m,

5H), 6.10-6.30 (m, 1H), 6.80-6.90 (m, 1H), 7.21 (dd, 1H, $J_1 = 7.1$ Hz, $J_2 = 7.3$ Hz), 7.29 (dd, 1H, $J_1 = 7.0$ Hz, $J_2 = 7.7$ Hz), 7.49 (s, 1H), 7.60-7.75 (m, 1H), 7.63 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz), 8.03 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz); SM MALDI m/z 826 (M)⁺.

1.10 Préparation de 4-FITC-2,6-*cis*-diméthylpipérazine-1-carbonyl-Mle-D-Trp(1-COOMe)-D-Nle-OH (BDN-788NF)

L'étape de conjugaison au FITC a été effectuée telle que décrite pour le *cyclo*(Apro-D-Val-Leu-D-Trp-D-Asp) en prenant le 2,6-*cis*-diméthylpipérazine-1-carbonyl-Mle-D-Trp(1-COOMe)-D-Nle-OH (4.50 mg; 7.0 μ mol). Le produit brut a été purifié par CCM préparative avec un mélange de (DCM/MeOH/AcOH) (16/2/1) pour donner le composé final (5.90 mg; 82%) sous forme de poudre jaune: CCM $R_f = 0.61$ (F); HPLC $t_R = 36.22$ min; RMN ¹H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 0.76 (s, 9H), 0.81 (t, 3H, $J = 5.1$ Hz), 1.00-1.80 (m, 16H), 2.40-2.70 (m, 4H), 2.90-3.70 (m, 4H), 3.80-4.05 (m, 1H), 3.94 (s, 3H), 4.20-4.70 (m, 3H), 6.10-6.40 (m, 3H), 6.62 (d, 2H, $J = 8.9$ Hz), 7.00 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 7.23 (dd, 1H, $J_1 = 7.0$ Hz, $J_2 = 8.0$ Hz), 7.30 (dd, 1H, $J_1 = 7.2$ Hz, $J_2 = 8.0$ Hz), 7.50-7.65 (m, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.64 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.90-8.15 (m, 1H), 8.04 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz); SM MALDI m/z 1098 (M+3Na)⁺.

1.11 Préparation de 4-FITC-Aua-2,6-*cis*-diméthylpipérazine-1-carbonyl-Mle-D-Trp(1-COOMe)-D-Nle-OH (BDN-788NLF)

L'étape de conjugaison au FITC a été effectuée tel que décrite pour le *cyclo*(Apro-D-Val-Leu-D-Trp-D-Asp) en prenant le 4-Aua-2,6-*cis*-diméthylpipérazine-1-carbonyl-Mle-D-Trp(1-COOMe)-D-Nle-OH (9.00 mg; 10.9 μ mol). Le produit brut a été purifié par

CCM préparative avec un mélange de (DCM/MeOH/AcOH) (16/2/1) pour donner le composé final (4.10 mg; 31%) sous forme de poudre jaune: CCM R_f = 0.46 (F); HPLC t_R = 27.70 min; RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 0.70-1.80 (m, 33H), 0.76 (s, 9H), 2.00-3.80 (m, 12H), 3.93 (s, 3H), 4.00-4.60 (m, 5H), 5.90-6.20 (m, 4H), 6.60-6.75 (m, 2H), 6.94 (d, 1H, J = 7.5 Hz), 7.23 (dd, 1H, J_1 = 6.4 Hz, J_2 = 8.0 Hz), 7.29 (dd, 1H, J_1 = 7.4 Hz, J_2 = 8.2 Hz), 7.56 (s, 1H), 7.60-7.70 (m, 1H), 8.04 (d, 1H, J = 8.2 Hz), 8.40-8.60 (m, 1H); SM MALDI m/z 1284 ($M+3\text{Na}$) $^+$.

1.12 Préparation de 4-Boc-2,6-*cis*-diméthylpipérazine (selon (Mühlebach & Pino, 2004))

Le (Boc) $_2$ O (1,091 g; 0,50 mmol) a été ajouté à une solution de 2,6-*cis*-diméthylpipérazine (0,571 g; 0,50 mmol) dans du dioxane/eau (10 mL) / (4,4 mL) à 0°C. Le mélange réactionnel a ensuite été réchauffé lentement à la température la pièce et agité pendant toute la nuit. Puis, il a été concentré *in vacuo* pour produire le composé final (1,067 g; 99%) qui a été utilisé sans aucune autre purification sous forme d'huile incolore: CCM R_f = 0.40 (I); RMN ^1H (300 MHz, CDCl $_3$) δ 1.05 (d, 6H, J = 6.3 Hz); 1.46 (s, 9H); 1.50-1.70 (m, 1H); 2.20-2.40 (m, 2H); 2.70-2.90 (m, 2H), 3.80-4.10 (m, 2H); SM IE m/z 214 (M) $^+$; SM HR calculée pour C $_{11}$ H $_{22}$ N $_2$ O $_2$, 214.1681 (M) $^+$; trouvée, 214.1678 (M) $^+$.

1.13 Préparation de Boc-Aua-OH

Le H-Aua-OH (2.013 g; 10,00 mmol) a été dissous dans du dioxane (25 mL) /eau (25 mL). Puis, la TEA (3.47 mL; 25,00 mmol), suivi de (Boc) $_2$ O (2,290 g; 10,50 mmol) ont été ajoutés et le mélange réactionnel a été agité pendant toute la nuit à température

pièce. Subséquentement, le mélange a été concentré *in vacuo*, dissous dans de l'AcOEt (50 mL) et lavé avec de l'acide citrique 10% (50 mL). Par après, la phase aqueuse a été extraite avec de l'AcOEt (2 x 50 mL). Les phases organiques ont été combinées, lavées à la saumure, séchées sur du MgSO₄, filtrées et enfin évaporées pour donner le composé final (2,958 g; 98%) qui a été utilisé sans aucune autre purification sous forme de poudre blanche: CCM R_f = 0.57 (I); RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 1.20-1.55 (m, 14H); 1.44 (s, 9H); 1.62 (tt, 2H, J_1 = 7.2 Hz, J_2 = 7.5 Hz); 2.34 (t, 2H, J = 7.5 Hz); 3.09 (dt, 2H, J_1 = 6.3 Hz, J_2 = 5.9 Hz); 4.45-4.60 (brs, 1H); SM IE m/z 302 (M+H)⁺; SM HR calculée pour C₁₆H₃₂NO₄, 302.2331 (M+H)⁺; trouvée, 302.2336 (M+H)⁺.

2. Procédure générale pour les études *in vivo*

Brièvement, des souris C57BL/6 ou CD-1 de sexe non différencié (25-30 g) ont été anesthésiées avec un mélange de kétamine/xylazine (74/9.3 mg/kg i.m.). La veine jugulaire gauche et la carotide droite ont été cannulées avec un cathéter de polyéthylène (PE-10) pour l'administration des substances et pour la mesure continue de la pression artérielle (MAP), respectivement. Les variations de pression artérielle (mm Hg) ont été mesurée à l'aide d'un 'Blood Pressure Analyzer' (BPA). Après la chirurgie, les animaux ont été stabilisés entre 15 et 20 min. Les antagonistes (1.0 mg/kg i.v.) ou le véhicule (5% DMSO dans du PBS) a été administré par voie intraveineuse 5 min avant l'injection d'un agoniste (0.05 à 0.5 nmol/kg i.v.). Les réponses pharmacologiques aux divers agonistes ont été enregistrées pour au moins 30 min après l'injection de chaque agent presseur. Le volume d'injection de toutes les substances testées a toujours été restreint à un maximum 40 µL.

RÉSULTATS

Article 1

Development of an efficient strategy for the synthesis of the ET_B receptor antagonist BQ-788 and some related analoguesJean-Philippe Brosseau, Pedro D'Orléans-Juste, Witold A. Neugebauer¹*Department of Pharmacology, Université de Sherbrooke Medical School, Sherbrooke, Québec, J1H 5N4 Canada*

ABSTRACT

BQ-788 [N-*cis*-2,6-dimethylpiperidine-1-carbonyl-L- γ -methylleucyl-D-1-methoxycarbonyltryptophanyl-D-norleucine sodium salt] is a very potent and selective ET_B receptor antagonist. The formation of the highly hindered trisubstituted urea functionality in the peptide chain and the carbamation on the indole nitrogen of the tryptophan side chain are major challenges in the synthesis of this particular antagonist. Furthermore, the high cost of the unnatural amino acids in the sequence of BQ-788 and its reported synthesis render this pseudopeptide very expensive to produce. In order to improve the yield and to reduce the number of steps compared to previous reported syntheses, we developed an efficient strategy involving a novel one-pot procedure for the synthesis of a highly hindered trisubstituted urea. Under very mild conditions, the urea was obtained by using triphosgene and sodium iodide. This strategy allowed us to synthesize BQ-788 in seven steps with an overall yield of 53%. We also generalized the use of this powerful methodology by creating some new structural analogues of the *cis*-2,6-dimethylpiperidine moiety by replacing it with other bulky secondary amines. We evaluated the antagonist properties of those three new analogues of BQ-788 in two bioassays in vitro. These new antagonists were less potent than BQ-788 in an ET_B rich preparation and inactive in an ET_A rich preparation.

Keywords: BQ-788; ET_B antagonist; trisubstituted urea; carbamoyl chloride; triphosgene; IIDQ.

¹ Corresponding author. Tel.: + (819) 820 6861;
Fax: + (819) 564 5400.
E-mail address: witold.neugebauer@usherbrooke.ca

1. INTRODUCTION

Endothelin-1 (ET-1), initially isolated from endothelial cells, is a very potent vasoconstrictive peptide [32]. Subsequently, two other isoforms of ET-1 (ET-2 and ET-3) were reported [14]. ET-1 shows a very strong affinity for two types of G-protein-coupled receptors (GPCRs): ET_A and ET_B. ET_A receptors [1] mediate vasoconstriction and are predominantly located in vascular smooth muscles. ET_B receptors [27] are functionally linked to vasodilation on endothelial cells; however in certain low resistance vessels they can also mediate vasoconstriction. In the last ten years, ET_B receptors antagonists such as BQ-788 [16, 26] (Fig. 1.) have been used towards the identification of the role of the ET_B receptor subtype in physiological and/or pathophysiological conditions. As reviewed by D'Orléans-Juste et al. [9], ET_B receptors modulate vascular tone and clearance of circulating ET-1 in several species including humans. Thus, powerful antagonists such as BQ-788 have contributed to the pharmacological characterization of ET receptor subtypes in several assays in vitro and in vivo.

On the other hand, the high cost of the unnatural amino acids present in the sequence of BQ-788 as well as its reported syntheses [13, 15] (see Table 2) render this commercially available compound very expensive to produce. The highly hindered urea in the peptide chain and the substitution on the indole nitrogen of the tryptophan side chain are the key elements of this very demanding synthesis.

As pointed out by He et al. [13], Ishikawa et al. encountered several synthetic problems regarding BQ-788 as described in their patent [15]. The main difficulties were related to the formation of the sterically hindered urea functionality, the racemization of the tryptophan during carbamination and the facile reduction of the indole ring of the tryptophan during catalytic hydrogenation. Nevertheless, the general strategy of limiting the number of steps to a minimum, by performing the carbamination directly on the dipeptide moiety in a C→N-terminal approach, was a positive point. In doing so, they achieved the synthesis of BQ-788 in eight steps starting from the corresponding amino acid esters with the exception of Boc-D-Trp-OH. However, the overall yield was not reported.

On the other hand, He et al. [13] published a synthesis of BQ-788 in fifteen steps from the corresponding Boc amino acids, with an overall yield of 23%. The downsides of their synthesis included the uncommon $N \rightarrow C$ elongation, the repetitive protection/deprotection procedures that could have been avoided and the formation of the urea bond in two steps. Nonetheless, in contrast to Ishikawa et al. [15], He et al. [13] succeeded in developing very mild and racemization-free conditions for the carbamation on the indole nitrogen of the tryptophan as well as reliable conditions for the hydrogenolysis of the benzyl ester groups.

In order to improve the yield and to reduce the number of steps, we have developed what we believe to be a more efficient and straightforward synthesis of BQ-788. Our approach involves a novel one-pot procedure for the synthesis of a highly hindered trisubstituted urea based on the work of Streith et al. [29]. Moreover, we adopted this new synthetic route towards novel analogues of BQ-788 by using different bulky secondary amines. Finally, the pharmacodynamic properties of the synthesized BQ-788 and of the new analogues made were compared to the same commercially available ET_B antagonist in ET_A and ET_B selective bioassays *in vitro* [7].

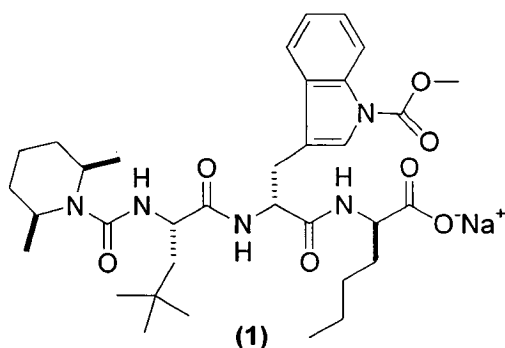


Fig. 1. Structure of BQ-788.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 General Procedures for the peptide synthesis

Boc-D-Trp-OH, Boc-D-Nle-OH and H- γ -methylLeu-OH (H-Mle-OH) were purchased from Bachem Biosciences (PA). Sodium iodide (NaI) was purchased from

Anachemia. Cesium carbonate (Cs_2CO_3), $\text{HCl}_{(\text{g})}$ anhydrous, 2-isobutoxy-1-isobutoxycarbonyl-1,2-dihydroquinoline (IIDQ), *cis*-2,6-dimethylpiperidine, 2,2,6,6-tetramethylpiperidine, *N,N*-diisopropylamine, *N,N*-dicyclohexylamine, triphosgene, *p*-nitrobenzyl bromide, palladium on activated carbon 5% (Pd/C 5%), *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA), 4-dimethylaminopyridine (DMAP), trifluoroacetic acid (TFA) were purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd. Dimethyldicarbonate was purchased from Fluka. *N,N*-dimethylformamide (DMF), acetonitrile (MeCN), diethyl ether (ethyl ether), ethyl acetate (EtOAc), hexane, chloroform (CHCl_3), methanol (MeOH), formic acid and acetic acid (AcOH) were of reagent ACS grade, except dichloromethane (DCM) which was distilled prior to use. ^1H and ^{13}C NMR data were taken with Bruker spectrometer at 300 MHz and 75 MHz respectively. Mass spectrometry was performed with Micromass spectrometer (Micromass) as CI MS, EI MS or HR MS, or with Micromass Tof Spec 2F as MALDI MS. Chromatographies were done with silica gel 60 from Silicycle. The purity of the final products were verified on an Agilent HPLC with ZORBAX SB-C18 column at gradient 10/90 to 76/24 MeCN (0.1% TFA)/water (0.1% TFA) at a flow rate 1.5 mL/min over 22 min ($\lambda = 280$ nm). R_f values were taken from silica gel TLC in the following solvent systems: (A) EtOAc/hexane (15/85), (B) EtOAc/hexane (33/66), (C) EtOAc/hexane (50/50), (D) $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ (95/5/4). Optical rotations as $[\alpha]_D$ were taken with a Perkin-Elmer Polarimeter 343. Amino acids were of L configuration unless otherwise indicated.

2.2 Peptide synthesis

2.2.1 Preparation of Boc-D-Nle-ONBzl (3)

Cs_2CO_3 (5.86 g; 18.00 mmol) and *p*-nitrobenzyl bromide (2.04 g; 9.45 mmol) were added to a solution of **2** (2.08 g; 9.00 mmol) in DMF (10 mL). The reaction was stirred for 2.5 hours at room temperature and EtOAc (100 mL) was added. The solution was then washed with saturated NaHCO_3 (2 x 50 mL). Aqueous layers were combined and extracted with EtOAc (2 x 50 mL). The organic layers were combined, were washed with brine, were dried with anhydrous MgSO_4 , were filtered and concentrated under reduced pressure to give a yellow oily product. The crude material was then chromatographed on

silica gel with EtOAc/hexane (5/95 to 15/85) to yield **3** (3.35 g; 100%) as a yellow oil: TLC R_f = 0.33 (A); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.88 (t, 3H, J = 7.0 Hz), 1.23-1.38 (m, 4H), 1.44 (s, 9H), 1.61-1.85 (m, 2H), 4.34 (dt, 1H, J_1 = 5.4 Hz, J_2 = 8.0 Hz), 4.93 (d, 1H, J = 8.1 Hz), 5.26 (d, 2H, J = 3.2 Hz), 7.52 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 8.23 (d, 2H, J = 8.7 Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 13.75, 22.16, 27.41, 28.20 (3 carbons), 31.95, 53.52, 65.17, 79.17, 123.66 (2 carbons), 128.29 (2 carbons), 142.85, 147.80, 155.40, 172.68; CI MS m/z 384 ($\text{M}+\text{NH}_4$) $^+$; HR MS calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_6$, 367.1869 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$; found, 367.1862 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$; $[\alpha]_D = +21.77^\circ$, (c = 1.337 in DMF).

2.2.2 Preparation of Boc-D-Trp-D-Nle-ONBzl (**4**)

$\text{HCl}_{(\text{g})}$ anhydrous was bubbled for 1 hour in a flask containing ethyl ether (400 mL). Part of this solution (200 mL) was transferred into another flask containing **3** (3.14 g; 8.55 mmol) and was stirred for 24 hours. The reacting mixture was then concentrated under reduced pressure. Additional ethyl ether (3 x 100 mL) was added and evaporated under reduced pressure repeatedly to remove the excess HCl. DCM (2 x 100 mL) was added and evaporated under reduced pressure repeatedly. The resulting solid was used without further purification and yield $\text{HCl}\cdot\text{H-D-Nle-ONBzl}$ (2.62 g) as a yellow pale solid: TLC R_f = 0.06 (D); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.85 (t, 3H, J = 7.0 Hz), 1.28-1.54 (m, 4H), 2.04-2.15 (m, 2H), 4.13 (br s, 1H), 5.31 (s, 2H), 7.55 (d, 2H, J = 8.6 Hz), 8.21 (d, 2H, J = 8.6 Hz), 8.96 (br s, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 13.58, 21.98, 26.90, 30.03, 53.31, 66.33, 123.78 (2 carbons), 128.56 (2 carbons), 141.65, 147.78, 169.29; EI MS m/z 267 ($\text{M}-\text{Cl}$) $^+$; HR MS calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_4$, 267.1345 ($\text{M}-\text{Cl}$) $^+$; found, 267.1349 ($\text{M}-\text{Cl}$) $^+$; $[\alpha]_D = -3.58^\circ$, (c = 1.230 in DMF).

A solution of IIDQ (5.24 g; 17.25 mmol) in DCM (10 mL) was added to a suspension of Boc-D-Trp-OH (2.63 g; 8.62 mmol) in DCM (30 mL) and was allowed to stir for 15 min at room temperature. A solution of $\text{HCl}\cdot\text{H-D-Nle-ONBzl}$ (2.62 g; 8.62 mmol) and DIPEA (3.75 mL; 21.57 mmol) in DCM (20 mL) was added to the reaction. The reacting mixture was stirred for 24 hours at room temperature. Then, it was washed with 10% citric acid (3 x 50 mL). The aqueous layers were combined and extracted with DCM (2 x 50 mL). The organic layers were combined, were washed with saturated NaHCO_3 and brine, were dried with anhydrous MgSO_4 , were filtered and concentrated

under reduced pressure to give an orange oily product. The crude material was then chromatographed on silica gel with EtOAc/hexane (25/75 to 30/70) to yield **4** (4.37 g; 88% overall) as a yellow solid: TLC R_f = 0.54 (C); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.80 (t, 3H, J = 7.2 Hz), 1.05-1.26 (m, 4H), 1.43 (s, 9H), 1.50-1.76 (m, 2H), 3.18 (dd, 1H, J_1 = 4.5 Hz, J_2 = 14.6 Hz), 3.32 (dd, 1H, J_1 = 7.2 Hz, J_2 = 14.6 Hz), 4.40-4.50 (m, 1H), 4.53 (dt, 1H, J_1 = 5.5 Hz, J_2 = 7.0 Hz), 5.12-5.20 (m, 1H), 5.16 (s, 2H), 6.30 (d, 1H, J = 7.7 Hz), 7.09 (d, 1H, J = 2.4 Hz), 7.12 (ddd, 1H, J_1 = 1.2 Hz, J_2 = 7.8 Hz, J_3 = 8.8 Hz), 7.19 (ddd, 1H, J_1 = 1.2 Hz, J_2 = 7.0 Hz, J_3 = 8.0 Hz), 7.35 (d, 1H, J = 7.7 Hz), 7.47 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 7.65 (d, 1H, J = 7.7 Hz), 8.06 (br s, 1H), 8.21 (d, 2H, J = 8.7 Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 13.77, 22.17, 27.11, 27.99, 28.25 (3 carbons), 31.76, 52.34, 55.10, 65.30, 80.50, 110.26, 111.25, 118.75, 119.62, 122.13, 123.38, 123.77 (2 carbons), 127.44, 128.30 (2 carbons), 136.25, 142.60, 147.66, 155.59, 171.63, 171.81; EI MS m/z 552 (M^+); HR MS calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_7$, 552.2584 (M^+); found, 552.2578 (M^+); $[\alpha]_D = +11.02^\circ$, (c = 0.926 in AcOH).

