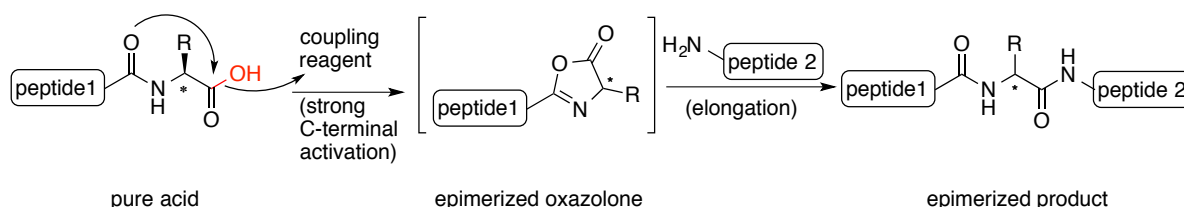




*Epimization-free C-terminal Peptide Activation, Elongation and Cyclization*  
S. Popović

## SUMMARY

After the pioneering studies of Fischer and Fourneau in the early 20<sup>th</sup> century on peptide coupling, much progress was made in the following years. However, a few decades later it became clear that precautionary measures had to be taken in order to avoid loss of stereointegrity during peptide elongation. For this, the order of both amino acid activation and subsequent addition to the growing peptide was crucial. If the carboxyl activation step is performed on suitably (i.e. *N*-terminal carbamate) protected amino acids, side product formation is usually avoided. Unfortunately, this decreases the power of peptide synthesis and limits general access to peptide derivatives in the sense that full diastereomeric control is only guaranteed if the peptides are synthesized from the *C*- to the *N*-terminus. Generally, activation of the peptide *C*-terminal carboxyl group is accompanied by partial loss of *C*-terminal stereointegrity (epimerization). This is the consequence of the neighboring amide group at the active *C*-terminal ester yielding epimerization-prone oxazolone intermediates (Scheme 1).



**Scheme 1.** Loss of *C*-terminal stereointegrity after carboxyl activation

The problem of peptide epimerization is especially important in the synthesis of cyclic peptides because *C*-terminal activation is required in order to induce cyclization. The therapeutic importance of cyclic peptides became apparent during the Second World War when it was discovered that cyclic decapeptide gramicidin S has antibacterial properties. This boosted cyclic peptide research resulting in several compounds reaching the market such as the antibiotics valinomycin and nisin, immunosuppressant cyclosporin A, and calcitonin for the treatment of osteoporosis. Recently, some larger cyclic peptides have shown to be potential drugs against Parkinson's disease. However, opposite to the larger cyclic peptides, the smaller counterparts (except diketopiperazines) consisting up to five amino acids are still not readily accessible mainly due to ring strain accompanied with epimerization during the lactamization step.

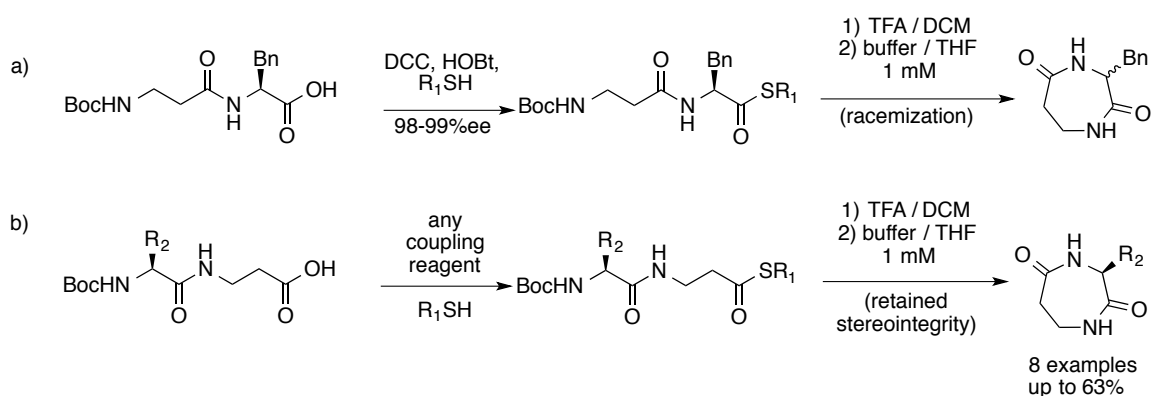
In order to tackle the main problems mentioned above the focus of this thesis was to develop epimerization-free methods for *C*-terminal peptide activation to enable *C*-terminal peptide elongation and ultimately peptide cyclization.