2.2.3 Preparation of Boc-D-Trp(COOMe)-D-Nle-ONBzl (**5**)

DMAP (0.143 g; 1.16 mmol) followed by dimethyldicarbonate (5.21 g; 38.80 mmol) were added to a solution of **4** (4.30 g; 7.77 mmol) in MeCN (125 mL). The resulting solution was allowed to stir for 24 hours. Then, it was concentrated under reduced pressure. It was dissolved with EtOAc (100 mL) and was washed with 1N HCl (2 x 50 mL). The aqueous layers were combined and extracted with EtOAc (2 x 50 mL). The organic layers were combined and washed with water, were dried with anhydrous MgSO_4 , were filtered and concentrated under reduced pressure to give a yellow pale solid product. The crude material was then chromatographed on silica gel with EtOAc/hexane (25/75) to yield **5** (4.51 g; 95%) as a white solid: TLC R_f = 0.24 (B); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.80 (t, 3H, J = 7.1 Hz), 1.08-1.28 (m, 4H), 1.43 (s, 9H), 1.56-1.75 (m, 2H), 3.18 (m, 2H), 4.01 (s, 3H), 4.42-4.48 (m, 1H), 4.54 (dt, 1H, J_1 = 5.4 Hz, J_2 = 7.5 Hz), 5.04-5.12 (m, 1H), 5.17 (s, 2H), 6.36 (d, 1H, J = 7.2 Hz), 7.26 (ddd, 1H, J_1 = 1.2 Hz, J_2 = 7.1 Hz, J_3 = 8.2 Hz), 7.33 (ddd, 1H, J_1 = 1.2 Hz, J_2 = 7.3 Hz, J_3 = 7.6 Hz), 7.46 (d, 2H, J = 8.5 Hz), 7.48 (s, 1H), 7.59 (d, 1H, J = 7.3 Hz), 8.14 (d, 1H, J = 7.7 Hz), 8.22 (d, 2H, J = 8.8 Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 13.71, 22.13, 27.20, 27.71,

28.17 (3 carbons), 31.70, 52.30, 53.62, 54.24, 65.28, 80.13, 115.08, 116.40, 119.02, 122.89, 123.69 (2 carbons), 123.87, 124.70, 128.23 (2 carbons), 130.26, 135.32, 142.62, 147.59, 151.17, 155.53, 171.39, 171.65; EI MS m/z 610 (M)⁺; HR MS calcd for $C_{31}H_{38}N_4O_9$, 610.2639 (M)⁺; found, 610.2645 (M)⁺; $[\alpha]_D = +7.34^\circ$, ($c = 1.063$ in MeOH).

2.2.4 Preparation of Boc-Mle-D-Trp(COOMe)-D-Nle-ONBzl (6)

HCl_(g) anhydrous was bubbled for 1 hour in a flask containing ethyl ether (400 mL). Part of this solution (200 mL) was transferred into another flask containing **5** (3.79 g; 6.35 mmol) and was stirred for 24 hours. The reacting mixture was then concentrated under reduced pressure. Additional ethyl ether (3 x 100 mL) was added and evaporated under reduced pressure repeatedly to remove the excess HCl. DCM (2 x 100 mL) was added and evaporated under reduced pressure repeatedly. The resulting solid was used without further purification and yield HCl·H-D-Trp(COOMe)-D-Nle-ONBzl (3.48 g) as a white powder: TLC $R_f = 0.10$ (D); ¹H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 0.84 (t, 3H, $J = 6.5$ Hz), 1.21-1.39 (m, 4H), 1.67-1.79 (m, 2H), 3.01 (dd, 1H, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 14.6$ Hz), 3.15 (d, 1H, $J = 4.6$ Hz), 3.18 (dd, 1H, $J_1 = 5.1$ Hz, $J_2 = 14.6$ Hz), 3.95 (s, 3H), 4.05-4.15 (m, 1H), 4.39 (dt, 1H, $J_1 = 5.0$ Hz, $J_2 = 7.8$ Hz), 5.24 (s, 2H), 7.25 (dd, 1H, $J = 7.4$ Hz, 7.5 Hz), 7.34 (dd, 1H, $J = 7.2$ Hz, $J = 8.1$ Hz), 7.59 (d, 2H, $J = 7.8$ Hz), 7.60 (s, 1H), 7.80 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz), 8.04 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz), 8.17 (d, 2H, $J = 7.8$ Hz), 8.26 (br s, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 14.15, 22.15, 26.88, 27.72, 30.84, 51.99, 52.75, 54.40, 65.22, 114.58, 114.94, 120.14, 123.04, 123.86 (2 carbons), 124.96, 125.60, 128.79 (2 carbons), 130.35, 135.29, 143.93, 147.40, 151.16, 168.90, 171.61; CI MS m/z 493 ($M-NH_4$)⁺; HR MS calcd for $C_{26}H_{27}N_3O_7$, 493.1849 ($M-NH_4$)⁺; found, 493.1856 ($M-NH_4$)⁺; $[\alpha]_D = -1.94^\circ$, ($c = 1.033$ in MeOH).

A solution of IIDQ (3.83 g; 12.61 mmol) in DCM (10 mL) was added to a solution of Boc-Mle-OH [33] (1.55 g; 6.30 mmol) in DCM (30 mL) and was allowed to stir for 15 min at room temperature. A solution of HCl·H-D-Trp(COOMe)-D-Nle-ONBzl (3.45 g; 6.30 mmol) and DIPEA (2.3 mL ; 15.70 mmol) in DCM (20 mL) was added to the reaction. The reacting mixture was allowed to stir for 24 hours at room temperature. Then, it was washed with 10% citric acid (3 x 50 mL). The aqueous layers were combined and extracted with DCM (2 x 50 mL). The organic layers were combined and

were washed with saturated NaHCO_3 and brine, were dried with anhydrous MgSO_4 , were filtered and concentrated under reduced pressure to give an orange oily product. The crude material was then chromatographed on silica gel with EtOAc/hexane (25/75) to yield **6** (4.22 g; 91% overall) as a yellow pale solid: TLC R_f = 0.56 (C); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.80 (t, 3H, J = 7.1 Hz), 0.90 (s, 9H), 1.08-1.30 (m, 4H), 1.30-1.81 (m, 4H), 1.34 (s, 9H), 3.14 (dd, 1H, J_1 = 6.8 Hz, J_2 = 14.6 Hz), 3.35 (dd, 1H, J_1 = 5.8 Hz, J_2 = 14.6 Hz), 3.88-3.95 (m, 1H), 4.01 (s, 3H), 4.48 (dt, 1H, J_1 = 5.3 Hz, J_2 = 8.0 Hz), 4.75-4.79 (m, 2H), 5.17 (s, 2H), 6.49 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 6.72 (d, 1H, J = 6.7 Hz), 7.26 (ddd, 1H, J_1 = 0.9 Hz, J_2 = 6.4 Hz, J_3 = 7.6 Hz), 7.34 (ddd, 1H, J_1 = 1.1 Hz, J_2 = 7.3 Hz, J_3 = 8.1 Hz), 7.48 (s, 1H), 7.49 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 7.64 (d, 1H, J = 7.6 Hz), 8.16 (d, 1H, J = 7.8 Hz), 8.22 (d, 2H, J = 8.8 Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 13.74, 22.07, 26.89, 27.46, 28.18 (3 carbons), 28.27, 29.53 (3 carbons), 30.31, 31.23, 45.49, 52.60, 52.86, 53.68, 65.14, 80.08, 115.17, 116.15, 119.05, 123.08, 123.72 (2 carbons), 124.11, 124.86, 128.13 (2 carbons), 130.15, 135.38, 142.77, 147.56, 151.14, 155.53, 170.89, 171.45, 173.28; EI MS m/z 737 (M^+); HR MS calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{51}\text{N}_5\text{O}_{10}$, 737.3636 (M^+); found, 737.3627 (M^+); $[\alpha]_D = +3.90^\circ$, (c = 1.064 in MeOH).

2.2.5 Preparation of *N*-cis-2,6-dimethylpiperidine-1-carbonyl-Mle-D-Trp(COOMe)-D-Nle-ONBzl (10)

$\text{HCl}_{(\text{g})}$ anhydrous was bubbled for 1 hour in a flask containing ethyl ether (400 mL). Part of this solution (200 mL) was transferred into another flask containing **6** (3.40 g; 4.60 mmol) and was stirred for 24 hours. Then, the reacting mixture was concentrated under reduced pressure. Additional ethyl ether (3 x 100 mL) was added and evaporated under reduced pressure repeatedly to remove the excess HCl. DCM (2 x 100 mL) was added and evaporated under reduced pressure repeatedly. The resulting solid was used without further purification and yield **7** (3.11 g) as a yellow solid: TLC R_f = 0.13 (D); ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 0.57 (s, 9H), 0.85 (t, 3H, J = 6.7 Hz), 1.18-1.37 (m, 6H), 1.76-1.81 (m, 2H), 2.83 (dd, 1H, J_1 = 10.6 Hz, J_2 = 14.6 Hz), 3.02 (dd, 1H, J_1 = 3.6 Hz, J_2 = 14.8 Hz), 3.65-3.75 (m, 1H), 3.94 (s, 3H), 4.28-4.35 (m, 1H), 4.68-4.74 (m, 1H), 5.26 (s, 2H), 7.24 (dd, 1H, J_1 = 7.3 Hz, J_2 = 7.6 Hz), 7.31 (dd, 1H, J_1 = 7.3 Hz, J_2 = 7.9 Hz), 7.56 (s, 1H), 7.63 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.71 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 8.01 (d, 1H, J = 8.1 Hz),

8.14-8.19 (m, 3H), 8.18 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz), 8.83 (d, 1H, $J = 7.2$ Hz), 8.95 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 13.80, 21.78, 27.29, 28.75 (3 carbons), 29.38, 29.96, 44.23, 50.05, 52.43, 52.53, 53.92, 64.67, 114.51, 116.62, 119.39, 122.63, 123.47 (2 carbons), 124.49, 124.54, 128.45 (2 carbons), 129.79, 134.85, 143.83, 147.02, 150.74, 169.34, 171.10, 171.52; CI MS m/z 638 (M-Cl) $^+$; HR MS calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{44}\text{N}_5\text{O}_8$, 638.3190 (M-Cl) $^+$; found, 638.3177 (M-Cl) $^+$; $[\alpha]_D = +10.6^\circ$, ($c = 1.015$ in MeOH).

To a flame dried round bottom flask under nitrogen atmosphere, **8** (1.24 mL; 9.20 mmol) and DIPEA (2.00 mL; 11.50 mmol) were allowed to dissolve in DCM (15 mL) in an ice/NaCl bath at -15°C . Then, an immediately prepared solution of triphosgene (0.916 g; 3.08 mmol) in DCM (5 mL) was added over a 5 min period and was allowed to stir for another 15 min at -15°C . The bath was removed and the reaction was warmed up to room temperature for 1 hour. The reacting mixture was then concentrated under reduced pressure and was dissolved in MeCN (20 mL) to yield **9**. NaI (3.45 g; 23.00 mmol) was added and allowed to stir for 5 min. Subsequently, **7** (3.11 g; 4.60 mmol) and DIPEA (2.00 mL; 11.50 mmol) were dissolved in MeCN (10 mL) and this solution was added to the flask under nitrogen atmosphere. The reacting mixture was allowed to stir for 24 hours at room temperature. Reaction progress was monitored by TLC and two fresh portions of activated amine **9** were needed to drive the reaction to completion. The reaction mixture was then concentrated under reduced pressure, was diluted with DCM and was washed with 1N HCl (3 x 100 mL). Aqueous layers were combined and extracted with DCM (3 x 100 mL). The organic layers were combined and were washed with highly concentrated $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ and brine, were dried with anhydrous MgSO_4 , were filtered and concentrated under reduced pressure to give a yellow pale solid product. The crude material was then chromatographed on silica gel with EtOAc/hexane (40/60) to yield **10** (2.71g; 87% overall) as a white solid: TLC $R_f = 0.33$ (C); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.80 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz), 0.92 (s, 9H), 1.05 (d, 3H, $J = 6.9$ Hz), 1.06 (d, 3H, $J = 7.0$ Hz), 1.09-1.87 (m, 14H), 3.18 (dd, 1H, $J_1 = 5.3$ Hz, $J_2 = 14.7$ Hz), 3.48 (dd, 1H, $J_1 = 5.5$ Hz, $J_2 = 14.7$ Hz), 3.77-4.05 (m, 3H), 4.01 (s, 3H), 4.45 (dt, 1H, $J_1 = 1.7$ Hz, $J_2 = 8.4$ Hz), 4.54 (d, 1H, $J = 6.2$ Hz), 4.92 (dt, 1H, $J_1 = 5.6$ Hz, $J_2 = 9.4$ Hz), 5.19 (s, 2H), 6.12 (d, 1H, $J = 9.4$ Hz), 7.25 (ddd, 1H, $J_1 = 1.0$ Hz, $J_2 = 7.3$ Hz, $J_3 = 7.7$ Hz), 7.35 (ddd, 1H, $J_1 = 1.1$ Hz, $J_2 = 7.2$ Hz, $J_3 = 8.2$ Hz), 7.47 (s, 1H), 7.48 (d, 2H, $J = 8.9$ Hz), 7.59 (d, 1H,

$J = 7.4$ Hz), 7.77 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 8.18 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 8.23 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 13.28, 13.76, 20.33, 20.45 (2 carbons), 22.11, 26.29, 27.85, 29.68 (3 carbons), 29.84 (2 carbons), 30.38, 30.60, 45.24, 45.35, 45.97, 52.66, 52.89, 53.71, 64.81, 115.25, 116.19, 119.07, 123.16, 123.71 (2 carbons), 124.09, 124.97, 127.75 (2 carbons), 130.36, 135.45, 143.16, 147.45, 151.09, 157.46, 171.33, 171.59, 174.00; MALDI MS m/z 799.4271 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$; $[\alpha]_D = +8.5^\circ$, ($c = 1.069$ in MeOH).

2.2.6 Preparation of *N-cis-2,6-dimethylpiperidine-1-carbonyl-Mle-D-Trp(COOMe)-D-Nle-OH* (**11**)

5% Pd/C (catalytic amount ~100 mg) was carefully added to a solution of **10** (1.88 g; 2.40 mmol) in ethyl ether (15 mL) containing formic acid (0.300 mL; 2%). The solution was shaken under an hydrogen atmosphere (50 psi). After 2 hours, the resulting mixture was filtered on celite and was evaporated under reduced pressure to yield a yellow oily product. The crude material was then chromatographed on silica gel with EtOAc/hexane/AcOH (35/65/1 to 50/50/1) until yellow by-product was discarded and was lyophilized to yield **11** (1.25 g; 81%) as a white powder: TLC $R_f = 0.36$ (D); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.83 (s, 9H), 0.83 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz), 1.14 (d, 6H, $J = 6.9$ Hz), 1.20-2.00 (m, 14H), 3.29 (d, 2H, $J = 6.2$ Hz), 3.90-4.20 (m, 3H), 4.01 (s, 3H), 4.29 (dt, 1H, $J_1 = 4.6$ Hz, $J_2 = 8.5$ Hz), 4.75 (dt, 1H, $J_1 = 6.3$ Hz, $J_2 = 8.3$ Hz), 5.08 (d, 1H, $J = 5.5$ Hz), 6.75 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 7.24 (ddd, 1H, $J_1 = 0.9$ Hz, $J_2 = 7.1$ Hz, $J_3 = 7.2$ Hz), 7.34 (ddd, 1H, $J_1 = 1.1$ Hz, $J_2 = 7.7$ Hz, $J_3 = 7.7$ Hz), 7.50 (s, 1H), 7.56 (d, 1H, $J = 9.8$ Hz), 7.67 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 8.16 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz); MALDI MS m/z 664.2201 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$; $[\alpha]_D = +19.6^\circ$, ($c = 0.998$ in DMF).

2.2.7 Preparation of *N-cis-2,6-dimethylpiperidine-1-carbonyl-Mle-D-Trp(COOMe)-D-Nle-ONa⁺* (**1**) (*BQ-788*).

Distilled water (10 mL) was added to a solution of **11** (1.25 g; 1.95 mmol) in MeOH (15 mL). Few drops of MeOH were added (to reverse the solution to its initial clarity) followed by NaHCO_3 (0.164 g; 1.95 mmol). The solution was then allowed to stir for 1 hour. Subsequently, it was concentrated under reduced pressure, was dissolved in MeOH (5 mL), was precipitated with distilled water (100 mL) and was finally

lyophilized to yield **1** (1.30 g; 100%) as a white powder: HPLC t_R = 7.64; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 0.75 (s, 9H), 0.79 (t, 3H, J = 6.5 Hz), 0.82-1.80 (m, 14H), 0.99 (d, 6H, J = 6.3 Hz), 2.94 (dd, 1H, J_1 = 9.8 Hz, J_2 = 14.5 Hz), 3.11 (dd, 1H, J_1 = 3.7 Hz, J_2 = 14.5 Hz), 3.70-3.90 (m, 1H), 3.93 (s, 3H), 4.00-4.20 (m, 2H), 4.20-4.28 (m, 1H), 4.45-4.60 (m, 1H), 5.97 (d, 1H, J = 8.1 Hz), 7.21 (dd, 1H, J_1 = 7.3 Hz, J_2 = 7.4 Hz), 7.29 (dd, 1H, J_1 = 7.2 Hz, J_2 = 8.0 Hz), 7.48 (s, 1H), 7.55-7.70 (m, 1H), 7.64 (d, 1H, J = 7.7 Hz), 8.02 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 8.10-8.20 (m, 1H); MALDI MS m/z 664.2653 (M) $^+$; $[\alpha]_D^{25}$ = +3.8°, (c = 1.032 in MeOH).

2.2.8 Preparation of N-1,1,5-trimethylhex-4-enylamine-1-carbonyl-Mle-D-Trp(COOMe)-D-Nle-ONBzl (15) and N-1,1,5-trimethylhex-5-enylamine-1-carbonyl-Mle-D-Trp(COOMe)-D-Nle-ONBzl (16) (mixture).

To a flame dried round bottom flask under nitrogen atmosphere, **12** (0.356 mL; 2.10 mmol) was allowed to dissolve in DCM (10 mL) in an ice/NaCl bath at -15°C. Then, an immediately prepared solution of triphosgene (0.099 g; 0.33 mmol) in DCM (5 mL) was added over a 5 min period and was allowed to stir for another 10 min at -15°C. The bath was then removed and the reaction was warmed up to room temperature for 1 hour. The reacting mixture was concentrated under reduced pressure and was dissolved in MeCN (20 mL). NaI (0.150 g; 1.00 mmol) was added and allowed to stir 5 min. **7** (0.135 g; 0.20 mmol) and DIPEA (0.087 mL; 0.50 mmol) were then dissolved in MeCN (5 mL). This solution was added to the flask under nitrogen atmosphere. The reacting mixture was allowed to stir for 24 hours at room temperature following which, it was concentrated under reduced pressure, was suspended with DCM (50 mL) and was extracted with 1N HCl (2 x 20 mL). Aqueous layers were combined and extracted with DCM (2 x 20 mL). The organic layers were combined and were washed with highly concentrated $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ and brine, were dried with anhydrous MgSO_4 , were filtered and concentrated under reduced pressure to give a yellow pale solid. The crude material was then chromatographed on silica gel with EtOAc/hexane (25/75 to 35/65) to yield mixed **15** and **16** (0.114 g; 71% overall) as a white solid: TLC R_f = 0.25 (B); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.79 (t, 3H, J = 7.1 Hz), 0.89 (s, 9H), 1.00-2.00 (m, 16H), 1.10 (d, 6H, J = 3.5 Hz), 1.17 (s, 6H), 1.54 (s, 6H), 1.64 (d, 6H), 3.16 (dd, 1H, J_1 = 6.2 Hz, J_2 = 14.7

Hz), 3.36 (dd, 1H, $J_1 = 6.0$ Hz, $J_2 = 14.6$ Hz), 3.93-4.00 (m, 1H), 4.00 (s, 3H), 4.30-4.40 (m, 1H), 4.47 (dt, 1H, $J_1 = 5.5$ Hz, $J_2 = 7.9$ Hz), 4.55-4.65 (m, 1H), 4.61 (s, 1H), 4.66 (s, 1H), 4.80 (dt, 1H, $J_1 = 6.2$, $J_2 = 6.5$ Hz), 5.02 (m, 1H), 5.16 (s, 2H), 6.50-6.60 (m, 1H), 7.09-7.16 (m, 1H), 7.24 (ddd, 1H, $J_1 = 1.0$ Hz, $J_2 = 7.2$ Hz, $J_3 = 7.4$ Hz), 7.33 (ddd, 1H, $J_1 = 1.1$ Hz, $J_2 = 7.7$ Hz, $J_3 = 7.8$ Hz), 7.46 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 7.47 (s, 1H), 7.59 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz), 8.15 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 8.21 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 13.78 (2 carbons), 17.54, 22.09 (2 carbons), 22.33, 22.86, 25.62, 26.89, 27.17, 27.28, 27.32, 27.71, 29.64 (3 carbons), 30.63, 31.02, 37.88, 40.58, 40.87, 45.68, 52.47, 52.72, 52.76, 52.83, 53.72, 65.05, 109.82, 115.20, 116.14, 119.09, 123.10, 123.71 (2 carbons), 124.24, 124.90, 128.05 (2 carbons), 130.23, 131.35, 135.36, 142.89, 145.68, 147.52, 151.19, 157.12, 171.23, 171.49, 174.54; MALDI MS m/z 827.1745 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$; $[\alpha]_D = +5.2^\circ$, ($c = 1.079$ in MeOH).

2.2.9 Preparation of *N*-1,1,5-trimethylhexylamine-1-carbonyl-Mle-D-Trp(COOMe)-D-Nle-OH (17)

5% Pd/C (catalytic amount ~20 mg) was carefully added to a solution of mixed **15** and **16** (0.074 g; 0.088 mmol) in ethyl ether (15 mL) containing formic acid (0.300 mL; 2%). The solution was shaken under an hydrogen atmosphere (50 psi). After 2 hours, the resulting mixture was filtered on celite and was evaporated under reduced pressure to yield a yellow oily product. The crude material was then chromatographed on silica gel with EtOAc/hexane/AcOH (35/65/1 to 50/50/1) and lyophilized to yield **14** (0.018 g; 20%) as a white powder: TLC $R_f = 0.44$ (D); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.77 (s, 9H), 0.82 (t, 3H, $J = 4.4$ Hz), 0.84 (d, 6H, $J = 6.5$ Hz), 1.05-1.90 (m, 15H), 1.07 (s, 3H), 1.17 (s, 3H), 3.21 (dd, 1H, $J_1 = 7.5$ Hz, $J_2 = 14.9$ Hz), 3.30 (dd, 1H, $J_1 = 5.5$, $J_2 = 15.0$ Hz), 4.00-4.10 (m, 1H), 4.02 (s, 3H), 4.40-4.50 (m, 1H), 4.66 (dt, 1H, $J_1 = 6.8$ Hz, $J_2 = 7.0$ Hz), 5.10-5.20 (m, 1H), 5.80-5.90 (m, 1H), 6.77 (d, 1H, $J = 7.4$ Hz), 7.16 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz), 7.23 (dd, 1H, $J_1 = 7.2$ Hz, $J_2 = 7.3$ Hz), 7.34 (dd, 1H, $J_1 = 7.2$ Hz, $J_2 = 7.7$ Hz), 7.49 (s, 1H), 7.57 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz), 8.15 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz); MALDI MS m/z 694.2147 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$; $[\alpha]_D = +4.9^\circ$, ($c = 1.005$ in MeOH).

2.2.10 Preparation of N-1,1,5-trimethylhexylamine-1-carbonyl-Mle-D-Trp(COOMe)-D-Nle-ONa⁺ (18)

Distilled water (2 mL) was added to a solution of **17** (0.018 g; 0.026 mmol) in MeOH (3 mL). Few drops of MeOH were added (to reverse the solution to its initial clarity) followed by NaHCO₃ (2.26 mg; 0.026 mmol). The solution was then allowed to stir 1 hour. Subsequently, it was concentrated under reduced pressure, was dissolved in MeOH (0.5 mL), was precipitated with distilled water (10 mL) and was finally lyophilized to yield **18** (0.018 g; 100%) as a white powder: HPLC t_R = 4.60 min; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 0.69 (s, 9H), 0.77 (t, 3H, J = 4.8 Hz), 0.79 (d, 6H, J = 6.6 Hz), 1.00-1.70 (m, 15H), 1.06 (s, 3H), 1.13 (s, 3H), 2.89 (dd, 1H, J_1 = 10.4 Hz, J_2 = 14.8 Hz), 3.10 (dd, 1H, J_1 = 4.1 Hz, J_2 = 14.6 Hz), 3.70-3.85 (m, 1H), 3.92 (s, 3H), 4.14 (dt, 1H, J_1 = 4.9 Hz, J_2 = 8.3 Hz), 4.43 (dt, 1H, J_1 = 3.0 Hz, J_2 = 9.2 Hz), 5.93 (br s, 1H), 6.00-6.20 (m, 1H), 7.25 (ddd, 1H, J_1 = 0.9 Hz, J_2 = 6.9 Hz, J_3 = 7.5 Hz), 7.30 (ddd, 1H, J_1 = 1.2 Hz, J_2 = 7.6 Hz, J_3 = 7.7 Hz), 7.51 (s, 1H), 7.60-7.70 (m, 1H), 7.64 (d, 1H, J = 7.5 Hz), 8.03 (d, 1H, J = 8.1 Hz), 8.50-8.70 (m, 1H); MALDI MS m/z 694.1746 (M)⁺; [α]_D = -4.6°, (c = 1.032 in DMF).

2.2.11 Preparation of N,N-dicyclohexylamine-1-carbonyl-Mle-D-Trp(COOMe)-D-Nle-ONBzl (21)

The urea formation was performed as described for the mixture of compound **15** and **16** (see section 2.2.8) taking **19** (0.418 mL ; 2.10 mmol) to yield **21** (0.080 g; 47% overall) as a white solid: TLC R_f = 0.42 (B); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.80 (t, 3H, J = 7.1 Hz), 0.93 (s, 9H), 0.90-1.90 (m, 28 H), 3.14-3.30 (m, 2H), 3.17 (dd, 1H, J_1 = 5.5 Hz, J_2 = 14.6 Hz), 3.49 (dd, 1H, J_1 = 5.7 Hz, J_2 = 14.6 Hz), 3.79 (dt, 1H, J_1 = 5.5 Hz, J_2 = 9.2 Hz), 4.01 (s, 3H), 4.49-4.57 (m, 2H), 4.88-4.93 (m, 1H), 5.17 (s, 2H), 6.10 (d, 1H, J = 9.3 Hz), 7.25 (ddd, 1H, J_1 = 1.1 Hz, J_2 = 7.3 Hz, J_3 = 7.7 Hz), 7.35 (ddd, 1H, J_1 = 1.3 Hz, J_2 = 7.2 Hz, J_3 = 8.3 Hz), 7.47 (s, 1H), 7.50 (d, 2H, J = 8.9 Hz), 7.59 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 7.68 (d, 1H, J = 8.1 Hz), 8.18 (d, 1H, J = 8.3 Hz), 8.23 (d, 2H, J = 8.9 Hz); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 13.81, 22.08, 25.29 (2 carbons), 25.39, 26.21 (4 carbons), 26.32, 28.03, 29.78 (3 carbons), 30.42, 30.78, 31.14 (2 carbons), 31.64 (2 carbons), 45.69, 52.61, 52.78, 53.62, 53.71, 55.20, 64.86, 115.26, 116.15, 119.07, 123.19, 123.78 (2 carbons),

124.09, 125.01, 127.73 (2 carbons), 130.33, 135.46, 143.06, 147.43, 151.07, 157.55, 171.45, 171.57, 173.96; MALDI MS m/z 867.3962 ($M+Na$)⁺; $[\alpha]_D = +6.1^\circ$, ($c = 1.099$ in MeOH).

2.2.12 Preparation of *N,N*-dicyclohexylamine-1-carbonyl-Mle-D-Trp(COOMe)-D-Nle-OH (22)

Hydrogenation was performed as described for compound **17** (see section 2.2.9) taking **21** (0.074 g; 0.088 mmol) to yield **22** (0.034 g; 55%) as a white powder: TLC $R_f = 0.54$ (D); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.83 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz), 0.85 (s, 9H), 0.95-1.95 (m, 28H), 3.25 (dd, 1H, $J_1 = 5.5$ Hz, $J_2 = 14.7$ Hz), 3.30-3.40 (m, 2H), 3.34 (dd, 1H, $J_1 = 6.5$ Hz, $J_2 = 14.7$ Hz), 3.90-4.00 (m, 1H), 4.00 (s, 3H), 4.36 (dt, 1H, $J_1 = 4.8$ Hz, $J_2 = 5.3$ Hz), 4.70 (d, 1H, $J = 3.6$ Hz), 4.71-4.78 (m, 1H), 6.60-6.70 (m, 1H), 7.25 (dd, 1H, $J_1 = 7.2$ Hz, $J_2 = 7.4$ Hz), 7.34 (dd, 1H, $J_1 = 7.5$ Hz, $J_2 = 8.0$ Hz), 7.50 (s, 1H), 7.54-7.60 (m, 1H), 7.59 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz), 8.16 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz); MALDI MS m/z 732.1672 ($M+Na$)⁺; $[\alpha]_D = +5.5^\circ$, ($c = 0.999$ in MeOH).

2.2.13 Preparation of *N,N*-dicyclohexylamine-1-carbonyl-Mle-D-Trp(COOMe)-D-Nle⁻O-Na⁺ (23)

The sodium salt was obtained as described for compound **18** (see section 2.2.10) taking **22** (0.034 g; 0.05 mmol) to yield **23** (0.035 g; 100%) as a white powder: HPLC $t_R = 7.64$ min; ¹H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 0.75 (s, 9H), 0.81 (t, 3H, $J = 6.7$ Hz), 0.90-1.80 (m, 28H), 2.92 (dd, 1H, $J_1 = 9.7$ Hz, $J_2 = 14.7$ Hz), 3.00-3.20 (m, 2H), 3.08 (dd, 1H, $J_1 = 4.0$ Hz, $J_2 = 15.1$ Hz), 3.70-3.80 (m, 1H), 3.92 (s, 3H), 4.10-4.30 (m, 1H), 4.53 (dt, 1H, $J_1 = 3.7$ Hz, $J_2 = 8.9$ Hz), 5.75 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz), 7.23 (dd, 1H, $J_1 = 7.2$ Hz, $J_2 = 7.7$ Hz), 7.29 (dd, 1H, $J_1 = 7.4$ Hz, $J_2 = 7.7$ Hz), 7.45 (s, 1H), 7.55 (d, 1H, $J = 6.8$ Hz), 7.63 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz), 8.02 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz), 8.09 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz); MALDI MS m/z 732.1467 (M)⁺; $[\alpha]_D = +4.3^\circ$, ($c = 1.005$ in DMF).

2.2.14 Preparation of *N,N*-diisopropylamine-1-carbonyl-Mle-D-Trp(COOMe)-D-Nle-ONBzl (26)

The urea formation was performed as described for the mixture of compound **15** and **16** (see section 2.2.8) taking **24** (0.298 mL; 2.10 mmol) to yield **26** (0.086 g; 56% overall) as a white solid: TLC R_f = 0.29 (B); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.79 (t, 3H, J = 7.1 Hz), 0.91 (s, 9H), 1.07-1.84 (m, 8H), 1.09 (d, 12H, J = 6.9 Hz), 3.18 (dd, 1H, J_1 = 5.3 Hz, J_2 = 14.7 Hz), 3.45 (dd, 1H, J_1 = 5.5 Hz, J_2 = 14.7 Hz), 3.74 (septuplet, 2H, J = 6.9 Hz), 3.82-3.89 (m, 1H), 4.01 (s, 3H), 4.45 (d, 1H, J = 6.2 Hz), 4.49 (dt, 1H, J_1 = 4.8 Hz, J_2 = 8.2 Hz), 4.88 (dt, 1H, J_1 = 5.8 Hz, J_2 = 9.1 Hz), 5.18 (s, 2H), 6.22 (d, 1H, J = 9.2 Hz), 7.25 (ddd, 1H, J_1 = 0.8 Hz, J_2 = 7.4 Hz, J_3 = 7.5 Hz), 7.35 (ddd, 1H, J_1 = 1.2 Hz, J_2 = 7.2 Hz, J_3 = 8.3 Hz), 7.50 (d, 2H, J = 8.9 Hz), 7.51-7.60 (m, 2H), 7.59 (d, 1H, J = 7.3 Hz), 8.17 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 8.23 (d, 2H, J = 8.9 Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 13.77, 20.90 (2 carbons), 21.27 (2 carbons), 22.08, 26.43, 27.83, 29.71 (3 carbons), 29.79, 30.40, 30.68, 45.24, 47.73, 52.63, 52.90, 53.35, 53.71, 64.88, 115.24, 116.21, 119.10, 123.17, 123.76 (2 carbons), 124.08, 124.98, 127.84 (2 carbons), 130.31, 135.98, 143.04, 147.72, 151.26, 157.27, 171.37, 171.58, 174.00; MALDI MS m/z 787.0080 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$; $[\alpha]_D^{25}$ = + 7.7°, (c = 1.267 in MeOH).

2.2.15 Preparation of *N,N*-diisopropylamine-1-carbonyl-Mle-D-Trp(COOMe)-D-Nle-OH (27)

Hydrogenation was performed as described for compound **17** (see section 2.2.9) taking **26** (0.077 g; 0.10 mmol) to yield **27** (0.034 g; 54%) as a white powder: TLC R_f = 0.51 (D); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.82 (t, 3H, J = 7.2 Hz), 0.84 (s, 9H), 1.15-1.95 (m, 8H), 1.17 (d, 6H, J = 6.9 Hz), 1.19 (d, 6H, J = 7.0 Hz), 3.25 (dd, 1H, J_1 = 5.7 Hz, J_2 = 14.9 Hz), 3.33 (dd, 1H, J_1 = 7.2 Hz, J_2 = 15.0 Hz), 3.75-3.90 (m, 1H), 3.82 (septuplet, 2H, J = 6.9 Hz), 4.01 (s, 3H), 4.28-4.36 (m, 1H), 4.68-4.78 (m, 2H), 6.72-6.78 (m, 1H), 7.25 (ddd, 1H, J_1 = 1.0 Hz, J_2 = 7.6 Hz, J_3 = 7.8 Hz), 7.34 (ddd, 1H, J_1 = 1.0 Hz, J_2 = 7.3 Hz, J_3 = 7.3 Hz), 7.47-7.55 (m, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.59 (d, 1H, J = 7.7 Hz), 8.15 (d, 1H, J = 8.0 Hz); MALDI MS m/z 652.1367 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$; $[\alpha]_D^{25}$ = + 6.7°, (c = 0.988 in MeOH).

2.2.16 Preparation of *N,N*-diisopropylamine-1-carbonyl-Mle-D-Trp(COOMe)-D-Nle-O⁻Na⁺ (**28**)

The sodium salt was obtained as described for compound **18** (see section 2.2.10) and taking **27** (0.028 g; 0.04 mmol) to yield **28** (0.029 g; 100%) as a white powder: HPLC t_R = 3.16 min; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.73 (s, 9H), 0.79 (t, 3H, J = 6.8 Hz), 0.85- 1.80 (m, 8H), 1.04 (d, 6H, J = 6.5 Hz), 1.06 (d, 6H, J = 6.5 Hz), 2.92 (dd, 1H, J_1 = 10.0 Hz, J_2 = 14.6 Hz), 3.10 (dd, 1H, J_1 = 3.4 Hz, J_2 = 14.5 Hz), 3.65 (septuplet, 2H, J = 6.6 Hz), 3.85-4.00 (m, 1H), 3.92 (s, 3H), 4.24 (dt, 1H, J_1 = 2.6 Hz, J_2 = 8.3 Hz), 4.54 (dt, 1H, J_1 = 3.6 Hz, J_2 = 9.0 Hz), 5.64 (d, 1H, J = 8.4 Hz), 7.21 (dd, 1H, J_1 = 7.2 Hz, J_2 = 8.0 Hz), 7.29 (dd, 1H, J_1 = 7.2 Hz, J_2 = 7.5 Hz), 7.50 (s, 1H), 7.66 (d, 1H, J = 7.7 Hz), 7.71 (d, 1H, J = 7.1 Hz), 8.02 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 8.20-8.30 (m, 1H); MALDI MS m/z 652.2451 (M)⁺; $[\alpha]_D$ = + 7.8°, (c = 1.070 in DMF).

2.3 General procedures for pharmacodynamic characterization

2.3.1 Ethics

The care of animals and all research protocols conformed to the guiding principles for animal experimentation as enunciated by the Canadian Council on Animal Care and approved by Ethical Committee on Animal Research of the Université de Sherbrooke Medical School.

2.3.2 Animals

All experiments were performed on blood vessels removed from New Zealand White rabbits (1.25-1.75 kg) (Réjean Brisebois, Fleurimont, Canada) of either sex anaesthetized with ketamine/xylazine (100 mg/kg, i.m.) and subsequently euthanized by spinal transection.

2.3.3 Rabbit pulmonary and carotid artery

The vessels were removed and mechanically denuded of their endothelium. The rabbit carotid arteries were cut into 4-5 mm wide rings, while rabbit pulmonary arteries were cut into spiral strips about 10-12 mm long and 3 mm wide. The tissues were immediately suspended in 5 mL baths containing warmed (37°C) and oxygenated (95%O₂/5%CO₂) Krebs solution containing indomethacin (1 µM). The tissues were stretched for an equilibration period of 60 min with an initial resting tension of 2 g and 1 g for the carotid and pulmonary arteries, respectively, before initiation of experimental procedures. The incubation medium was replaced every 15 min. During a 60 min equilibration period, the tension of tissues was constantly reapplied in all blood vessels. Changes in vascular isometric tone were detected by isometric transducers (Grass Model FT03C) and recorded on a physiograph (Grass Model 7). Before each experiment, the absence of endothelium was confirmed by the inability of the tissue, precontracted with noradrenaline (1 µM), to relax in response to acetylcholine (1 µM). Concentration-response curves to each agonist were initiated 15 min after application of the antagonist. The antagonists were evaluated in terms of displacement to the right of the agonist-induced concentration-response curves. The pA₂ values and correlation coefficient (r) were obtained by Schild plot regression analysis [2]. Controls with vehicle-treated tissues were always run in parallel. ED₅₀ values for the agonist were calculated from the linear regression of the dose response curve within 15% and 85% of the maximal effect for each agonist. ED₅₀ values were then transformed into pD₂ values (negative logarithm of the ED₅₀).

2.3.4 Drugs and solutions

ET-1 and IRL 1620 were purchased from American Peptide (CA). Trizma-base, phosphate-buffered saline (PBS) (pH = 7.4) were purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd. Tested antagonists were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) prior to PBS solution (5% DMSO to PBS solution). Agonists were dissolved in a PBS solution and indomethacin in Trizma-base (0.2 M).

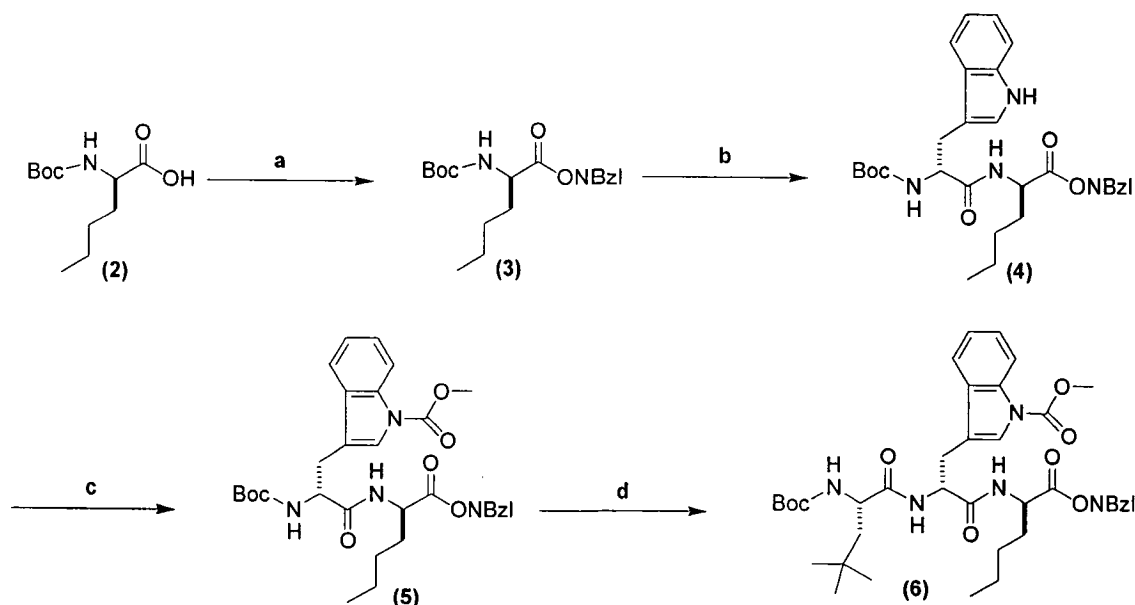
3. RESULTS

3.1 Synthesis of BQ-788

As shown in Scheme 1, **2** was protected with *p*-nitrobenzyl bromide via its cesium salt [13]. After removal of the Boc protecting group, the resulting HCl salt was coupled to Boc-D-Trp-OH in the presence of an excess of IIDQ as coupling agent [5, 18]. Carbamation of the indole nitrogen on the dipeptide **4** succeeded with a high yield (95%) using dimethyldicarbonate in the presence of DMAP in MeCN [13], with no indication of epimerization of either residues. Subsequent deprotection of the Boc group of **5** and coupling with Boc-Mle-OH [33] using IIDQ led to the tripeptide **6** a yield of 91%. In this manner, **6** was obtained from **2** in four steps in an excellent overall yield of 75%.

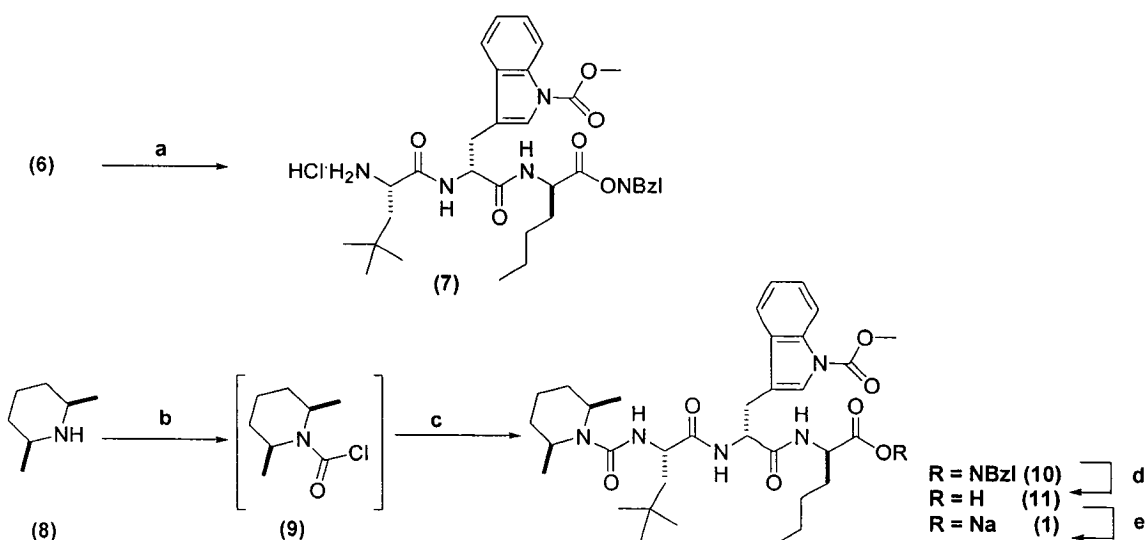
Scheme 2 illustrates our optimal procedure for the synthesis of the highly hindered trisubstituted urea based on the original work of Streith et al. [29]. The Boc protecting group was removed from **6** with HCl/ethyl ether and subsequently neutralized with excess of DIPEA in MeCN. The amine **8** was activated by using an immediately prepared solution of triphosgene in DCM under nitrogen atmosphere. Further activation of **9** was achieved with an excess of NaI in MeCN. Furthermore, we transferred the peptidic solution in the flask under nitrogen atmosphere and allowed it to stir for a 24 hours period. Two additional portions of freshly prepared **9** were needed to drive the reaction to completion. The expected material **10** was isolated and purified by silica gel chromatography with an excellent overall yield of 87%. Finally, the *p*-nitrobenzyl ester protecting group was cleaved by catalytic hydrogenation over 5% Pd/C (in 98/2 ethyl ether/ formic acid). After purification by silica gel chromatography and lyophilization, pseudopeptide **11** was obtained as a white powder in 81% yield. The conversion from the free carboxylic acid to the more water soluble sodium salt was done quantitatively with NaHCO₃ in a mixture of MeOH and water. BQ-788 which was synthesized in house was compared to a commercial sample (American Peptide (CA)) and the two samples were found to be identical in every ways (¹H NMR, MS and co-injected samples on HPLC). In

summary, we developed a multi-gram seven step synthesis of BQ-788 in 53% overall yield.



Scheme 1. Synthesis of Boc-Mle-D-Trp(COOMe)-D-Nle-ONBzl.

Reagents and conditions: (a) Cs_2CO_3 , *p*-nitrobenzyl bromide / DMF r.t. 2.5 h (100%) (b) 1) HCl / ethyl ether r.t. overnight, then evaporate 2) Boc-D-Trp-OH, IIDQ, DIPEA / DCM r.t. 24 h (88% overall) (c) Dimethyldicarbonate, DMAP cat. / MeCN r.t. overnight (95%) (d) 1) HCl / ethyl ether r.t. overnight, then evaporate 2) Boc-Mle-OH [33], IIDQ, DIPEA / DCM r.t. 24 h (91% overall).