Chapter 1 briefly screens some parts of the history of peptide synthesis with a special attention to coupling reagents and peptide ligation methods. A closer look to the origin of the epimerization is presented through the widely accepted reaction mechanism and the development of special additives in order to preserve the stereointegrity.

Chapter 2 is dedicated to the synthesis of strained 7-membered homodiketopiperazine rings. Despite the small ring system it is difficult to bring peptide termini together because of the accompanied strain build-up leading to oligomerization and racemization. In order to explore the limits of direct lactamization, *C*-terminal peptide thioesters were chosen as the precursors because of their proven applicability in native chemical ligation (NCL) reactions. The aim was to demonstrate the use of standard

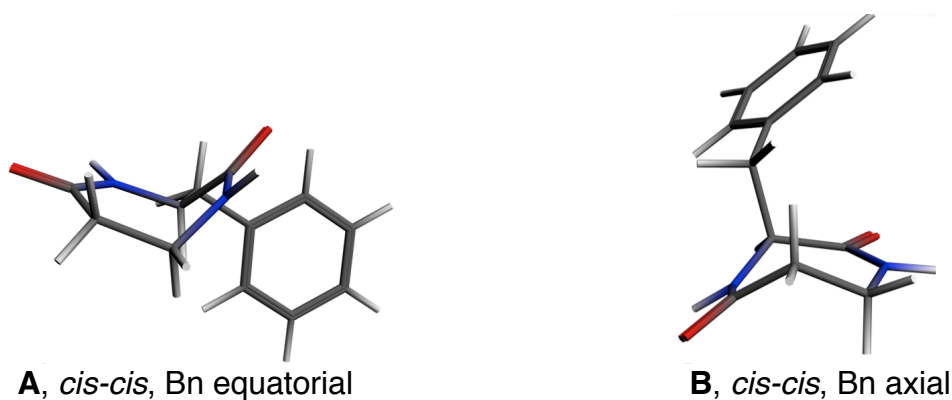
## Summary

coupling reagents for peptide thioester synthesis and subsequent cyclization experiments in aqueous medium. Screening of several commonly used reagents and reaction conditions indicated that for the chosen Boc- $\beta$ Ala-Phe-OH model peptide only DCC, not requiring the addition of a base, provided enantiopure peptide thioesters. Low yields had to be accepted in some cases. Despite a successful synthesis of enantiopure thioesters, efficient cyclization was only achieved in the reversed sequence containing  $\beta$ -alanine at the C-terminus (Scheme 2). Because the reaction conditions excluded the presence of additives, some interesting findings were observed in terms of racemization. The *ee* value of the isolated product *cyclo*(- $\beta$ Ala-Phe-) was dramatically lower (64%) than the *ee* value of the precursor Boc- $\beta$ Ala-Phe-SPh (96%) if stirred at pH = 7.25. This interesting observation was rationalized by the possible involvement of the liberated N-terminal amine into the intramolecular deprotonation step leading to oxazolone intermediates prior to cyclization. Thioesterification of the reversed sequences lacking C-terminal  $\alpha$ -stereocenter (Boc-AA- $\beta$ Ala-OH) gave the peptide thioesters, which were efficiently subjected to cyclization. Enantiomerically pure cyclic products were isolated in moderate but acceptable yields for this otherwise difficult lactamization.



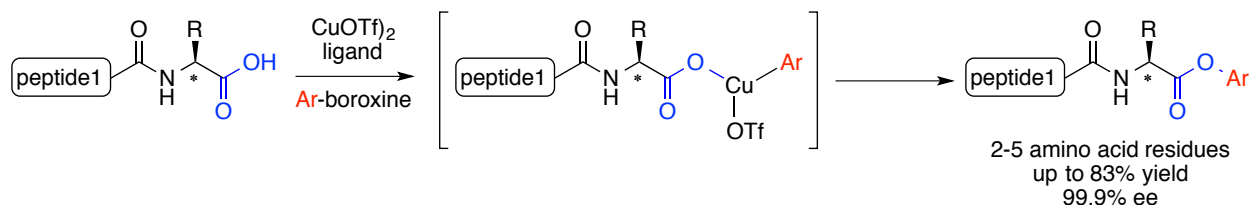
**Scheme 2.** a) C-terminal racemization prior to cyclization and b) enantiopure homodiketopiperazine synthesis.