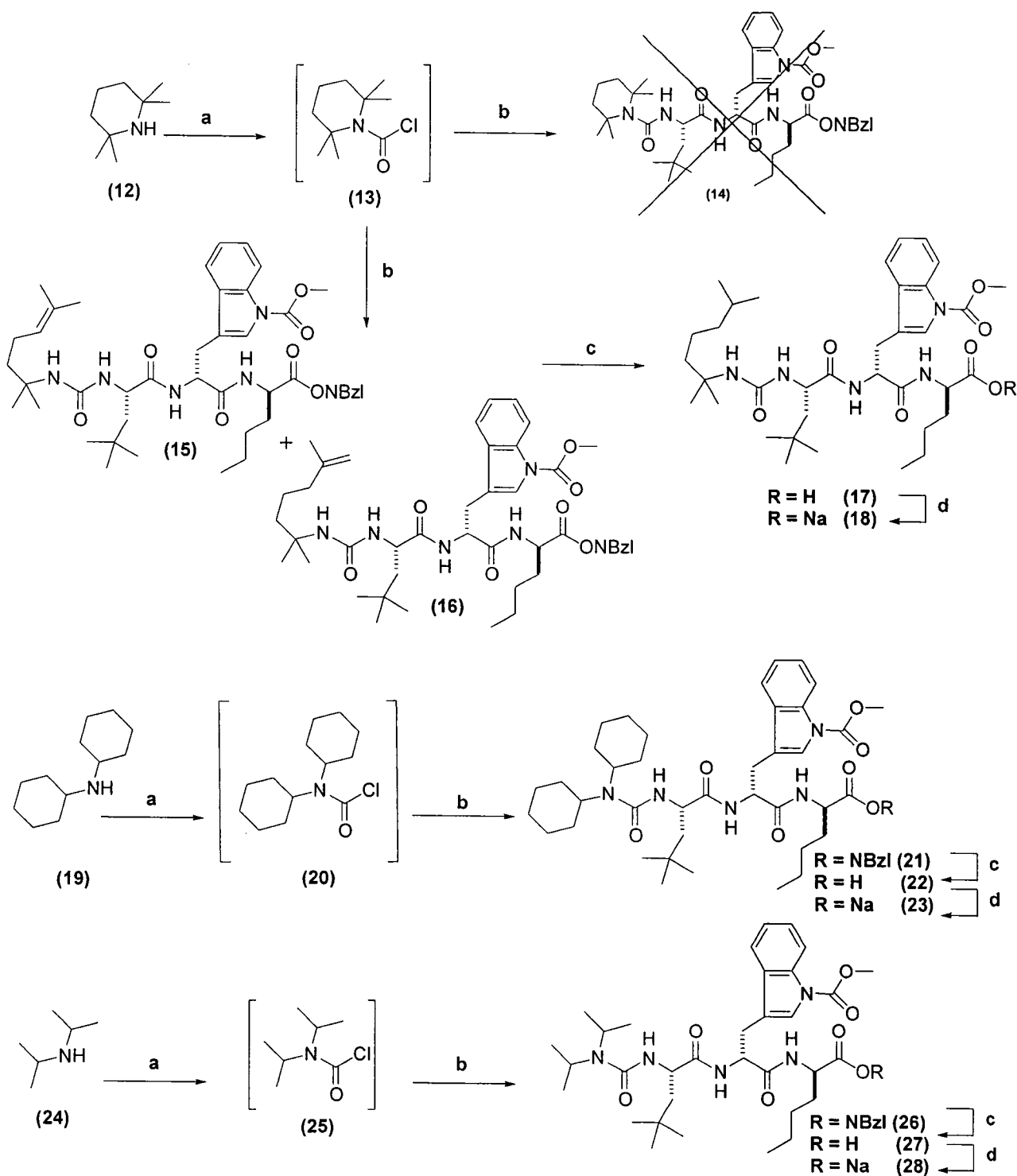


Scheme 2. Synthesis of the highly hindered urea **10** and subsequent transformation to BQ-788 **1**.

Reagents and conditions : (a) HCl / ethyl ether r.t. overnight, then evaporate (b) DIPEA, triphosgene / DCM -15°C 15 min, then r.t. 1 h, finally evaporate (c) NaI / MeCN 5 min r.t., then **7**, DIPEA / MeCN (d) H₂ (50 psi), 5% Pd/C / ethyl ether + 2% formic acid r.t. 2 h (81%) (e) NaHCO₃ / MeOH, water r.t. 1 h (100%).

3.2 Synthesis of BQ-788 analogues

As shown in scheme 3, we tested the methodology developed in section 2.2.5 to **12**, another bulky secondary amine. Interestingly, when we tried to derivatize it using that protocol, we observed the formation of undesired *N*-ethyl-*N*-isopropylamine-1-carbonyl-Leu-ONBzl coming from the reaction of triphosgene and DIPEA when the reacting mixture was quenched with H-Leu-ONBzl. Similar results were observed by Lemoucheux et al. [20] with triethylamine. We therefore replaced the common tertiary base DIPEA by an equivalent amount of the secondary amine used, in this particular case **12**. For convenience, we preferred to use one large excess of the desired carbamoyl chloride instead of frequently added two small portions. Accordingly, we used that modified protocol (section 2.2.8) in attempt to obtain compound **14** but failed. We isolated a mixture of **15** and **16**, two inseparable double bonds isomers in a yield of 71%. When this mixture was placed under an hydrogen atmosphere in the presence of 5% Pd/C, it resulted in the reduction of both double bonds as well as the hydrogenolysis of the *p*-nitrobenzyl ester. After silica gel chromatography purification and lyophilization, compound **17** was obtained in a pure form in 20% yield. We also made urea **21** and **26** following the same modified protocol mentioned above. The yields we obtained were less than with the original amine **8**, when considering the urea bond step formation (47% for **21**, 56% for **26**) as well as the *p*-nitrobenzyl ester cleavage (55% for **22** and 54% for **27**). All three compounds (**17**, **22** and **27**) were quantitatively converted to the pharmaceutically acceptable sodium salt.



Scheme 3. Synthesis of BQ-788 analogues.

Reagents and conditions : (a) triphosgene / DCM -15°C 15 min, then r.t. 1 h, finally evaporate (b) NaI / MeCN 5 min r.t., then **7**, DIPEA / MeCN (71% overall for mix of **15** and **16**, 47% overall for **21**, 56% overall for **26**) (c) H₂ (50 psi), 5% Pd/C / ethyl ether + 2% formic acid r.t. 2 h (55% for **22**, 54% for **27**, 20% for **17**) (d) NaHCO₃ / MeOH, water r.t. 1 h (100% for **18**, **23**, **28**).

3.3 Pharmacological evaluation of synthesized antagonists and BQ-788

Apparent affinities (pD_2 or pA_2 values) of endothelin receptor agonists ET-1 and IRL 1620 and synthesized antagonists **1** (BQ-788 in house), **18**, **23**, **28** as well as **1** (BQ-788 commercial) from American Peptide (CA) in the rabbit carotid and pulmonary arteries are shown in Table 1. Each value represents the mean of at least 4 experiments.

Table 1

Apparent affinities (pD_2 or pA_2 values) of endothelin receptor agonists and antagonists in the rabbit carotid and pulmonary artery

	carotid artery		pulmonary artery		
	pD_2	Max response	pD_2	Max response	(r)
Agonist		(g)		(g)	
ET-1	9.00	2.58	—	—	
IRL 1620	—	—	8.40	1.36	
Antagonist	pA_2		pA_2		
1 in house	inactive		8.24		0.97
1 commercial	inactive		8.34		0.99
18	inactive		7.08		0.52
23	inactive		5.93		0.99
28	inactive		7.02		0.99

4. DISCUSSION

We are presenting in this study a significantly more efficient strategy towards the synthesis of the ET_B antagonist BQ-788. Table 2 summarizes the essential steps towards the synthesis of BQ-788 as reported by Ishikawa et al. [15], He et al. [13] or in the present study. The overall 53% yield by our approach is twice as high as that reported by He et al. (27%) [13]. Our seven steps straightforward pathway leading to the pharmacologically acceptable sodium salt is reduced by half when compared to the fifteen steps of He et al. [13]. The synthetic strategy that we applied requires gradual coupling from the *C*-terminal to the *N*-terminal and it complies with general rules of peptide synthesis [6]. We suggest that this particular synthesis could be used as a useful pathway to afford novel analogues with promising ET_B receptor antagonistic properties.

The synthesis was performed in *t*-butoxycarbonyl/*p*-nitrobenzyl ester (Boc/ONBzl) strategy. The corresponding Boc amino acids were all commercially available except Boc-Mle-OH, which was synthesized from H-Mle-OH [33]. We selected a *p*-nitrobenzyl ester as *C*-protective group for efficient introduction and removal [28] and the coupling agent IIDQ [5, 18] was used very efficiently with this approach.

We demonstrated that the side chain derivatization on the tryptophan residue at the protected dipeptide step showed advantages over substitution performed on the single *N*-urethane and *C*-ester protected amino acid, protecting group which must be removed in the subsequent step. The approach we used instead of *C*-protective ester (i.e. the amide link amino acid of sequence) saved two steps and allowed for the safe substitution on the tryptophan residue. The reaction conditions to *N*-indole of tryptophan at the amino acid level can favor racemization [13]. We did not observe isomerization at this point of the peptide synthesis nor during the Boc cleavage of the *N*-indole substituted dipeptide. Additionally, hydrogenolysis of a benzyl ester on a side chain substituted amino acid (D-Trp) might also reduce the indole ring as was reported in the literature [13]. The *N*-methoxycarbonyl group remained intact in all further synthetic procedures performed during the entire synthesis procedure.

Formation of the urea functionality is the most difficult synthetic challenge in this molecule. The classical method for the preparation of trisubstituted urea involved the

reaction of a primary amine with phosgene to yield an isocyanate, the latter being generally condensed in situ with a secondary amine to afford the desired urea. More recently, new approaches to form isocyanate from primary amine have been exploited towards the synthesis of trisubstituted ureas (triphosgene [21], carbon dioxide [30] and Boc_2O /DMAP [19]). Interestingly, some methods have been developed to efficiently convert the conventional urethane protecting group of primary amine (Boc, Fmoc) directly to isocyanate [8, 11]. Other reagents such as 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI) [3] and 1,1'-carbonylbisbenzotriazole [17] can also activate primary amine and subsequently yield the desired urea if condensed with a suitable secondary amine.

As far as the *N*-terminal primary amine of a peptide is concerned, all of these methods can result in the formation of undesired 5-membered ring hydantoin due to an intramolecular nucleophilic attack of the adjacent NH amide on the activated carbonyl. Moreover, the ratio of urea/hydantoin is not only dependent on the group chosen but on other parameters such as the solvent, the temperature, the base used as well as the peptidic sequence itself [23, 24, 31]. To completely avoid the formation of the undesired hydantoin, we decided to derivatize the secondary amine first. This choice is uncommon for the synthesis of trisubstituted ureas but it is, obviously, used in the case of tetrasubstituted ureas and, not surprisingly, are found only in few conditions in the literature [3, 17, 25, 29]. One of those approaches [29] was favoured in the present study due to the very mild condition applied towards the synthesis of a highly hindered tetrasubstituted urea involving very similar secondary amines. We began by adapting the condition used for the synthesis of their carbamoyl chloride (*N*-2-methylpiperidine-1-carbonyl chloride and *N*-2,5-dimethylpyrrolidine-1-carbonyl chloride) and their highly hindered tetrasubstituted urea (*N*-2,5-dimethylpyrrolidine-1-carbonyl-2-methylpiperidine) [29]. Because of the toxicity of phosgene, we favored the use of the safer and more stable alternative, triphosgene [10]. The best conditions for the synthesis of a highly hindered trisubstituted urea allowed us to obtain **10** in very good yield (87%, over three steps). In the hydrogenolysis step, the use of 5% Pd/C in ethyl ether in presence of 2% formic acid left the indole ring unaffected.

The choice of the bulky secondary amines in the synthesis of BQ-788 analogues was motivated by two reasons. First, we picked **12** to demonstrate that the method could

be applicable in the case of other highly hindered amine. Unfortunately, we were unable to obtain the desired compound with this procedure (section 3.2). Nagase et al. [23] had achieved *N*-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-carbonyl peptide derivatives with the procedure reported by Hassel and Seebach [12] but no experimental details were provided in those reports. Although a procedure for the urethane formation of *N*-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-carbonyl derivative has been reported [22], the adaptation of that protocol for our purpose failed. We suggest that this unsuccessful result is caused by a rapid ring opening as previously described [4, 22]. Thus, formation of the more stable *N*-1,1,5-trimethylhex-4-enyl-1-isocyanate and *N*-1,1,5-trimethylhex-5-enyl-1-isocyanate were preferred over *N*-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-carbonyl chloride.

Secondly, from a medicinal chemistry point of view, the analogues were designed as acyclic (with respect to nitrogen) and more flexible urea derivatives than the original compound **1**. In other words, we tried to mimic the *cis*-2,6-dimethylpiperidine ring of BQ-788. The secondary amines we selected to fulfill this criteria were **19** and **24**. Application of the methodology described above worked well in the case of the two amines and we were able to obtain the desired peptide derivatives with good yields. The ureas **21**, **26** and the mixture of **15** and **16** were obtained in lower yield (46%, 54% and 71% respectively) when compared to the reference pseudopeptide **10**. However, we cannot directly compare the yield obtained for each of those compounds because we did not use exactly the same method to make the urea analogues in comparison to BQ-788 (as previously mentioned in section 3.2). Despite this fact, the method seems to be applicable to other bulky secondary amines. We suggest that **12** should be considered as a very unique situation since no ring opening occurs in similar conditions with *N*-*cis*-2,6-dimethylpiperidine-1-carbonyl chloride (present study) and *N*-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-carbonyl chloride [4].

In the last series of experiments, we have pharmacologically characterized three new analogues of BQ-788 in two well established rabbit bioassays *in vitro* [7]. These three synthetic analogues are characterized by a preserved antagonistic selectivity for the ET_B receptor, as they were all inactive, at up to 1 μ M, in the ET_A receptor rich carotid artery (Table 1). Among those new analogues, the most potent was the *N,N*-diisopropylamine analogue **28**. Notwithstanding a 1 logarithmic unit lower affinity when

compared to the original BQ-788, this particular analogue seems to be a competitive antagonist against IRL 1620 for the ET_B receptor rich pulmonary artery. In contrast, the *N*-1,1,5-trimethylhexylamine analogue **18**, as seen by the correlation coefficient derived from Schild plot analysis [2] possesses a similar affinity as **18** but is non-competitive. On the other hand, the *N,N*-dicyclohexylamine analogue **23** was at least 2 logarithmic units less potent than BQ-788, but remained as a competitive antagonist. Finally, BQ-788 synthesized in our laboratory was pharmacologically equivalent to the commercial product (American Peptide (CA)) [7, 16] as a competitive and potent antagonist.

Table 2

Overview of the key steps and strategies used in the synthesis of BQ-788

Reference	General strategy and protecting groups used	Conditions used in the key step 1 (carbamation of the indole nitrogen)	Conditions used in the key step 2 (urea formation)	Overall yield and number of steps
Ishikawa et al. [15]	<i>C</i> → <i>N</i> -terminal Boc/OtBu or OBzl	Methyl chloroformate, TBAHS, NaOH/CHCl ₃ performed on dipeptide Boc-D-Trp-D-Nle-OtBu (86%)	CDI, TEA/CHCl ₃ performed on TsOH-H-Mle-OBzl provides imidazocarbonyl-Mle-OBzl (not isolated) Followed by condensation with 8 (undisclosed yield, 2-steps-in-one)	(undisclosed yield, 8 ^a)
He et al. [13]	<i>N</i> → <i>C</i> -terminal Boc/OBzl	Dimethyldicarbonate, DMAP cat. / MeCN performed on Boc-D-Trp-OBzl (90%)	HCl/Dioxane performed on Boc-Mle-OBzl provides HCl·H-Mle-OBzl (isolated) Followed by diphosgene, charcoal / toluene provides isocyanato-Mle-OBzl (isolated) Followed by condensation with 8 / EtOAc (81%, three steps)	(23%, 15 ^b)
Brosseau et al. (present study)	<i>C</i> → <i>N</i> -terminal Boc/ONBzl	Dimethyldicarbonate, DMAP cat. / MeCN Performed on dipeptide 4 (95%)	HCl/ethyl ether performed on tripeptide 6 provides 7 (not isolated) Followed by 8 , DIPEA, triphosgene / DCM provides in situ generated 9 further activated by NaI / MeCN (not isolated) Followed by condensation with neutralized 7 / MeCN (87%, three-steps-in-one)	(53%, 7 ^b)

a) from the corresponding amino acids ester (except Boc-D-Trp-OH) until the free carboxylic acid.

b) from the corresponding Boc amino acids until the sodium salt.

5. CONCLUSION

In summary, we reported a more efficient approach towards the synthesis of BQ-788 with a new and very efficient one-pot procedure for the formation of the highly hindered trisubstituted urea. Our synthetic strategy complies with the entire rules of peptide synthesis and resulted in a 53% overall yield over seven steps. We also tested this methodology by creating some new structural analogues with using different bulky secondary amines. The three new analogues disclosed in the present study although not as potent as BQ-788, may shed further light on the structural pre-requisites for a preferential selectivity towards the ET_B receptor.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their gratitude to Drs Brigitte Guérin and Alain Cadieux for their advices in the purification and pharmacology protocols, respectively, as well as Mrs Luc Boisvert and Frederic Ménard for their critical comments regarding this manuscript. This project is financially supported by the Canadian Institutes for Health Research and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

REFERENCES

- [1] Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 1990;348:730-2.
- [2] Arunlakshana O, Schild HO. Some quantitative uses of drug antagonists. *Br J Pharmacol* 1959;14:48-58.
- [3] Batey RA, Santhakumar V, Yoshina-Ishii C, Taylor SD. An efficient new protocol for the formation of unsymmetrical tri- and tetrasubstituted ureas. *Tet Lett* 1998;39:6267-70.
- [4] Berg SS, Cowling DT. Acylation of 2,2,6,6-tetramethylpiperidine and 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine. *J Chem Soc (C)* 1971:1653-8.

- [5] Bodanszky M, Tolle JC, Gardner JD, Walker MD, Mutt V. Cholecystokinin (pancreozymin) 6. Synthesis and properties of the N^α-Acetyl-derivative of Cholecystokinin 27-33. *Int J Peptide Protein Res* 1980;16:402-11.
- [6] Bodanszky M. Principles of peptide synthesis. 2nd edition. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag;1993.
- [7] Calo G, Gratton JP, Télémaque S, D'Orléans-Juste P, Regoli D. Pharmacology of endothelins : Vascular preparations for studying ET_A and ET_B receptors. *Mol Cell Biochem* 1996;154:31-7.
- [8] Chong PY, Petillo PA. Solid phase hydantoin synthesis: An efficient and direct conversion of Fmoc-protected dipeptides to hydantoins. *Tet Lett* 1999;40:2493-6.
- [9] D'Orléans-Juste P, Labonté J, Bkaily G, Choufani S, Plante M, Honoré JC. Function of the endothelin B receptor in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Pharm Ther* 2002;95:221-38.
- [10] Eckert H, Foster B. Triphosgene, a crystalline phosgene substitute. *Angew Chem Int Ed Engl* 1987;26:894-5.
- [11] Gastaldi S, Weinreb SM, Stien D. Diiodosilane: A reagent for mild, efficient conversion of carbamates to ureas via isocyanates. *J Org Chem* 2000;65:3239-40.
- [12] Hassel T, Seebach D. Steric carbonyl protection metalation and cleavage of highly hindered ureas. *Helv Chim Acta* 1978;61(6):2337-40.
- [13] He JX, Cody WL, Doherty AM. An efficient preparation of the pseudopeptide Endothelin-B receptor selective antagonist BQ-788. *J Org Chem* 1995;60:8262-6.
- [14] Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, et al. The human endothelin family: Three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2863-7.
- [15] Ishikawa K, Fukami T, Nagase T, Mase T, Ihara M, Yano M, et al. Endothelin antagonistic substance. *Eur Patent Appl* 555 537 A2 1993.
- [16] Ishikawa K, Ihara M, Noguchi, Mase T, Mino N, Saeki T, et al. Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4892-6.

- [17] Katritzky AR, Pleyne DPM, Yang B. A general synthesis of unsymmetrical tetrasubstituted ureas. *J Org Chem* 1997;62:4155-8.
- [18] Kiso Y, Yajima H. 2-isobutoxy-1-isobutoxycarbonyl-1,2-dihydroquinoline as a coupling reagent in peptide synthesis. *J Chem Soc Chem Commun* 1972:942-3.
- [19] Knolker HJ, Braxmeier T. Synthesis of chiral oxazolidin-2-ones and imidazolidine-2-ones via DMAP-catalyzed isocyanation of amines with di-tert-butyl dicarbonate. *Tet Lett* 1998;39:9407-10.
- [20] Lemoucheux L, Rouden J, Ibazizene M, Sobrio F, Lasne MC. Debenzylation of tertiary amines using phosgene or triphosgene: An efficient and rapid procedure for the preparation of carbamoyl chlorides and unsymmetrical ureas. Application in carbon-11 chemistry. *J Org Chem* 2003;68:7289-97.
- [21] Majer P, Randad RS. A safe and efficient method for preparation of N,N'-Unsymmetrical disubstituted ureas utilizing triphosgene. *J Org Chem* 1994;59:1937-8.
- [22] Martina S, MacDonald SA. Photosensitive tetramethylpiperidine urethanes: synthesis and characterization. *J Org Chem* 1994;59:3281-3.
- [23] Nagase T, Mase T, Fukami T, Hayama T, Fujita K, Niiyama K, et al. Linear peptide ETA antagonists: rational design and practical derivatization of N-terminal amino- and imino-carbomylated tripeptide derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 1995;5:1395-400.
- [24] Nowick JS, Holmes DL, Noronha G, Smith EM, Nguyen TM, Huang SL. Synthesis of peptide isocyanates and isothiocyanates. *J Org Chem* 1996;61:3929-34.
- [25] Nudelman NS, Lewkowicz ES, Perez DG. One-pot synthesis of N,N,N',N'-tetrasubstituted ureas and oxomalonamides by oxidative carbonylation of lithium amides at atmospheric pressure. *Synthesis* 1990:917-20.
- [26] Okada M, Nishikibe M. BQ-788, a selective endothelin ETB receptor antagonist. *Cardiovasc Drug Rev* 2002;20(1):53-66.
- [27] Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, et al. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 1990;348:732-5.

- [28] Schwarz H, Arakawa K. The use of p-nitrobenzyl esters in peptide synthesis. *J Am Chem Soc* 1959;5691-5.
- [29] Streith J, Boiron A, Paillaud J-L, Rodrigez-Perez E-M, Strehler C, Tschamber T, et al. 4. Chelate-controlled asymmetric synthesis of 2-substituted 2,3-dihydropyridin-4(1H)-ones: Synthesis of D- and L-aminodeoxyaltrose derivatives. *Helv Chim Acta* 1995;78:61-72.
- [30] Waldman TE, McGhee WD. Isocyanates from primary amines and carbon dioxide: Dehydration of carbamate anions. *J Chem Soc Chem Commun* 1994:957-8.
- [31] Xiao X, Ngu K, Chao C, Patel DV. Selective solid phase synthesis of ureas and hydantoins from common phenyl carbamate intermediates. *J Org Chem* 1997;62:6968-73.
- [32] Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988;332:411-5.
- [33] Preparation of Boc-Mle-OH has been done with modified procedure (Boc₂O) from Sasaki Y, Ambo A, Midorikawa K, Suzuki K. Solid-phase synthesis and opioid activities of [D-Ala²] Deltorphin II analogs. *Chem Pharm Bull* 1993;41(8):1391-4. Starting with H-Mle-OH (0.998 g; 6.87 mmol) to yield Boc-Mle-OH as a white solid (1.633 g; 97%): TLC R_f = 0.22 (A); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.98 (s, 9H), 1.44 (s, 9H), 1.40-1.55 (m, 1H), 1.83 (d, 1H, J = 14,3 Hz), 4.33 (dd, 1H, J₁ = 8.7 Hz, J₂ = 15.1 Hz), 4.81 (d, 1H, J = 8,6 Hz); CI MS m/z 263 (M+NH₄)⁺; HR MS calcd for C₁₂H₂₄NO₄, 246.1705 (M+H)⁺; found, 246.1712 (M+H)⁺; [α]_D = - 15. 4°, (c = 1.419 in MeOH).

Résultats supplémentaires

Développement d'antagonistes peptidiques fluorescents et non-fluorescents sélectifs pour les récepteurs ET_A et ET_B de l'endothéline.

1. Synthèse du BQ-123

Nous avons basé notre stratégie de synthèse du BQ-123 et analogues sur des résultats antérieurs provenant de notre groupe de recherche (Neugebauer *et al.*, 1996). Il s'agit d'une stratégie en Boc, utilisant une résine de type Merrifield dont la chaîne latérale du premier acide aminé est déjà lié sous forme d'ester. Les 3 acides aminés suivants dont l'amine est protégée sous forme de tert-butoxycarbonyl (Boc), sont tour à tour couplés en présence de TBTU et de diisopropyléthylamine (DIPEA), une base aminé tertiaire tandis que le groupement Boc est subséquemment clivé en présence de 40% de TFA dans le DCM. Le dernier acide aminé (Fmoc-Pro-OH) est ensuite introduit selon la même méthode de couplage peptidique précédemment décrite. Les deux groupements protecteurs résultants, soit l'ester 9-fluorénylméthylque (OFm) et le 9-fluorénylméthoxycarbonyl (Fmoc) sont ensuite relâchés en traitant la résine avec 50% de pipéridine dans le DMF. Puis, un excès d'agent de couplage (PyBOP) et HOBt (4 éq chacun dans le DMF) sont ajoutés et le milieu est finalement basifiée (DIPEA). Le test de Kaiser négatif pris une nuit d'agitation après, suggère la complétion de la réaction. La résine est alors traitée au HF_(l) et le peptide est extrait avec un mélange eau/MeOH (50/50). Une fois la solution concentrée *in vacuo* et lyophilisée, un produit brut sous

forme de poudre blanc crème est obtenu. Celui-ci est ensuite dissout dans un minimum de MeCN dans l'eau et purifié sur colonne C18 pour donner une poudre blanche correspondant au BQ-123 dans un rendement global de 9%.

2. Synthèse des analogues du BQ-123

La synthèse des analogues du BQ-123 procède selon les mêmes étapes précédemment décrite pour la synthèse du BQ-123 en substituant Fmoc-Pro-OH pour Fmoc-Apro(Boc)-OH. Une fois la cyclisation effectuée, le Boc est déprotégé pour donner l'amine libre (schéma 11). Lorsque la résine est soumise aux conditions de clivage de la résine et le peptide extrait et purifié selon la méthode décrite plus haut, ceci conduit au *cyclo*(Apro-D-Val-Leu-D-Trp-D-Asp) dans un rendement de 9%. Il est également possible de poursuivre la synthèse au-delà de la déprotection finale du Boc. En effet, un espaceur comme Boc- ϵ -Acp-OH peut être couplé et son groupement protecteur Boc déprotégé par la suite (schéma 12). Ce processus a généré le *cyclo*(Apro(H- ϵ -Acp)-D-Val-Leu-D-Trp-D-Asp) dans un rendement de 10%. Ces deux analogues ont été conjugués au FITC dans un mélange eau/MeCN en présence de pyridine et DIPEA en absence de lumière. Dans les deux cas, l'analogue fluorescent a été obtenu sous forme d'une poudre orange dans un rendement de 87%.

Afin de simplifier et faciliter la compréhension, nous avons inventé une nouvelle nomenclature pour nos analogues. L'abréviation BQ est remplacée par BDN pour Brosseau, D'Orléans-Juste et Neugebauer suivi d'un tiret. Puis, les chiffres 123 sont conservés puisque nos analogues sont dérivés du BQ-123. Ensuite, la lettre N est ajoutée

car les analogues possèdent une amine de plus comparé à la molécule de référence. En ce sens, les lettres **L** et/ou **F** sont ajoutées si l'analogue en question possède un « linker » et/ou un fluorophore. Ainsi, le *cyclo*(Apro(H- ϵ -Acp)-D-Val-Leu-D-Trp-D-Asp) devient BDN-123NL. Cette nomenclature sera également utilisée pour les analogues du BQ-788 et suit la même logique.

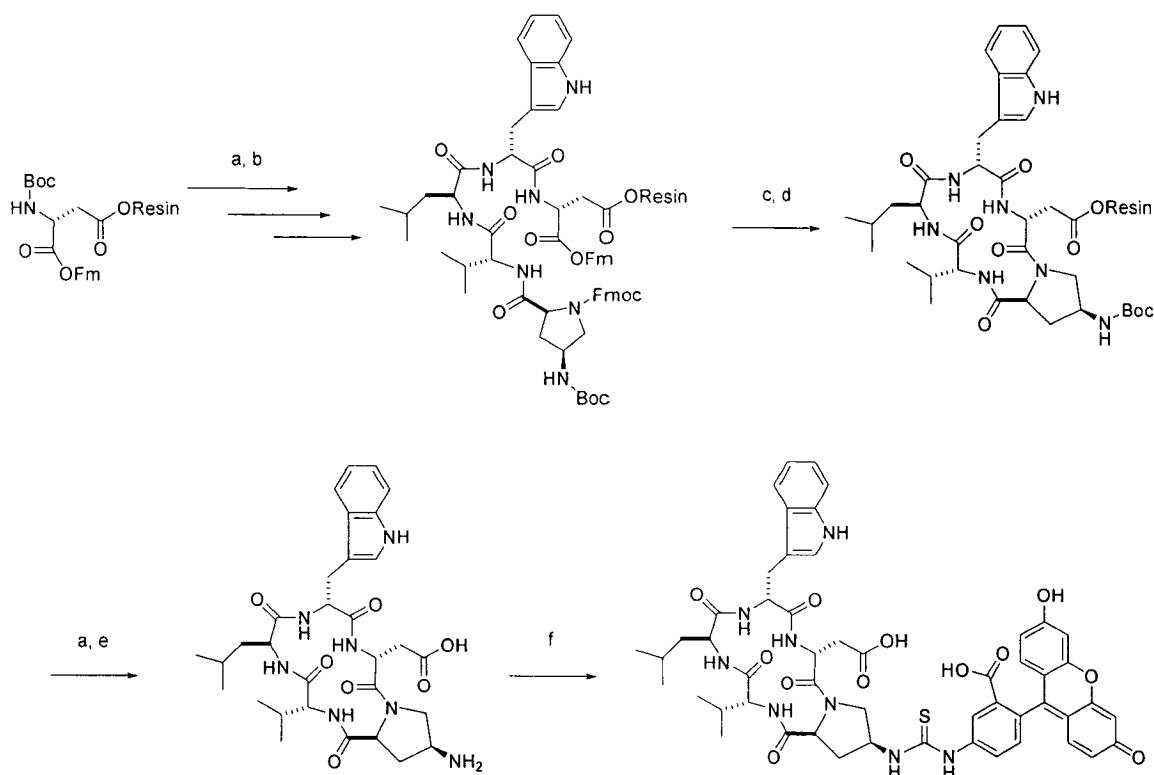


Schéma 11. Synthèse de BDN-123N et BDN-123NF, analogues du BQ-123.

Réactifs et conditions : (a) TFA/DCM (40/60) t.p. 30 min (b) Boc-Xaa-OH, TBTU, DIPEA/DMF t.p. 60 min (c) pipéridine/DMF (50/50) r.t. 60 min (d) PyBOP, HOBT, DIPEA/DMF t.p. nuit (e) HF_(l) 0°C 30 min (f) FITC, DIPEA/ pyridine, MeCN, eau.

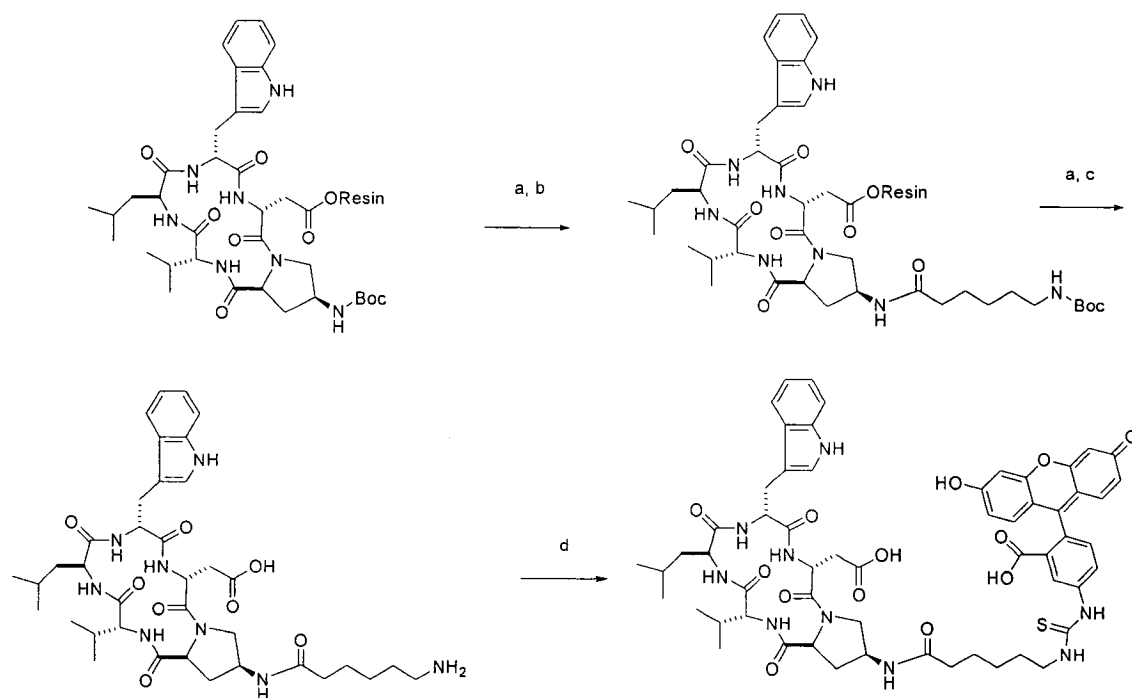


Schéma 12. Synthèse de BDN-123NL et BDN-123NLF, analogues du BQ-123.

Réactifs et conditions : (a) TFA/DCM (40/60) t.p. 30 min (b) Boc- ϵ -Acp-OH, TBTU, DIPEA/DMF t.p. 60 min (c) HF_(l) 0°C 30 min (d) FITC, DIPEA/ pyridine, MeCN, eau.

3. Synthèse des analogues du BQ-788

Suivant la procédure visant à donner des urées encombrés, nous avons substitué la 2,6-*cis*-diméthylpipéridine par la 4-Boc-2,6-*cis*-diméthylpipérazine afin de produire le 4-Boc-2,6-*cis*-diméthylpipérazine-1-carbonyl-Mle-D-Trp(1-COOMe)-D-Nle-ONBzl dans un rendement de 52% (schéma 13). Par la suite, ce composé fut subséquemment soumis en condition acide avec HCl/éther, puis dans le DCM en présence de Pd/C 5% sous 50 psi de pression d'hydrogène afin de cliver les groupements protecteurs en *N* et *C*-terminal respectivement. Ce procédé nous a permis d'obtenir le BDN-788N avec un rendement global de 49%. Ce dernier a ensuite été conjugué au FITC dans les mêmes conditions que développées pour les cyclopentapeptides, résultant en le BDN-788NF sous forme de poudre jaune à 82% de rendement.

Le BDN-788NL et BDN-788NLF ont été synthétisés à partir d'un même précurseur, soit le 4-Aua-2,6-*cis*-diméthylpipérazine-1-carbonyl-Mle-D-Trp(1-COOMe)-D-Nle-ONBzl. Celui-ci a été généré en déprotégeant subséquemment l'amine de 4-Boc-2,6-*cis*-diméthylpipérazine-1-carbonyl-Mle-D-Trp(1-COOMe)-D-Nle-ONBzl, puis en y couplant le Boc-Aua-OH à l'aide de l'agent de couplage IIDQ dans un rendement global de 38% (schéma 14). Par la suite, ce composé fut subséquemment soumis en condition acide avec HCl/éther, puis dans le DCM en présence de Pd/C 5% sous 50 psi de pression d'hydrogène afin de cliver les groupements protecteurs en *N* et *C*-terminal respectivement. Ce procédé nous a permis d'obtenir le BDN-788NL dans un rendement global de 77%. Ce dernier a ensuite été conjugué au FITC, résultant en le BDN-788NF sous forme de poudre jaune à 31% de rendement.

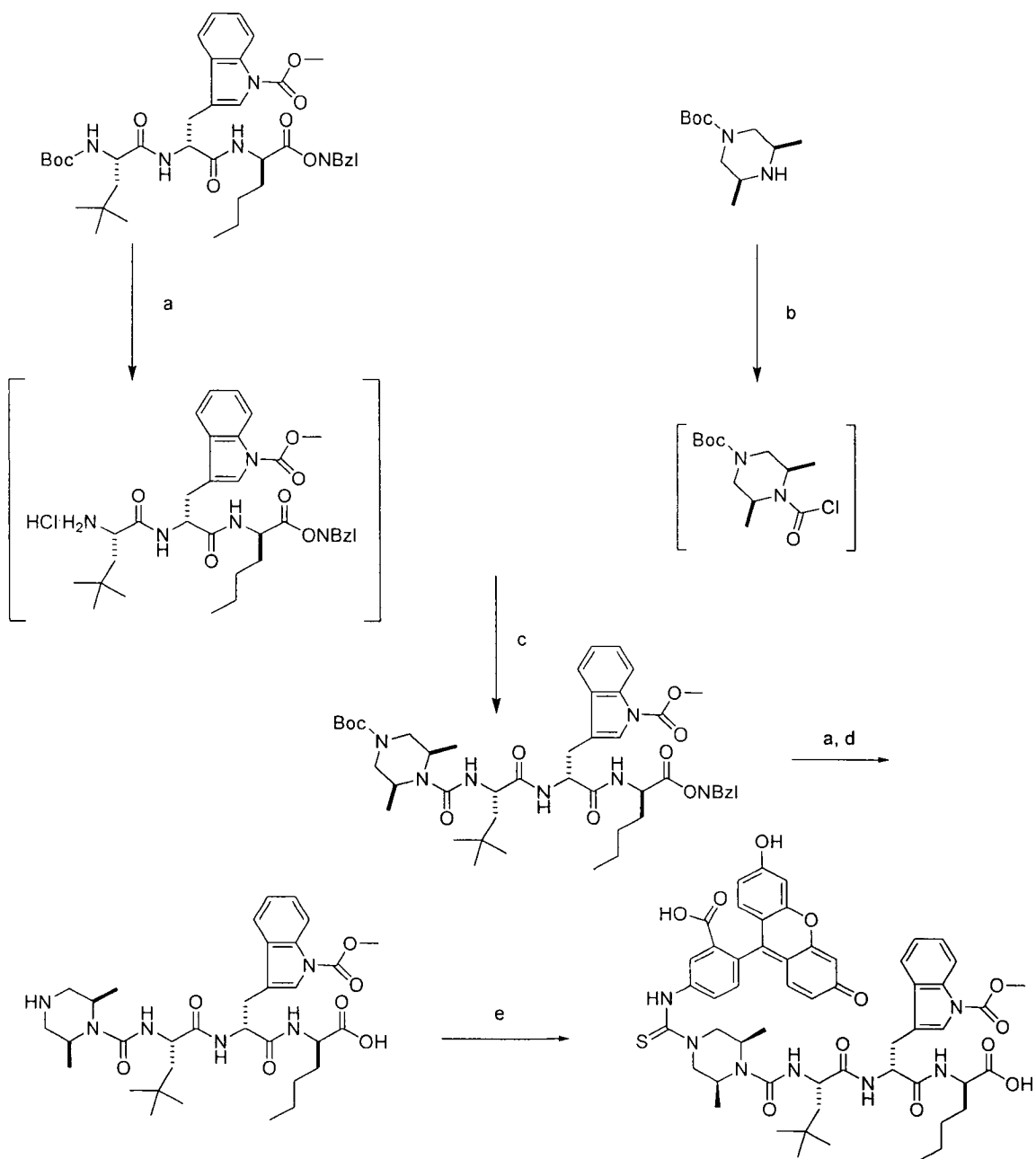


Schéma 13. Synthèse de BDN-788N et BDN-788NF, analogues du BQ-788

Réactifs et conditions : (a) HCl/Ether 2N t.p. nuit, puis évaporer, finalement DIPEA/MeCN et transférer (b) DIPEA, triphosgène/DCM -15°C 15 min, puis t.p. 1 h, finalement évaporer (c) DIPEA, NaI/MeCN (d) H_2 (50 psi) 5% Pd/C /DCM t.p. 2 h (e) FITC, DIPEA/pyridine, MeCN, eau.

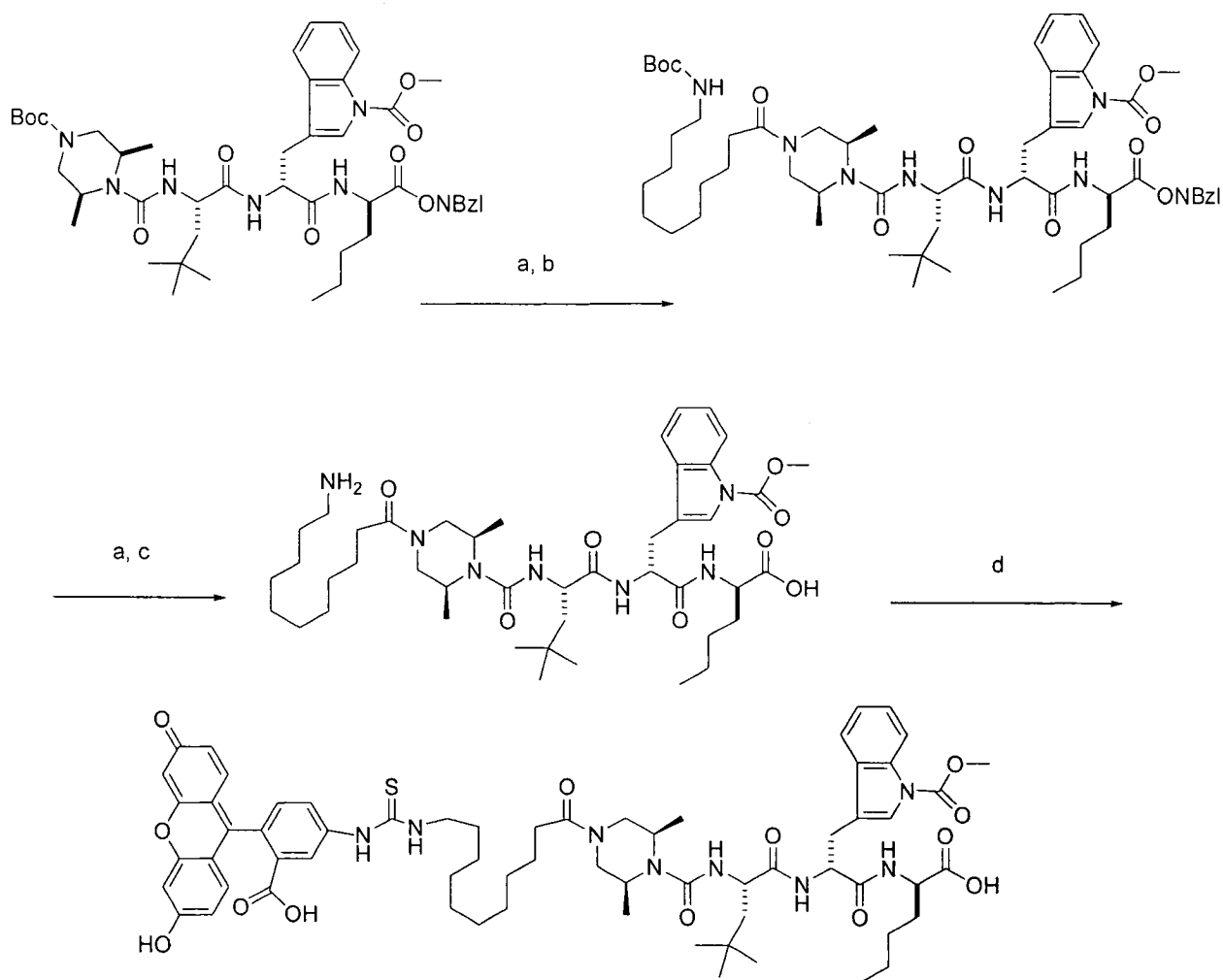


Schéma 14. Synthèse de BDN-788NL et BDN-788NLF, analogues du BQ-788

Réactifs et conditions : (a) HCl/Ether 2N t.p. nuit (b) Boc-Aua-OH, IIDQ, DIPEA/DCM

t.p. nuit (c) H₂ (50 psi) 5% Pd/C/DCM t.p. 2 h (d) FITC, DIPEA/pyridine, MeCN, eau.