A brief DFT optimal geometry calculation of the *cyclo*(Phe- $\beta$ Ala) homodiketopiperazine revealed the preference for half-chair conformations with *s-cis* amide bonds (Figure 1). This clearly showed that the presented direct lactamization method does not require the complicated auxiliaries/scaffolds as reported so far.



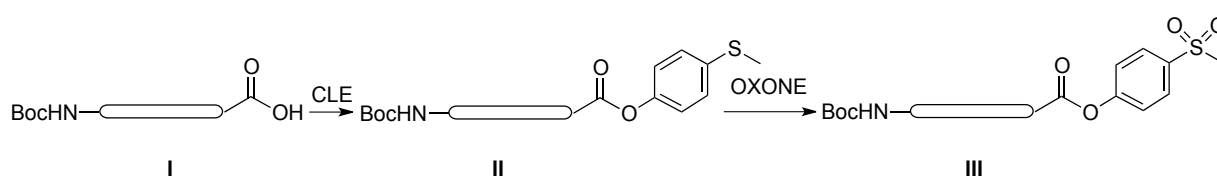
**Figure 1.** Calculated *cyclo*(Phe- $\beta$ Ala) conformers.

Chapter 3 covers the epimerization-free synthesis of peptide aryl esters and further activation. The linear peptide acids were converted to the aryl esters by a Chan-Lam-Evans (CLE) type esterification reaction. The possibility of *C*-terminal epimerization is excluded because a  $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ -mediated process allows formation of the peptide ester in a such manner that the carboxylic oxygen atom remains in the ester product (Scheme 3), which is opposite to the standard coupling reagents. The best source of the aryl group turned out to be boroxines that undergo a transmetallation step with the copper complex.



**Scheme 3.** CLE type peptide esterification

The use of electron deficient (4-nitrophenyl) boroxines gave low yields but still with a fully retained stereointegrity. Therefore, access to the activated peptides was envisioned through installation of 4-(methylthio)phenyl ester followed by oxidation to the 4-(methylsulfonyl)phenyl ester using OXONE or *m*CPBA. Specially designed substrates containing an extremely epimerization-prone *C*-terminal Phenylglycine (Phg) were also esterified and activated in good yields and excellent diastereopurity (Scheme 4).



Entry	I	II		III	
		Yield(%)	de (%)	Yield(%)	de (%)
1	Boc-Phe-Phe-OH	77	99.9	97	99.9
2	Boc-Phe-D-Phe-OH	75	99.9	quant.	99.9
3	Boc-Phe-Phg-OH	70	99.9	quant.	99.9
4	Boc-Phe-D-Phg-OH	73	99.9	95	99.9

**Scheme 4.** Epimerization-free *C*-terminal activation

Application of the 4-(methylsulfonyl)phenyl peptide esters in both *C*-terminal elongation and cyclization reactions with a closer look at the stereointegrity is described in chapter 4. The presented elongation examples include peptide fragment couplings via:

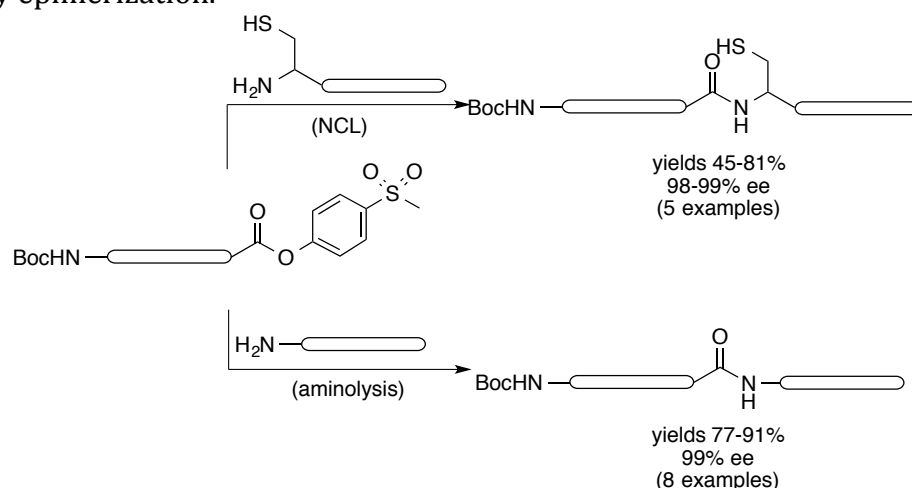
1) NCL reactions in an aqueous buffered medium where even Phg-containing derivatives showed extraordinary results.