4. Caractérisation pharmacodynamique des analogues du BQ-123 et du BQ-788

Nous avons évalué l'affinité apparente des divers analogues synthétisés et les avons comparés aux antagonistes de référence, soit le BQ-123 et le BQ-788. Le tableau V indique les valeurs de pD_2 (agonistes) et pA_2 (antagonistes) obtenues dans deux bioessais fonctionnels de type monoréceptorielle; soit l'artère carotide de lapin (ET_A); et l'artère pulmonaire de lapin (ET_B). Le pD_2 est défini comme étant $-\log[\text{agoniste}]$ qui produit 50% de l'effet maximal alors que le pA_2 est classiquement défini comme étant $-\log[\text{antagoniste}]$ qui nécessite de doubler [agoniste] pour obtenir le même effet.

L'ET-1 induit une contraction maximale de l'A.C.L. équivalente à 2.62 g de tension et possède un pD_2 de 8.98. En revanche, l'IRL 1620 induit une contraction maximale de l'A.P.L. équivalente à 1.04 g de tension et possède un pD_2 de 8.65. Les antagonistes qui déplacent la courbe dose-réponse à l'ET-1 sur l'A.C.L. sont le BQ-123 ($pA_2 = 6.77$, $r = 0.99$), le BDN-123NF ($pA_2 = 6.42$, $r = 0.99$), et le BDN-123NLF ($pA_2 = 7.10$, $r = 0.98$). Les antagonistes qui déplacent la courbe dose-réponse à l'IRL 1620 sur l'A.P.L. sont le BQ-788 ($pA_2 = 8.24$, $r = 0.97$), le BDN-788N ($pA_2 = 7.07$, $r = 0.99$), et le BDN-788NF ($pA_2 = 6.52$, $r = 0.98$). La valeur r représente le coefficient de linéarité dérivé de l'analyse de Schild et chacune des valeurs représente la moyenne d'au moins 4 expériences.

Tableau V. Affinité apparente d'agoniste (pD_2) et d'antagoniste (pA_2) des récepteurs de l'endothéline dans les artères carotide et pulmonaire de lapin.

	Artère carotide		Artère pulmonaire		(r)
	pD_2	Réponse max (g)	pD_2	Réponse max (g)	
Agoniste					
ET-1	8.98	2.62	—	—	
IRL 1620	—	—	8.65	1.04	
Antagoniste		pA_2		pA_2	
BQ-123		6.77		n.d.	0.99
BDN-123N		inactif		n.d.	—
BDN-123NL		inactif		n.d.	—
BDN-123NF		6.42		inactif	0.99
BDN-123NLF		7.10		inactif	0.98
BQ-788*		inactif		8.24	0.97
BDN-788N		inactif		7.07	0.99
BDN-788NL		n.d.		inactif	—
BDN-788NF		inactif		6.52	0.98
BDN-788-NLF		n.d.		inactif	—

* valeurs tirée de Brosseau et collaborateurs (Brosseau *et al.*, 2005).

5. Caractérisation pharmacologique *in vivo* du BQ-123, du BQ-788 et de leurs analogues fluorescents.

La seule administration de l'ET-1 (1.0 nmol/kg) chez la souris C57BL/6 provoque une élévation significative de la PAM chez la souris (23.4 ± 2.3 mm Hg ; n= 6) (Figure 3 ; illustrée en terme de la variation (Δ) de PAM). Un pré-traitement de 5 min de l'animal au BQ-123 (1.0 mg/kg) atténue significativement l'effet presseur de l'ET-1 (5.5 ± 0.8 mm Hg ; n= 4). La seule administration de l'Ang II (0.05 nmol/kg) provoque une élévation significative de la PAM chez la souris (15.0 ± 7.3 mm Hg ; n= 6) (Figure 4 ; illustrée en terme de la variation (Δ) de PAM). Un pré-traitement de 5 min de l'animal au BDN-123NF (1.0 mg/kg) ou au BDN-123NLF (1.0 mg/kg) n'a pas d'effet significatif sur l'effet presseur de l'Ang II (15.3 ± 1.9 mm Hg ; n= 4, 20.4 ± 6.1 mm Hg ; n= 5, respectivement).

L'administration de l'IRL 1620 (1.0 nmol/kg) chez la souris CD-1 provoque une élévation significative de la PAM chez la souris (13.2 ± 4.0 mm Hg ; n= 2) (Figure 5 ; illustrée en terme de la variation (Δ) de PAM). Un pré-traitement de 5 min de l'animal au BQ-788 (1.0 mg/kg) abolit l'effet presseur de l'IRL 1620 (-2.0 ± 0.4 mm Hg ; n= 3). La seule administration de l'Ang II (0.05 nmol/kg) chez cette même souris provoque une élévation significative de la PAM chez la souris (11.6 ± 6.6 mm Hg ; n= 3) (Figure 6 ; illustrée en terme de la variation (Δ) de PAM). Un pré-traitement de 5 min de l'animal au BDN-788NF (1.0 mg/kg) n'a pas d'effet significatif sur l'effet presseur de l'Ang II (11.7 ± 1.2 mm Hg ; n= 3).

Effet de l'ET-1 (1.0 nmol/kg i.v.) en absence ou en présence de BQ-123 (1.0 mg/kg i.v.) sur la variation maximale de PAM chez les souris C57BL/6

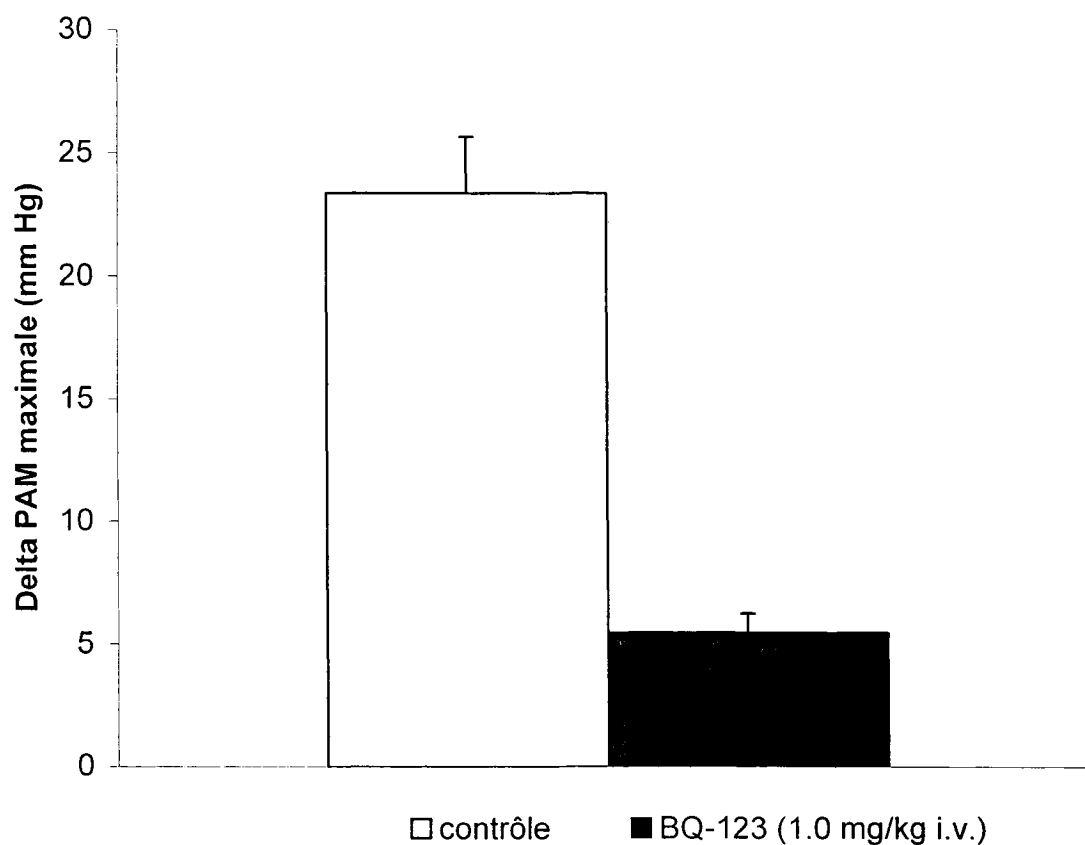


Figure 3. Effet du BQ-123 sur l'augmentation de la pression artérielle moyenne induite par l'ET-1 chez les souris C57BL/6. Les colonnes représentent la moyenne $\pm$ l'erreur standard d'au moins quatre expériences.

Effet de l'Ang II (0.05 nmol/kg i.v.) en absence ou en présence d'antagoniste ETA (1.0 mg/kg i.v.) sur la variation maximale de PAM chez les souris C57BL/6

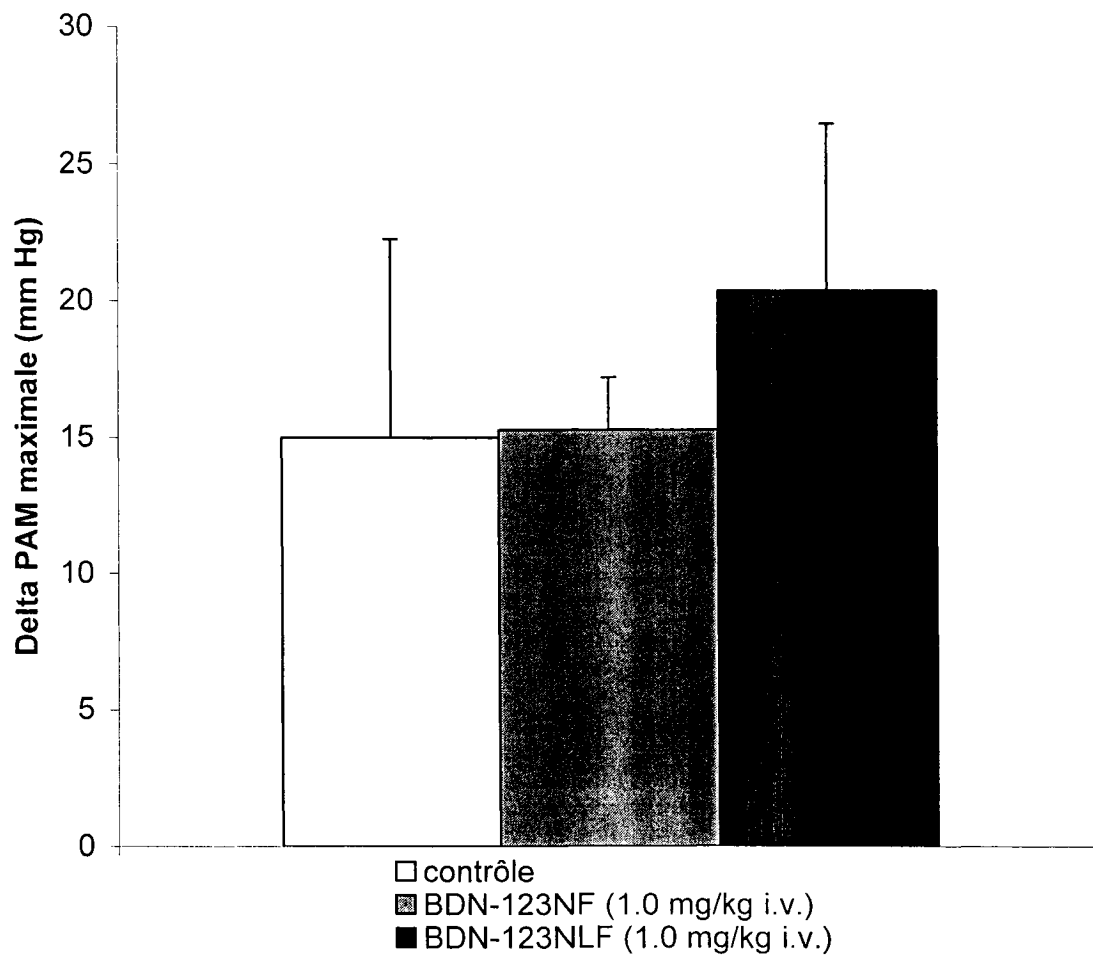


Figure 4. Effet de BDN-123NF et BDN-123NLF sur l'augmentation de la pression artérielle moyenne induite par l'Ang II chez les souris C57BL/6. Les colonnes représentent la moyenne $\pm$ l'erreur standard d'au moins quatre expériences.

Effet de l'IRL 1620 (1.0 nmol/kg i.v.) en absence ou en présence de BQ-788 sur la variation maximale de PAM chez les souris CD-1

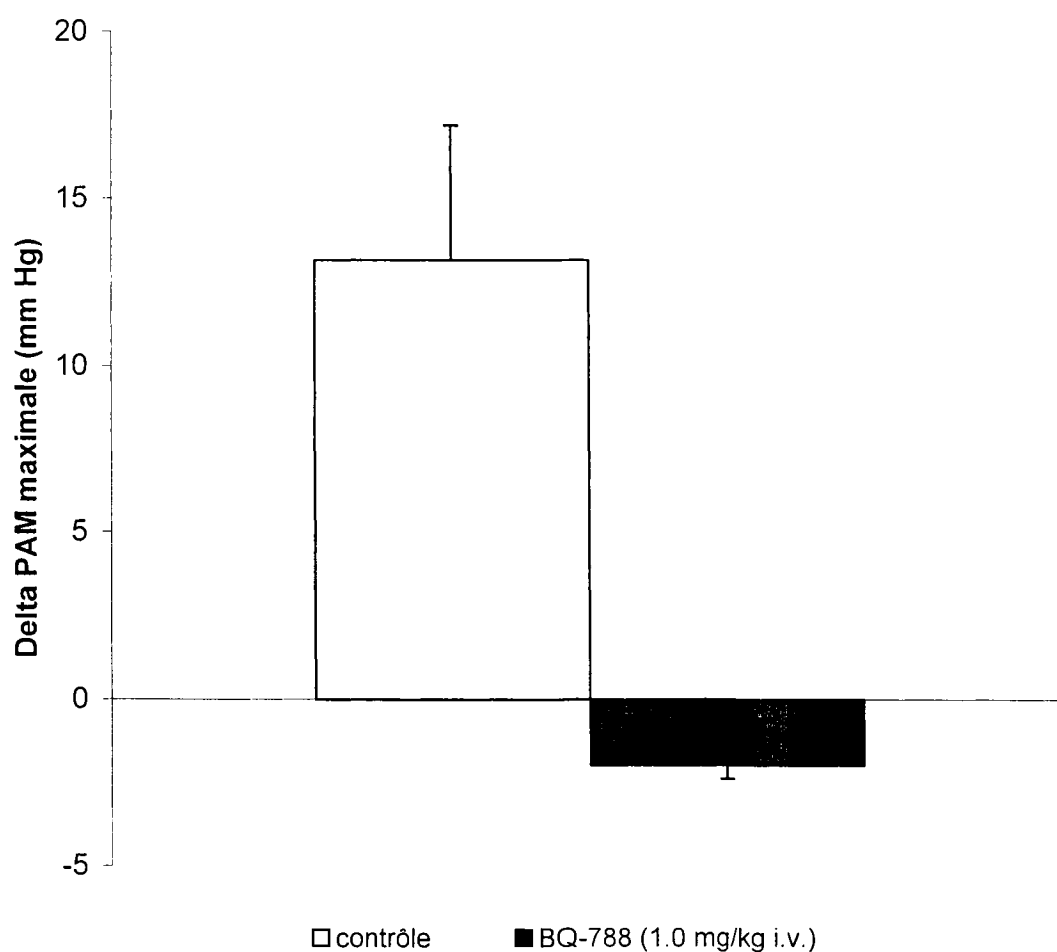


Figure 5. Effets du BQ-788 sur l'augmentation de la pression artérielle moyenne induite par l'IRL 1620 chez les souris CD-1. Les colonnes représentent la moyenne $\pm$ l'erreur standard d'au moins deux expériences.

Effet de l'Ang II (0.05 nmol/kg i.v.) en absence ou en présence de BDN-788NF (1.0 mg/kg i.v.) sur la variation maximale de PAM chez les souris CD-1

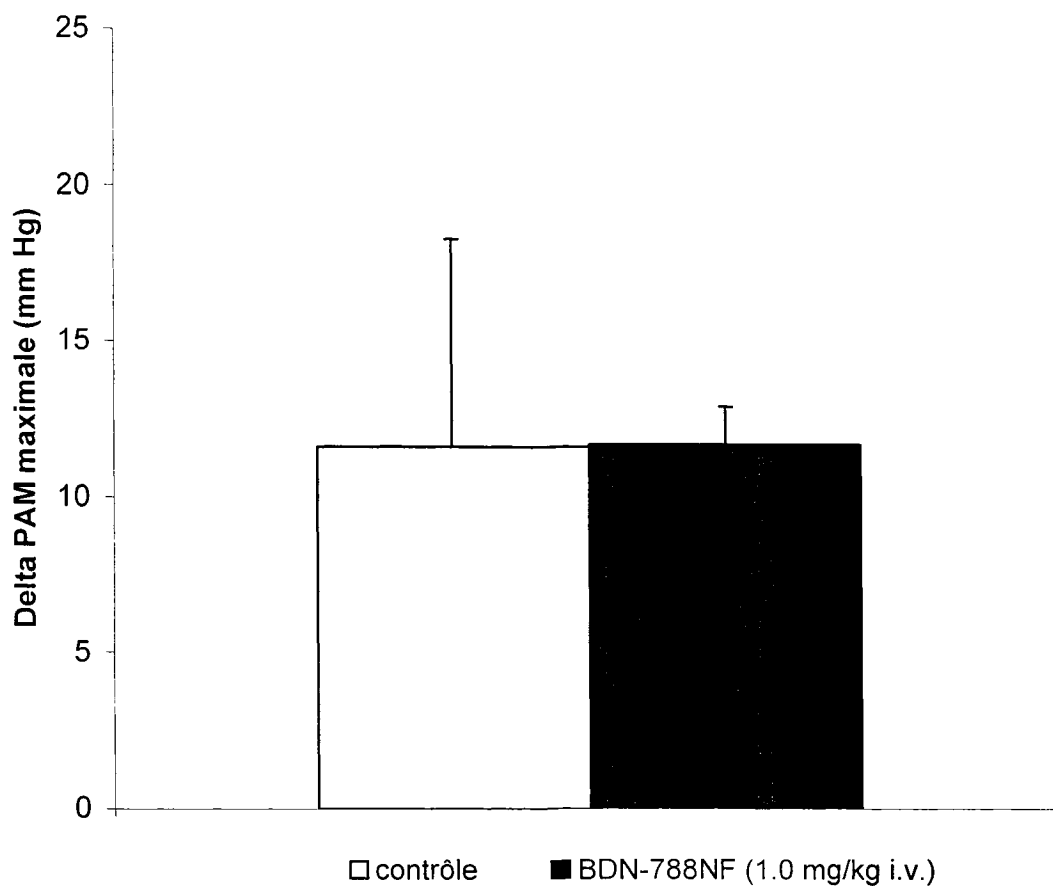


Figure 6. Effets du BDN-788NF sur l'augmentation de la pression artérielle moyenne induite par l'Ang II chez les souris CD-1. Les colonnes représentent la moyenne $\pm$ l'erreur standard d'au moins trois expériences.

DISCUSSION

Le BQ-123 et le BQ-788 sont des antagonistes puissants et sélectifs des récepteurs ET_A et ET_B de l'endothéline, respectivement. Dans un premier temps, nous avons développé de nouvelles stratégies de synthèse nous permettant d'accéder à ces deux types de peptides. Nous avons comparé les données physico-chimiques (RMN ¹H, SM, CCM et HPLC) et pharmacologiques *in vitro* et *in vivo* du BQ-123 et du BQ-788 suite à leur synthèse issus de nos protocoles avec les données originales. Dans le cadre de ce premier objectif, plusieurs analogues du BQ-788 ont également été développés et caractérisés à l'aide d'essais biologiques *in vitro* afin de valider la nouvelle approche méthodologique.

Dans un deuxième temps, nous avons développé des antagonistes sélectifs fluorescents pour le récepteur ET_A et ET_B en dérivant le BQ-123 et le BQ-788, directement avec le FITC ou indirectement à l'aide d'un espaceur. Les composés d'intérêts ont été testés pour leur effet puissant, compétitif, sélectif et spécifique soit *in vitro* et/ou *in vivo* dans des bioessais précédemment développés dans notre laboratoire. L'objectif à long terme sera de les utiliser dans l'identification des récepteurs de l'endothéline *in situ*.

1. Nouvelle stratégie de synthèse du BQ-123

Le BQ-123 est un cyclopentapeptide dont la synthèse nous est familière et accessible (Neugebauer *et al.*, 1996). Nous l'avons adapté et amélioré afin de produire de nouveaux analogues fluorescents. La stratégie d'origine consiste à coupler un à un tous

les dérivés Boc (Boc-Xaa-OH) à une résine dont le résidu Boc-D-Asp-OFm y est déjà inséré. Comme l'indique le schéma 7 de l'introduction, cela implique une déprotection finale en deux étapes vu l'orthogonalité des groupements protecteurs à cliver (Boc: milieu acide, OFm: milieu basique). Dans le cas des analogues du BQ-123, nous voulions poursuivre la synthèse sur la chaîne latérale de Apro¹ ce qui requiert un troisième groupement protecteur orthogonal (comme Z ou OBzl). Nous avons donc modifié cette stratégie en substituant le groupement protecteur Boc du dernier acide aminé (Boc-Pro-OH) pour Fmoc (Fmoc-Pro-OH). Ce changement permet maintenant une déprotection finale en une seule étape (Fmoc et OFm : milieu basique). De plus, la synthèse peut être poursuivie en Boc après la cyclisation, ce qui n'était pas le cas auparavant. Notre méthodologie nous a permis d'obtenir le BQ-123 avec un rendement de 9%, ce qui est fort acceptable et comparable à la littérature (variant entre 2 et 26%) (Fukami *et al.*, 1995, Krystek *et al.*, 1992, Reily *et al.*, 1992, Sowemimo *et al.*, 1994, Bradley EK *et al.* 1994). Les spectres RMN ¹H, SM MALDI ainsi que les analyses par HPLC et CCM confirment l'intégrité de la structure du BQ-123 issue de nos laboratoires.