2) Aminolysis in a dry organic solvent (THF), which might be very useful for couplings of apolar hydrophobic peptides (Scheme 5).

After initial difficulties superb preservation of the stereointegrity was achieved simply using an old trick: slow addition. In NCL set-ups the active ester became immediately quenched by slow addition to a buffered aqueous medium containing an excess of the cysteine nucleophile. On the other hand, aminolysis reactions were also performed in dry THF by slowly dosing a base or an excess of liberated amine nucleophile to the active aryl

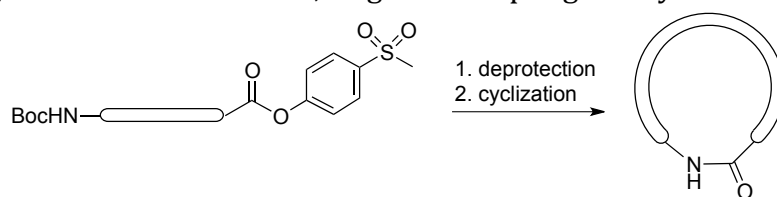
## Summary

ester. In this approach it turned out to be crucial to keep the concentration of the base low to avoid any epimerization.



**Scheme 5.** Epimerization-free C-terminal elongation via NCL or direct aminolysis

Ultimately, due to the high susceptibility to racemization and cyclo-oligomerization, the biggest challenge was the synthesis of strained cyclic peptides. By careful balancing the reaction conditions, *cyclo(-βAla-Phe-)* and *cyclo(-βAla-D-Phe-)* were synthesized in enantiopure form. Finally, the synthesis of gramicidin S was demonstrated by a multistep sequence through C-terminal activation, fragment coupling and cyclization (Scheme 6).



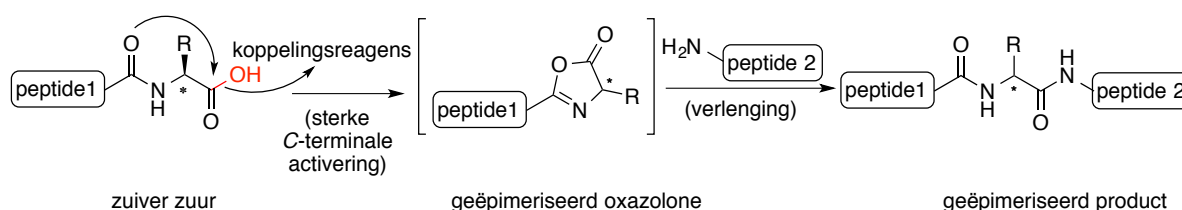
Entry	Product	Yield (%)	ee (%)
1	<i>cyclo(-βAla-Phe-)</i>	55	99
2	<i>cyclo(-βAla-D-Phe-)</i>	55	99
3	gramicidin S, <i>cyclo(-D-Phe-Pro-Val-Orn-Leu-)</i> <sub>2</sub>	42	nd

**Scheme 6.** Racemization-free cyclization of homodiketopiperazine and gramicidin S.

The work presented in this thesis is aimed at improving the current methodology for peptide synthesis. As discussed in the first chapter, and confirmed by the results in the second chapter, peptide couplings using standard coupling reagents may be troublesome if a C-terminal chiral amino acid is present. It became clear that the solvent, amount of the added base, order of the addition and even the presence of the peptide amine coupling partner has a tremendous effect on the stereochemical integrity. The novel developed epimerization-free CLE esterification protocol may extend the synthetic toolbox for peptide cyclizations and ligations. Further improvement in the CLE-type C-terminal peptide activation can be envisioned by the development of novel catalysts that allow the efficient use of electron-deficient boroxines. This would circumvent the current oxidative approach using OXONE, which is not compatible with some amino acids such as Cys and Met. Nevertheless, the experimentally fully supported achievements in C-terminal peptide elongations through CLE-esterification and subsequent NCL, direct ester aminolysis or lactamization justify more research in this area.

## SAMENVATTING

Na het baanbrekende werk van Fischer en Fourneau in het begin van de 20<sup>ste</sup> eeuw is er veel voortgang geboekt op het gebied van de koppeling van aminozuren tot peptiden. Door later onderzoek werd echter bekend dat het behoud van stereochemie niet vanzelfsprekend is tijdens deze koppelingsreacties, en dat er voorzorgsmaatregelen getroffen moesten worden om de nevenreacties die hiervoor verantwoordelijk zijn te beperken. Hierbij is de volgorde van aminozuuractivering en daaropvolgende additie van de groeiende peptideketen van cruciaal belang. Als de activering van het carbonzuur wordt uitgevoerd op aminozuren die op de juiste wijze beschermd zijn, bijvoorbeeld N-terminaal beschermde carbamaten, is de vorming van bijproducten vrijwel uitgesloten. Dit betekent echter wel dat alléén wanneer de peptideketen aan de N-terminus groeit (synthese van C naar N), de stereo-integriteit gewaarborgd blijft. Door deze beperking boet deze methode sterk in kracht in, aangezien niet alle peptiden op deze manier gemakkelijk te verkrijgen zijn. Over het algemeen zijn methoden waarbij de C-terminale carboxylgroep wordt geactiveerd onderhevig aan gedeeltelijk verlies van de stereochemie (epimerisatie). Dit is het gevolg van een intramoleculaire reactie van het nabije amide met de geactiveerde C-terminale ester tot een oxazolone-intermediair, dat erg gevoelig is voor epimerisatie (Schema 1).



**Schema 1.** Verlies van stereochemie door de vorming van een oxazolone-intermediair na activering van de carboxylgroep

Epimerisatie is een groot probleem in de synthese van kleine cyclische peptiden, omdat C-terminale activering van het peptide onvermijdelijk is. Het belang van cyclische peptiden als geneesmiddelen werd duidelijk rond de Tweede Wereldoorlog met de ontdekking van het antibacteriële decapeptide gramicidine S. De interesse in het onderzoek naar cyclische peptiden is hierdoor toegenomen met als resultaat dat de antibiotica valinomycine en nisine, het immunosuppressieve cyclosporine A en calcitonine voor de behandeling van osteoporose, op de commerciële markt zijn gebracht. Van grotere cyclische peptiden is recent bekend geworden dat zij mogelijk actief zijn in de behandeling van de ziekte van Parkinson. In tegenstelling tot grotere soortgenoten, is de synthese van kleine cyclische peptiden bestaande uit minder dan vijf aminozuren (met uitzondering van diketopiperazines) niet gemakkelijk. De belangrijkste redenen zijn ringspanning en het al genoemde probleem van epimerisatie bij de ringsluiting.

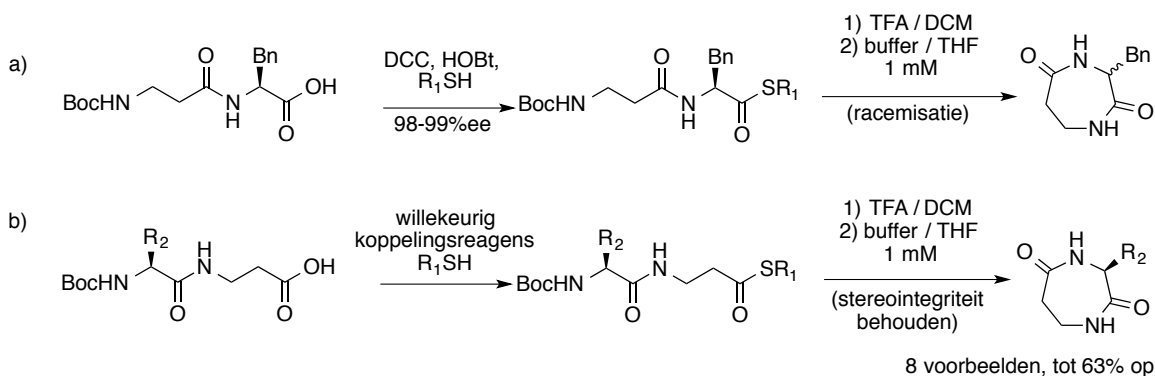
Het doel van dit proefschrift is het zoeken naar een oplossing van de voornoemde problemen door de ontwikkeling van epimerisatie-vrije methoden voor C-terminale peptide-activering voor verlenging van de peptideketen aan de C-terminus, met als ultieme uitdaging de synthese van kleine cyclische peptiden.