2. Nouvelle stratégie de synthèse du BQ-788

Les synthèses du BQ-788 rapportées dans la littérature sont ardues et peu efficaces. Dans le présent ouvrage, nous proposons une stratégie de synthèse plus rapide et à meilleur rendement. Tel que mentionné dans le tableau 2 de l'article 1, notre rendement est environ de deux fois supérieur à celui rapporté par He *et al.* (He *et al.*, 1995). Notre stratégie est aussi en accord avec les règles de synthèse peptidique, qui suggère

l'élongation du peptide du C-terminal au N-terminal afin de minimiser la racémisation. Nous avons opté pour l'ester de *p*-nitrobenzyl pour sa facilité à être couplé et à être hydrogénolysé (Schwarz & Arakawa, 1959), et l'agent de couplage IIDQ pour sa simplicité d'utilisation et sa faible tendance à racémiser (Bodanszky *et al.*, 1980, Kiso & Yajima, 1972). Nous avons démontré lors de cette synthèse qu'il est plus efficace d'effectuer la méthoxycarbonylation directement sur le dipeptide plutôt que de protéger/déprotéger le D-Trp. De plus, nous évitons les réactions secondaires possible comme l'épimérisation du carbone en α du carbonyle et la réduction du lien C2-C3 de l'indole (He *et al.*, 1995).

La formation de l'urée est l'étape la plus difficile de la synthèse du BQ-788. Les méthodes classiques pour la préparation des urées trisubstituées impliquent la réaction d'une amine primaire avec le phosgène pour former un isocyanate. Celui-ci est alors généralement couplé *in situ* à une amine secondaire pour obtenir l'urée désirée. Malheureusement, ceci n'est pas applicable à l'amine primaire du N-terminal d'un peptide puisqu'une fois convertie en isocyanate, celui-ci subit rapidement l'attaque nucléophile du NH amide voisin, menant à la formation d'un hétérocyclique à 5 membres nommé hydantoin. De plus, le ratio urée/hydantoin n'est pas seulement dépendant de la force d'activation du carbonyl mais également du solvant, de la base, de la température et même de la séquence peptidique en elle-même (Nagase *et al.*, 1995, Nowick *et al.*, 1996, Xiao *et al.*, 1997).

Pour éviter ce mécanisme compétitif, nous avons procédé à l'activation de l'amine secondaire d'abord. Cette alternative reste peu utilisée pour la formation d'urée trisubstituée mais demeure la seule solution dans le cas des urées tétrasubstituées bien

que peu de méthodes soient disponibles pour leur synthèses (Batey *et al.*, 1998, Katritzky *et al.*, 1997, Nudelman *et al.*, 1990, Streith *et al.*, 1995). Malgré cela, une de celle-ci (Streith *et al.*, 1995) nous a semblé particulièrement attrayante, considérant les conditions douces employées, et la ressemblance des substrats utilisés. Nous avons adapté les conditions réactionnelles rapportées par Streith *et al.* (1995) (triphosgène, MeCN, éq NaI, DIPEA) afin de nous permettre de synthétiser notre urée avec un excellent rendement de 87% à partir du tripeptide protégé. Ceci nous a permis d'obtenir le BQ-788 avec un rendement global de 53%, ce qui est deux fois plus élevé que la synthèse publiée par He et collaborateurs (He *et al.*, 1995). De plus, cette stratégie a permis de modifier plus aisément le groupement en *N*-terminal, et donc de faire de la structure-activité sur celui-ci. Les spectres RMN ^1H , ^{13}C , SM MALDI ainsi que les analyses par HPLC, CCM et la valeur de rotation optique confirment l'intégrité de la structure du BQ-788 issue de nos laboratoires.

3. Design et synthèse des analogues non-fluorescents et fluorescents du BQ-123 et du BQ-788.

Contrairement à la radioactivité émise par les ligands radioactifs, la fluorescence est relativement sécuritaire. Le faible coût de la plupart des sondes fluorescentes et la possibilité de faire des expériences multi-sondes sont des caractéristiques attrayantes. Les dérivés réactifs de la fluoresceine comme l'isothiocyanate de fluoresceine (FITC) sont couramment utilisés pour conjuguer des molécules bioactives (Balboni *et al.*, 2004, Fulop *et al.*, 2001).

La relation structure-activité bien documentée du BQ-123 (Ishikawa *et al.*, 1992, Fukami *et al.*, 1996) nous a permis de déterminer avec confiance le point de conjugaison entre la sonde fluorescente et l'antagoniste. En effet, il est possible d'entrevoir une rétention d'activité biologique du BQ-123 lors d'une substitution de Pro¹ pour un analogue de Pro¹ possédant une fonctionnalité susceptible d'être conjuguée par un fluorophore. La substitution de Pro¹ pour Hyp¹ ou Hyp¹(Xaa) n'affecte que très peu l'affinité pour le récepteur ET_A (Fukami *et al.*, 1996). Dans ce dernier cas, la dérivatisation de Hyp¹ s'est effectuée via l'estérification d'un acide aminé choisi (Xaa). Comme un ester est une fonctionnalité facilement hydrolysable comparativement à un amide, nous avons opté pour une aminoproline (plutôt qu'une hydroxyproline) dont les groupements protecteurs orthogonaux peuvent s'intégrer dans notre stratégie de synthèse en phase solide. L'acide (2S,4S)-Boc-4-amino-1-Fmoc-pyrrolidine-2-carboxylique (Fmoc-Apro(Boc)-OH) est une combinaison commercialement disponible qui remplit ces critères.

En substituant Pro¹ pour Apro¹ lors de la synthèse, nous avons obtenu le BDN-123N avec un rendement équivalent au BQ-123, soit 9%. Ceci suggère que le groupement additionnel (NHBoc) a peu d'effet sur l'efficacité du couplage entre Fmoc-Apro(Boc)-OH et le *N*-terminal situé sur la résine; ainsi que sur le rendement de la cyclisation. Ceci peut signifier que la conformation globale du peptide est maintenue malgré la substitution, nous permettant donc d'entrevoir un faible changement au niveau de l'affinité pour ET_A. Cette observation n'a pu être faite pour l'analogue Hyp¹ car la méthode employée pour la cyclisation n'est pas la même (Fukami *et al.*, 1996). Plusieurs paramètres influent sur le rendement de la cyclisation et certains groupes ont tenté d'en

cerner les plus cruciaux (Alcaro *et al.*, 2004, Gao *et al.*, 2002). De façon générale, les séquences linéaires préférant une conformation rapprochant le *N* et le *C*-terminal cyclise avec de meilleurs rendements. Ceux-ci intègrent souvent un acide aminé comme Gly ou Pro, ce qui confère une certaine flexibilité conformationnelle à la molécule.

Nous avons également choisi de synthétiser un analogue possédant un espaceur entre l'antagoniste et le groupement fluorophore. Cette combinaison est susceptible de limiter le quenching de la fluorescence typiquement obtenus lorsque le fluorophore est directement conjugué (Haughland, 1996). De plus, ceci tend à maintenir l'affinité pour le récepteur puisque l'interférence stérique entre la fluoresceine et l'antagoniste s'en trouve diminué. L'espaceur de 6 carbones choisi (l'acide aminocaproïque) procure cette flexibilité.

Comme le *N*-terminal d'un peptide couplé au FITC est susceptible d'être clivé en milieu acide (Maeda & Kawauchi, 1968), nous avons préféré procéder à la conjugaison du FITC après les étapes de clivage de la résine (HF₍₁₎) et de purification. En effet, les dérivés fluoresceine-thiocarbamyl décompose en milieu acide de façon similaire à la dégradation d'Edman (Edman, 1960), conduisant ainsi à un dérivé fluoresceine-thiohydantoin de l'acide aminé en *N*-terminal (Kawauchi *et al.*, 1969). Nous avons donc obtenus le BDN-123NF et le BDN-123NLF en intégrant la fluoresceine à la toute fin de la synthèse.

Contrairement aux effets bénéfiques des antagonistes ET_A dans certaines pathologies comme l'hypertension artérielle pulmonaire (Lee & Channick, 2005), le blocage sélectif du récepteur ET_B à l'aide d'antagoniste ET_B sélectif n'est pas souhaitable dans la plupart des cas et donc, peu d'antagonistes de ce type ont été développés

(D'Orleans-Juste *et al.*, 2002). Il existe donc moins d'information sur la synthèse et la relation structure-activité de ces composés. Néanmoins, quelques ouvrages à ce sujet ont été publiés sur le BQ-788, un des premiers antagoniste puissant et sélectif des récepteurs ET_B (Fukami *et al.*, 1995, He *et al.*, 1995, Ishikawa *et al.*, 1993, Ishikawa *et al.*, 1994). De plus, nous nous sommes récemment familiarisés avec la synthèse du BQ-788 (Brosseau *et al.*, 2005).

La relation structure-activité de ce dernier nous laisse entrevoir 3 possibilités quant au positionnement du fluorophore. D'abord, en substituant le résidu en position 1 (Mle) pour un acide aminé possédant une fonctionnalité comme une amine primaire espacée de quelques carbones (Lys ou Orn par exemple). Il est connu que la substitution du résidu 2 (D-Trp) ou 3 (D-Nle) pour des acides aminés très semblables peut être dramatique alors que le résidu 1 est plus flexible à ce niveau (Ishikawa *et al.*, 1993). Malgré tout, la rétention de l'affinité pour le récepteur ET_B en présence de ce nouvel acide aminé est difficile à prévoir.

La deuxième solution consiste à lier le fluorophore au C-terminal. La relation structure-activité du BQ-788 suggère que l'estérification de cet acide carboxylique n'affecte que peu l'activité (Ishikawa *et al.*, 1993). Par contre, il peut grandement en affecter la solubilité aqueuse et ainsi créer un frein à son utilisation. De plus, notre stratégie de synthèse n'est pas directement applicable à ce type de dérivation puisque l'introduction du fluorophore (ou mieux un espaceur adéquatement protégé) doit être fait au tout début de la synthèse. En effet, l'activation d'un *N*-acylpeptide est risquée et conduit souvent à l'épimérisation du centre en alpha de l'ester activé via l'oxazolone correspondante.

La troisième solution consiste à lier le fluorophore à l'extrémité de la pipéridine situé en *N*-terminal. Comme celle-ci est dénuée de fonctionnalité propice à la conjugaison, nous devons la substituer pour une 2,6-*cis*-pipéridine renfermant une fonctionnalité sur le cycle. Nous avons opté pour la 2,6-*cis*-diméthylpipérazine, une des rares molécules commercialement disponibles correspondant à nos critères.

Dans un premier temps, nous avons validé notre nouvelle approche méthodologique en synthétisant de nouveaux analogues du BQ-788 dont la portion urée est modifiée. En tentant de coupler la *N*-2,2,6,6-tétraméthylpipéridine selon notre procédure, nous n'avons pas été en mesure d'obtenir de dérivés peptidiques de type *N*-2,2,6,6-tétraméthylpipéridine-1-carbonyl peptide. La synthèse de composés semblables par Nagase *et al.* (Nagase *et al.*, 1995) fut réalisée en utilisant une procédure de Hassel et Seebach (Hassel & Seebach, 1978), malheureusement, l'absence de descriptifs expérimentaux dans l'étude de Hassel et Seebach (Hassel & Seebach, 1978) nous a empêché d'adopter cette approche. Nous avons également été incapables d'adapter une procédure de Martina *et al.* permettant d'obtenir des dérivés carbamate du *N*-2,2,6,6-tétraméthylpipéridine (Martina & MacDonald, 1994). En revanche, nous avons obtenu un mélange de deux isomères correspondant aux produits de l'ouverture du cycle de la pipéridine (Berg & Cowling, 1971). L'application de la méthodologie décrite précédemment pour les dérivés *N,N*-dicyclohexylamine et *N,N*-diisopropylamine a généré les dérivés peptidiques correspondants dans des rendements de 47% et 56%, respectivement. Nous considérons que la méthode est généralement applicable pour d'autres amines secondaires encombrées et que le *N*-2,2,6,6-tétraméthylpipéridine demeure un cas unique car des composés semblables comme le *N*-2,2,5,5-

tétraméthylpyrrolidine-1-carbonyl chloride ne semble pas se décomposer de la même façon (Berg & Cowling, 1971).

Nous avons donc procédé à la dérivation des analogues pipérazine. Pour nous permettre d'insérer ce fragment selon notre méthodologie de synthèse d'urée encombré (Brosseau *et al.*, 2005), nous l'avons protégé en position 4 avec un Boc dans un rendement quasi-quantitatif. L'urée désiré a été obtenu avec un rendement avoisinant ceux obtenu avec les analogues *N,N*-diisopropylamine et *N,N*-cyclohexylamine, soit 52%. Ceci démontre bien la généralité de la méthode et indique une fois de plus qu'il est possible de coupler des amines secondaires très encombrés en utilisant des conditions relativement douces. Le peptide a ensuite été adéquatement déprotégé et conjugué directement au FITC à très bon rendement pour produire le BDN-788NF. Pour les mêmes raisons que mentionnées précédemment, nous avons synthétisés une version possédant un espaceur entre le peptide et le FITC. À cet effet, nous avons choisi l'acide aminoundécanoïque. Nous l'avons préféré à l'acide aminocaproïque dans cette application parce que nous croyions que l'interférence entre la sonde et le peptide serait plus dramatique. Notre approche a donc conduit à la production de l'analogue BDN-788NLF.

4. Activités biologiques du BQ-123, BQ-788 et nouveaux analogues

Après avoir clairement démontré et comparé les caractéristiques physico-chimiques du BQ-123 et BQ-788 issues de nos laboratoires à ceux de source commerciale, nous avons procédé à leur caractérisation pharmacologique *in vitro* sur des préparations

vasculaires et *in vivo* chez un modèle murin. Les bioessais *in vitro* ont été développés dans nos laboratoires (Calo *et al.*, 1996) et sont basés sur une méthodologie classique d'analyse pharmacodynamique permettant de comparer l'affinité d'antagoniste (Arunlakshana & Schild, 1959).

Dans l'artère carotide de lapin (A.C.L.), le BQ-123 possède un $pA_2 = 6.77$. Ceci est en accord avec les données de la littérature, soit un pA_2 entre 6.4 et 7.2 (Calo *et al.*, 1996, Ihara *et al.*, 1992). De plus, le BQ-123 (1.0 mg/kg) atténue significativement l'augmentation de pression artérielle moyenne induit par l'ET-1 (0.5 nmol/kg i.v.) chez la souris (Berthiaume *et al.*, 2000). Le BQ-788 antagonise les effets contractiles de l'IRL 1620 sur l'artère pulmonaire de lapin (A.P.L) avec un pA_2 de 8.24, soit l'équivalent (8.4) de ce qui a été rapporté en utilisant le BQ-3020 comme agoniste sélectif ET_B (Ishikawa *et al.*, 1994). *In vivo*, le BQ-788 (1.0 mg/kg) abolit la réponse pressive à l'IRL 1620 (1.0 nmol/kg), ce qui est en accord avec les études précédemment rapportées dans la littérature (Berthiaume *et al.*, 2000).

Afin d'évaluer l'intégrité des propriétés pharmacodynamiques des nouvelles molécules synthétisées comparativement aux antagonistes de référence, nous avons systématiquement testés les cyclopentapeptides dans l'artère carotide de lapin (A.C.L.) et les tripeptides dans l'artère pulmonaire de lapin (A.P.L.). Les composés d'intérêts ont ensuite été testés dans un modèle murin pour déterminer leur spécificité en utilisant de l'Ang II comme agent presseur.

Dans le cas des analogues du BQ-123, seul les dérivés possédant le FITC demeurent actifs. Ceci est particulièrement surprenant, puisque l'on s'attendait à une rétention de l'affinité apparente de la part de tous les composés. Par contre, le *cyclo*(Hyp-

D-Val-Leu-D-Trp-D-Asp) et analogues furent testé pour leur habileté à déplacer l'ET radioactive dans une préparation de membranes du muscle lisse porcin (Fukami *et al.*, 1996). Ce bioessai est moins complexe au point de vue biologique car il donne une mesure de l'affinité réelle des composés pour le récepteur à l'étude. Notre bioessai permet de mesurer l'affinité apparente, qui elle dépend en plus des mécanismes de transduction du signal. De plus, il s'agit de récepteurs de l'ET appartenant à des espèces distinctes et possédant des séquences similaires mais non-identiques. Tout ceci pourrait expliquer la différence d'activité notoire. *In vitro*, il est possible de discriminer le BDN-123NF ($pA_2 = 6.42$, $r = 0.99$) du BDN-123NLF ($pA_2 = 7.10$, $r = 0.98$), ce dernier étant 0,68 unité log plus actif. Autrement dit, le BDN-123NLF possède une affinité apparente 5 fois plus élevée que le BDN-123NF. Le composé de référence, le BQ-123 ($pA_2 = 6.77$, $r = 0.99$) possède une affinité apparente intermédiaire lorsque comparé aux analogues fluorescents. Le bioessai *in vivo* met en valeur la spécificité de nos composés fluorescents alors qu'ils n'affectent pas l'augmentation de pression artérielle induite par l'Ang II (0.05 nmol/kg i.v.). Comme ces composés (particulièrement le BDN-123NLF) seront ultimement étudiés dans des préparations cellulaires humaines possédant des récepteurs ET_A, il serait pertinent de connaître leur affinité réelle. Ainsi, un essai de liaison contre l'ET-1 radioactive pourrait être exploité (Nambi *et al.*, 1994).

Dans le cas des analogues du BQ-788, le BDN-788N ($pA_2 = 7.07$, $r = 0.99$), l'analogue *N,N*-diisopropylamine ($pA_2 = 7.02$, $r = 0.99$) et l'analogue 1,1,5-triméthylhexylamine ($pA_2 = 7.08$, $r = 0.52$) sont environ 10 fois moins actifs que le composé de référence, bien que l'analogue 1,1,5-triméthylhexylamine soit non-compétitif. Les deux premiers analogues sont des mimétiques du cycle pipéridine.

Comme on peut le constater, un faible changement de structure entraîne une grande perturbation de l'affinité apparente des composés. L'analogue *N,N*-dicyclohexylamine ($pA_2 = 5.93$, $r = 0.99$) est au moins 100 fois moins actif que le composé de référence. Le BDN-788NL et le BDN-788NLF, soit les analogues pourvus de l'espaceur, ne sont pas actifs sur le récepteur ET_B . Étrangement, le BDN-788NF ($pA_2 = 6.52$, $r = 0.98$) demeure un antagoniste compétitif possédant une certaine affinité. Il nous est difficile d'expliquer en quoi l'espaceur est plus désavantageux que la fluoresceine pour l'activité. Toutefois, il est intéressant de noter que tous les composés conservant une affinité pour le récepteur d'intérêt conservent également leurs caractéristiques de selectivité et de spécificité. Dans ce modèle murin, l'analogue fluorescent BDN-788NF (1.0 mg/kg) n'a aucun effet sur la réponse pressive à l'ang II (1.0 nmol/kg), ce qui confère à cet analogue la caractéristique de spécificité.

En perspective, il serait intéressant de poursuivre ce projet en débutant par la caractérisation *in vivo* chez la souris de BDN-123-NLF et BDN-123NF contre l'ET-1, ainsi que de BDN-788NF contre l'IRL 1620. Puis, il serait pertinent de valider les caractéristiques de sélectivités et spécificités des BDN-123NLF et BDN-788NF sur un modèle cellulaire possédant des récepteurs ET_A et/ou ET_B avec un essai de liaison à l'ET radioactive; et ultimement par microscopie confocale en exploitant les propriétés fluorescentes du BDN-123NLF et BDN-788NF. Ainsi, ces nouvelles molécules seront susceptible d'être utilisées *in situ* pour visualiser les récepteurs de l'ET dans des préparations d'origine vasculaire avec ou sans endothélium.

Selon les résultats obtenus, la synthèse d'une deuxième série de composés pourrait être envisageable. Par exemple, il serait probablement possible de préciser l'impact de

l'espaceur sur les propriétés antagonistes ET_B du BDN-788NLF en déterminant l'activité d'analogues dont l'espaceur possède une longueur intermédiaire (2, 4, 6 et 8 carbones). par rapport au BDN-788NF (0 carbone) et BDN-788NLF (10 carbones). De plus, le groupement FITC pourrait être substitué pour un autre groupement fluorescent pouvant être visualisé à une longueur d'onde différente, ce qui permettrait de faire des expériences de co-localisation cellulaire.

CONCLUSIONS

Dans le présent ouvrage nous avons démontré que :

1. nous avons synthétisé efficacement du BQ-123 à l'aide d'une stratégie de cyclisation directement sur phase solide.
2. nous avons développé un protocole « one-pot » pour la synthèse d'urée encombrée et avons appliqué cette méthodologie pour la synthèse du BQ-788.
3. nous avons comparé les données physico-chimiques (RMN ^1H , SM, CCM et HPLC) et pharmacologiques *in vitro* et *in vivo* du BQ-123 et du BQ-788 suite à leur synthèse issus de nos protocoles avec les données originales.

Le BQ-123 et le BQ-788 issus de nos méthodes de synthèse se comportent de façon identique à ceux issus de source commerciale. Nous pouvons donc conclure que nous sommes en mesure de synthétiser ces deux antagonistes. De plus, ces méthodologies sont très efficaces puisque le rendement global de la synthèse du BQ-123 est fort acceptable et celui du BQ-788 est supérieur à ce qui est rapporté dans la littérature. Nous utiliserons ces composés de référence ainsi que les stratégies de synthèse associées pour la deuxième partie de l'étude.

Notre étude démontre aussi que:

4. nous avons synthétisé des analogues du BQ-123 conjugué directement au FITC ou indirectement à l'aide d'un espaceur.
5. le BDN-123NLF est un analogue fluorescent qui retient les caractéristiques de puissance, compétitivité et sélectivité du BQ-123 *in vitro*. De plus, le BDN-123NLF est spécifique au système endothélinergique *in vivo*. Il est légèrement plus puissant que le BQ-123, lui-même légèrement plus puissant que le BDN-123NF.
6. nous avons synthétisé des analogues du BQ-788 conjugué directement au FITC ou indirectement à l'aide d'un espaceur.
7. le BDN-788NF est un analogue fluorescent qui retient les caractéristiques de compétitivité et sélectivité du BQ-788. De plus, le BDN-788NF est spécifique au système endothélinergique *in vivo*. Il est moins puissant que le BQ-788 mais plus puissant que son analogue possédant un espaceur, soit le BDN-788NLF.

Comme le BDN-123NLF et le BDN-788NF sont des molécules fluorescentes sélectives et spécifiques aux récepteurs ET_A et ET_B de l'endothéline, respectivement; ceux-ci pourraient s'avérer être de puissants outils pharmacologiques pour étudier le système endothélinergique.

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier le Dr Witold Neugebauer pour m'avoir introduit au département de pharmacologie en convaincant mon directeur de recherche principal, le Dr Pedro D'Orléans-Juste, de m'accueillir dans son laboratoire. Je remercie sincèrement ce dernier pour sa confiance exprimé à mon égard tout au long de mon passage.

Je remercie également les Drs Fernand Gobeil Jr et Alain Cadieux pour m'avoir permis non seulement de réaliser les expériences de caractérisation *in vitro*, mais aussi pour leurs nombreux conseils prodigués.

Je remercie mes collègues de travail, Isabelle Brochu et Patric Provençal qui ont participé activement dans la réalisation des études *in vivo*.

Je remercie Gaston Boulay, Witold Neugebauer et Klaus Klarskov pour la réalisation des expériences de spectrométrie de masse ainsi que Normand Pothier pour ses conseils techniques quant à la résonance magnétique nucléaire.

Je remercie mes collègues du laboratoire pour leur amitié et leur soutien : Julie Labonté, Emilie Carrier, Isabelle Brochu, Marie-Hélène Fecteau, Eurode Legros, Jean-Claude Honoré et Elie Simard.

Je suis très reconnaissant envers les Drs Pedro D'Orléans-Juste, Emanuel Escher et Claude Spino pour leur implication dans l'évaluation de ce mémoire.

Enfin, je remercie ma précieuse famille et ma copine Amélie Dion pour leur affection et leur soutien inconditionnelle.

BIBLIOGRAPHIE

- ALCARO M.C., SABATINO G., UZIEL J., CHELLI M., GINANNESCHI M., ROVERO P., *et al.* (2004). On-resin head-to-tail cyclization of cyclotetrapeptides: Optimization of crucial parameters. *J. Pept. Sci.*, **10**, 218-28.
- ANDERSON M.J., COHEN M.W. (1974). Fluorescent staining of acetylcholine receptors in vertebrate skeletal muscle. *J. Physiol.*, **237**, 385-400.
- ARAI H., HORI S., ARAMORI I., OHKUBO H., NAKANISHI S. (1990). Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*, **348**, 730-2.
- ARUNLAKSHANA O., SCHILD H.O. (1959). Some quantitative uses of drug antagonists. *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, **14**, 48-58.
- BAINBUR N., TRIGGLE D.J. (1994). Concepts and progress in the development and utilization of receptor-specific fluorescent ligands. *Med. Res. Rev.*, **14**, 591-664.
- BALBONI G., SALVADORI S., DAL PIAZ A., BORTOLOTTI F., ARGAZZI R., NEGRI L., *et al.* (2004). Highly selective fluorescent analogue of the potent delta-opioid receptor antagonist dmt-tic. *J. Med. Chem.*, **47**, 6541-6.
- BATEY R., SANTHAKUMAR V., YOSHINA-ISHII C., TAYLOR S. (1998). An efficient new protocol for the formation of unsymmetrical tri- and tetrasubstituted ureas. *Tet Lett*, **39**, 6267-70.
- BERG S., COWLING D. (1971). Acylation of 2,2,6,6-tetramethylpiperidine and 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine. *J Chem Soc (C)*, 1653-8.

- BERTHIAUME N., YANAGISAWA M., LABONTE J., D'ORLEANS-JUSTE P. (2000). Heterozygous knock-out of ET(B) receptors induces BQ-123-sensitive hypertension in the mouse. *Hypertension*, **36**, 1002-7.
- BLAIS V., FUGERE M., DENAULT J.B., KLARSKOV K., DAY R., LEDUC R. (2002). Processing of proendothelin-1 by members of the subtilisin-like pro-protein convertase family. *FEBS Lett.*, **524**, 43-8.
- BODANSZKY M, TOLLE JC, GARDNER JD, WALKER MD, MUTT V. (1980). Cholecystokinin (pancreozymin) 6. synthesis and properties of the N^a-acetyl-derivative of cholecystokinin 27-33. *Int J Peptide Protein Res*, **16**, 402-11.
- BODANSZSKY M. (1993) Principles of peptide synthesis. 2nd edition. Springer-Verlag.
- BOIVIN S., TESSIER S., AUBIN J., LAMPRON P., DETHEUX M., FOURNIER A. (2004). Identification of a binding domain of the endothelin-B receptor using a selective IRL-1620-derived photoprobe. *Biochemistry*, **43**, 11516-25.
- BRADLEY E.K., NG S.C., SIMON R.J., SPELLMEYER D.C. (1994). Synthesis, molecular modelling, and NMR structure determination of four cyclic peptide antagonists of endothelin. *Bioorg. Med. Chem.*, **2**, 279-96.
- BROSSEAU J.P., D'ORLEANS-JUSTE P., NEUGEBAUER W.A. (2005). Development of an efficient strategy for the synthesis of the ETB receptor antagonist BQ-788 and some related analogues. *Peptides*, **26**, 1441-53.
- CALO G., GRATTON J.P., TELEMAQUE S., D'ORLEANS-JUSTE P., REGOLI D. (1996). Pharmacology of endothelins: Vascular preparations for studying ETA and ETB receptors. *Mol. Cell. Biochem.*, **154**, 31-7.
- DALY C.J., MCGRATH J.C. (2003). Fluorescent ligands, antibodies, and proteins for the study of receptors. *Pharmacol. Ther.*, **100**, 101-18.

DAVENPORT A.P. (2002). International Union of Pharmacology. XXIX. Update on Endothelin Receptor Nomenclature. *Pharmacol. Rev.*, **54**, 219-26.

D'ORLEANS-JUSTE P., LABONTE J., BKAILY G., CHOUFANI S., PLANTE M., HONORE J.C. (2002). Function of the endothelin(B) receptor in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Pharmacol. Ther.*, **95**, 221-38.

D'ORLEANS-JUSTE P., PLANTE M., HONORE J.C., CARRIER E., LABONTE J. (2003). Synthesis and degradation of endothelin-1. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **81**, 503-10.

EDMAN P. (1960). Phenylthiohydantoins in protein analysis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **88**, 602-10.

EGGENA P., BUKU A. (1989). Synthesis and characterization of a long-acting fluorescent analog of vasotocin. *Biol. Cell.*, **66**, 1-6.

FABRY M., CABRELE C., HOCKER H., BECK-SICKINGER A.G. (2000). Differently labeled peptide ligands for rapid investigation of receptor expression on a new human glioblastoma cell line. *Peptides*, **21**, 1885-93.

FAURE M.P., GAUDREAU P., SHAW I., CASHMAN N.R., BEAUDET A. (1994). Synthesis of a biologically active fluorescent probe for labeling neurotensin receptors. *J. Histochem. Cytochem.*, **42**, 755-63.

FORGET G., HEISLER S., PARK W.K., SIROIS P., GAGNON D., REGOLI D. (1975). Characterization of an angiotensin II-fluorescamine derivative. *J. Pharm. Pharmacol.*, **27**, 491-6.

FUKAMI T., NAGASE T., FUJITA K., HAYAMA T., NIIYAMA K., MASE T., *et al.* (1995). Structure-activity relationships of cyclic pentapeptide endothelin A receptor antagonists. *J. Med. Chem.*, **38**, 4309-24.

FUKAMI T., NIIYAMA K., AMANO Y., HISAKA A., FUJINO N., SAWASAKI Y., *et al.* (1996). Cyclic pentapeptide endothelin A receptor antagonists with attenuated in vivo clearance. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **44**, 609-14.

FUKAMI T., YAMAKAWA T., KOJIMA H., AMANO Y., IHARA M., YANO M., *et al.* (1995). Synthesis of 2-substituted D-tryptophan-containing peptide derivatives with endothelin receptor antagonist activity. *Bioorg and Med Chem Lett*, **5**, 1483-8.

FUKAMI T., YAMAKAWA T., NIIYAMA K., KOJIMA H., AMANO Y., KANDA F., *et al.* (1996). Synthesis and structure-activity relationships of 2-substituted D-tryptophan-containing peptidic endothelin receptor antagonists: Importance of the C-2 substituent of the D-tryptophan residue for endothelin A and B receptor subtype selectivity. *J. Med. Chem.*, **39**, 2313-30.

FUKURODA T., FUJIKAWA T., OZAKI S., ISHIKAWA K., YANO M., NISHIKIBE M. (1994a). Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **199**, 1461-5.

FUKURODA T., OZAKI S., IHARA M., ISHIKAWA K., YANO M., NISHIKIBE M. (1994b). Synergistic inhibition by BQ-123 and BQ-788 of endothelin-1-induced contractions of the rabbit pulmonary artery. *Br. J. Pharmacol.*, **113**, 336-8.

FULOP L., PENKE B., ZARANDI M. (2001). Synthesis and fluorescent labeling of beta-amyloid peptides. *J. Pept. Sci.*, **7**, 397-401.

FURCHGOTT R.F., ZAWADZKI J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, **288**, 373-6.

GAO X.M., YE Y.H., BERND M., KUTSCHER B. (2002). Studies on the synthesis of cyclic pentapeptides as LHRH antagonists and the factors that influence cyclization yield. *J. Pept. Sci.*, **8**, 418-30.

- GILLESPIE M.N., OWASOYO J.O., MCMURTRY I.F., O'BRIEN R.F. (1986). Sustained coronary vasoconstriction provoked by a peptidergic substance released from endothelial cells in culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **236**, 339-43.
- GRATTON J.P., RAE G.A., BKAILY G., D'ORLEANS-JUSTE P. (2000). ET(B) receptor blockade potentiates the pressor response to big endothelin-1 but not big endothelin-2 in the anesthetized rabbit. *Hypertension*, **35**, 726-31.
- HAIGLER H., ASH J.F., SINGER S.J., COHEN S. (1978). Visualization by fluorescence of the binding and internalization of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **75**, 3317-21.
- HASSEL T., SEEBACH D. (1978). Steric carbonyl protection metalation and cleavage of highly hindered ureas. *Helv Chim Acta*, **61**, 2337-40.
- HAUGHLAND R. (1996). Handbook of Fluorescent Probes and Research Products. p. 1-6. Molecular Probes.
- HAYNES W.G., CLARKE J.G., COCKCROFT J.R., WEBB D.J. (1991). Pharmacology of endothelin-1 in vivo in humans. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **17 Suppl 7**, S284-6.
- HE J.X., CODY W.L., DOHERTY A.M. (1995). An efficient preparation of the pseudopeptide endothelin-B receptor selective antagonist BQ-788. *J Org Chem*, **60**, 8262-6.
- HICKEY K.A., RUBANYI G., PAUL R.J., HIGHSMITH R.F. (1985). Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am. J. Physiol.*, **248**, C550-6.
- HONORE J.C., FECTEAU M.H., WESSALE J.L., D'ORLEANS-JUSTE P. (2004). Effects of selective and non-selective endothelin receptor blockade on ET-1-induced pressor response in the hamster. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **44**, S68-71.

HONORE J.C., PLANTE M., BKAILY G., RAE G.A., D'ORLEANS-JUSTE P. (2002). Pressor and pulmonary responses to ET-1(1-31) in guinea-pigs. *Br. J. Pharmacol.*, **136**, 819-28.

IHARA M., FUKURODA T., SAEKI T., NISHIKIBE M., KOJIRI K., SUDA H., *et al.* (1991). An endothelin receptor (ETA) antagonist isolated from streptomyces misakiensis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **178**, 132-7.

IHARA M., NOGUCHI K., SAEKI T., FUKURODA T., TSUCHIDA S., KIMURA S., *et al.* (1992). Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ETA receptor. *Life Sci.*, **50**, 247-55.

INOUE A., YANAGISAWA M., KIMURA S., KASUYA Y., MIYAUCHI T., GOTO K., *et al.* (1989). The human endothelin family: Three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **86**, 2863-7.

ISHIKAWA K., FUKAMI T., NAGASE T., FUJITA K., HAYAMA T., NIIYAMA K., *et al.* (1992). Cyclic pentapeptide endothelin antagonists with high ETA selectivity. potency- and solubility-enhancing modifications. *J. Med. Chem.*, **35**, 2139-42.

ISHIKAWA K., FUKAMI T., NAGASE T., MASE T., IHARA M., YANO M., *et al.* (1993). Endothelin antagonistic substance. *Eur Patent Appl*, 0 555 537 A2.

ISHIKAWA K., IHARA M., NOGUCHI K., MASE T., MINO N., SAEKI T., *et al.* (1994). Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 4892-6.

KAISER E., COLESCOTT R.L., BOSSINGER C.D., COOK P.I. (1970). Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.*, **34**, 595-8.

KATRITZKY A.R., PLEYNET D.P.M., YANG B. (1997). A general synthesis of unsymmetrical tetrasubstituted ureas. *J Org Chem*, **62**, 4155-8.

KAWAUCHI H., TUZIMURA K., MAEDA H., ISHIDA N. (1969). Reaction of fluorescein-isothiocyanate with proteins and amino acids. II. preparation of fluorescein-thiohydantoin amino acids and their thin-layer chromatography. *J. Biochem. (Tokyo)*, **66**, 783-9.

KIDO T., SAWAMURA T., HOSHIKAWA H., D'ORLEANS-JUSTE P., DENAULT J.B., LEDUC R., *et al.* (1997). Processing of proendothelin-1 at the C-terminus of big endothelin-1 is essential for proteolysis by endothelin-converting enzyme-1 in vivo. *Eur. J. Biochem.*, **244**, 520-6.

KISO Y., YAJIMA H. (1972). 2-isobutoxy-1-isobutoxycarbonyl-1,2-dihydroquinoline as a coupling reagent in peptide synthesis. *J Chem Soc Chem commun*, 942-3.

KLOOG Y., AMBAR I., SOKOLOVSKY M., KOCHVA E., WOLLBERG Z., BDOLAH A. (1988). Sarafotoxin, a novel vasoconstrictor peptide: Phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain. *Science*, **242**, 268-70.

KRYSTEK S.R.,JR, BASSOLINO D.A., BRUCCOLERI R.E., HUNT J.T., PORUBCAN M.A., WANDLER C.F., *et al.* (1992). Solution conformation of a cyclic pentapeptide endothelin antagonist. comparison of structures obtained from constrained dynamics and conformational search. *FEBS Lett.*, **299**, 255-61.

LABONTE J., BROCHU I., HONORE J.C., D'ORLEANS-JUSTE P. (2001). Role of ETB and B2 receptors in the ex vivo platelet inhibitory properties of endothelin and bradykinin in the mouse. *Br. J. Pharmacol.*, **132**, 934-40.

LANGLOIS C., LETOURNEAU M., LAMPRON P., ST-HILAIRE V., FOURNIER A. (2003). Development of agonists of endothelin-1 exhibiting selectivity towards ETA receptors. *Br. J. Pharmacol.*, **139**, 616-22.

LEE S.H., CHANNICK R.N. (2005). Endothelin antagonism in pulmonary arterial hypertension. *Semin. Respir. Crit. Care. Med.*, **26**, 402-8.

MAEDA H., KAWAUCHI H. (1968). A new method for the determination of N-terminus of peptides chain with fluorescein-isothiocyanate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **31**, 188-92.

MAGGI C.A., GIULIANI S., PATACCHINI R., ROVERO P., GIACHETTI A., MELI A. (1989). The activity of peptides of the endothelin family in various mammalian smooth muscle preparations. *Eur. J. Pharmacol.*, **174**, 23-31.

MARTINA S., MACDONALD S.A. (1994). Photosensitive tetramethylpiperidine urethanes: Synthesis and characterization. *J Org Chem*, **59**, 3281-3.

MAURICE M.C., GRATTON J.P., D'ORLEANS-JUSTE P. (1997). Pharmacology of two novel mixed ETA/ETB receptor antagonists, BQ-928 and 238, in the carotid and pulmonary arteries and the perfused kidney of the rabbit. *Br. J. Pharmacol.*, **120**, 319-25.

MCGRATH J.C., DALY C.J. (2003). Do fluorescent drugs show you more than you wanted to know? *Br. J. Pharmacol.*, **139**, 187-9.

MELAMED E., LAHAV M., ATLAS D. (1976). Direct localisation of beta-adrenoceptor sites in rat cerebellum by a new fluorescent analogue of propranolol. *Nature*, **261**, 420-2.

MIDDLETON R.J., KELLAM B. (2005). Fluorophore-tagged GPCR ligands. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **9**, 517-25.

MONCADA S., GRYGLEWSKI R., BUNTING S., VANE J.R. (1976). An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*, **263**, 663-5.

MÜHLEBACH A., PINO P. (2004). Konstitutionsisomerie in polykondensaten. teil VI synthese und eigenschaften von völlig geordneten und ungeordneten bipolyamiden aus *cis*-2,6-dimethylpiperazin und 1,2,5-thiadiazol-3,4-dicarbonyl-dichlorid. *Helv Chim Acta*, **73**, 839-55.

NAGASE T., MASE T., FUKAMI T., HAYAMA T., FUJITA K., NIIYAMA K., *et al.* (1995). Linear peptide ETA antagonists: Rational design and practical derivatization of N-terminal amino- and imino-carbomylated tripeptide derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*, **5**, 1395-400.

NAMBI P., ELSHOUBAGV N, WU HL, PULLEN M, OHLSTEIN EH, BROOKS DP., *et al.* (1994). Nonpeptide endothelin receptor antagonists. I. Effects on binding and signal transduction on human endothelinA and endothelinB receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, **271**, 755-61.

NEUGEBAUER W., GRATTON J.P., IHARA M., BKAILY G., D'ORLEANS-JUSTE P. (1996). Solid phase synthesis of head-to-tail cyclic peptide-ETA antagonist. *Peptides* 1996, 677-8.

NOWICK J.S., HOLMES D.L., NORONHA G., SMITH E.M., NGUYEN T.M., HUANG S.L. (1996). Synthesis of peptide isocyanates and isothiocyanates. *J Org Chem*, **61**, 3929-34.

NUDELMAN N.S., LEWKOWICZ E.S., PEREZ D.G. (1990). One-pot synthesis of N,N,N',N'-tetrasubstituted ureas and oxomalonamides by oxidative carbonylation of lithium amides at atmospheric pressure. *Syn*, 917-20.

O'BRIEN R.F., ROBBINS R.J., MCMURTRY I.F. (1987). Endothelial cells in culture produce a vasoconstrictor substance. *J. Cell. Physiol.*, **132**, 263-70.

OKADA M., NISHIKIBE M. (2002). BQ-788, a selective endothelin ET(B) receptor antagonist. *Cardiovasc. Drug Rev.*, **20**, 53-66.

PETTY H.R., FRANCIS J.W. (1986). Polymorphonuclear leukocyte histamine receptors: Occurrence in cell surface clusters and their redistribution during locomotion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **83**, 4332-5.

REILY M.D., THANABAL V., OMECINSKY D.O., DUNBAR J.B., JR, DOHERTY A.M., DEPUE P.L. (1992). The solution structure of a cyclic endothelin antagonist, BQ-123, based on ^1H - ^1H and ^{13}C - ^1H three bond coupling constants. *FEBS Lett.*, **300**, 136-40.

SAKURAI T., YANAGISAWA M., TAKUWA Y., MIYAZAKI H., KIMURA S., GOTO K., *et al.* (1990). Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature*, **348**, 732-5.

SCHWARZ H., ARAKAWA K. (1959). The use of p-nitrobenzyl esters in peptide synthesis. *J Am Chem Soc*, 5691-5.

SHRAGA-LEVINE Z., SOKOLOVSKY M. (2000). Functional coupling of G proteins to endothelin receptors is ligand and receptor subtype specific. *Cell. Mol. Neurobiol.*, **20**, 305-17.

SKOOG D.A., HOLLER F.J. & NIEMAN T.A. (1998). Principles of Instrumental Analysis 5th Edition. p. 355-379.

SOWEMIMO V., SCANLON D., JONES P., CRAIK D.J. (1994). Synthesis of cyclic penta- and hexapeptides: A general synthetic strategy on DAS resin. *J. Protein Chem.*, **13**, 339-46.

SPATOLA A.F., CROZET Y. (1996). Rediscovering an endothelin antagonist (BQ-123): A self-deconvoluting cyclic pentapeptide library. *J. Med. Chem.*, **39**, 3842-6.

STREITH J., BOIRON A., PAILLAUD J.-., RODRIGEZ-PEREZ E.-., STREHLER C., TSCHAMBER T. (1995). 4. chelate-controlled asymmetric synthesis of 2-substituted 2,3-dihydropyridin-4(1H)-ones: Synthesis of D- and L-aminodeoxyaltrose derivatives. *Helv Chim Acta*, **78**, 61-72.

TESSIER S., LANGLOIS C., BRKOVIC A., COUPAL M., DE LEAN A., FOURNIER A. (2000). Development of a photolabile ligand for the endothelin-A receptor of endothelin. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **36**, S53-4.

WEBB M.L., BIRD J.E., LIU E.C., ROSE P.M., SERAFINO R., STEIN P.D., *et al.* (1995). BMS-182874 is a selective, nonpeptide endothelin ETA receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **272**, 1124-34.

WHITE D.G., CANNON T.R., GARRATT H., MUNDIN J.W., SUMNER M.J., WATTS I.S. (1993). Endothelin ETA and ETB receptors mediate vascular smooth-muscle contraction. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **22 Suppl 8**, S144-8.

XIAO X., NGU K., CHAO C., PATEL D.V. (1997). Selective solid phase synthesis of ureas and hydantoins from common phenyl carbamate intermediates. *J Org Chem*, **62**, 6968-73.

YANAGISAWA M., KURIHARA H., KIMURA S., TOMOBE Y., KOBAYASHI M., MITSUI Y., *et al.* (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, **332**, 411-5.

ZEMANOVA L., SCHENK A., HUNT N., NIENHAUS G.U., HEILKER R. (2004). Endothelin receptor in virus-like particles: Ligand binding observed by fluorescence fluctuation spectroscopy. *Biochemistry*, **43**, 9021-8.