In hoofdstuk 1 wordt de historie van peptide synthese uitgediept met speciale aandacht voor koppelingsreagentia en ligatiemethoden. De oorsprong van epimerisatie zal toegelicht worden door middel van het meest gangbare mechanisme, en wat dit voor

betekenis heeft gehad in de ontwikkeling van additieven, die de stereo-integriteit van het peptide waarborgen tijdens koppelingsreacties.

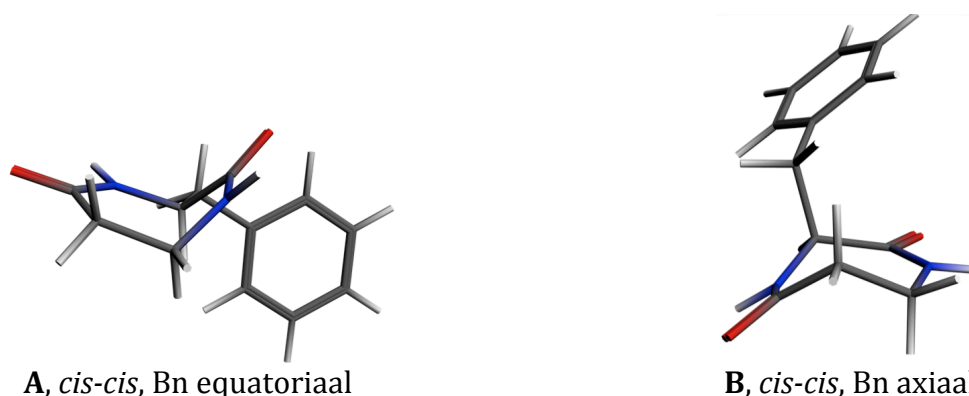
Hoofdstuk 2 staat in het teken van de synthese van homodiketopiperazinen, zevenringen met een aanzienlijke ringspanning. Ondanks het kleine ringsysteem is het bij elkaar brengen van de uiteinden niet gemakkelijk, mede door de opbouw van ringspanning wat kan leiden tot oligomerisatie en racemisatie. Om de randvoorwaarden te bepalen van directe lactamisering zijn C-terminale thioesters gekozen als precursors, omdat de toepasbaarheid van deze geactiveerde groepen bewezen is voor het koppelen van grotere peptidefragmenten in Native Chemical Ligation (NCL) reacties. Hiervoor zijn het gebruik van standaard koppelingsreagentia voor de synthese van de peptide-thioesters en daaropvolgende cyclisatie-experimenten in waterig medium onderzocht. Na het testen van verschillende veelgebruikte reagentia en reactiecondities werd duidelijk dat het alléén met het koppelingsreagens DCC - dat werkt zonder de toevoeging van base - mogelijk is om het model-peptide Boc- $\beta$ Ala-Phe-OH om te zetten in een enantiozuivere thioester. In sommige gevallen ging dit echter met een lage, doch acceptabele opbrengst. Ondanks de succesvolle synthese van enantiozuivere thioesters, kon efficiënte cyclisatie alleen bereikt worden wanneer de peptidesequentie omgedraaid werd, met het achirale  $\beta$ -alanine op de C-terminale positie (Schema 2).

Omdat de reactie verloopt zonder de aanwezigheid van additieven, kon een aantal waarnemingen worden gemaakt op het gebied van racemisatie. De *ee* waarden van het geïsoleerde product *cyclo* (- $\beta$ Ala-Phe-) waren significant lager (64%) dan de *ee* waarden van het uitgangspeptide Boc- $\beta$ Ala-Phe-SPh (96%), wanneer de reactie plaatsvond bij pH 7.25. Deze waarneming kan worden gerationaliseerd door de mogelijke betrokkenheid van het vrije N-terminale amine in de vorming van oxazolon-intermediären voorafgaand aan ringsluiting, door intramoleculaire deprotonering. Thioverestering van de omgekeerde peptidesequentie, waarbij het C-terminale aminozuur geen stereocentrum bevat (Boc-AA- $\beta$ Ala-OH), leverde wel succesvol de thioesters op, die vervolgens op een efficiënte manier gecycliseerd werden. Enantiozuivere cyclische producten zijn geïsoleerd in redelijke opbrengsten voor anderszins lastige syntheses van lactamen.



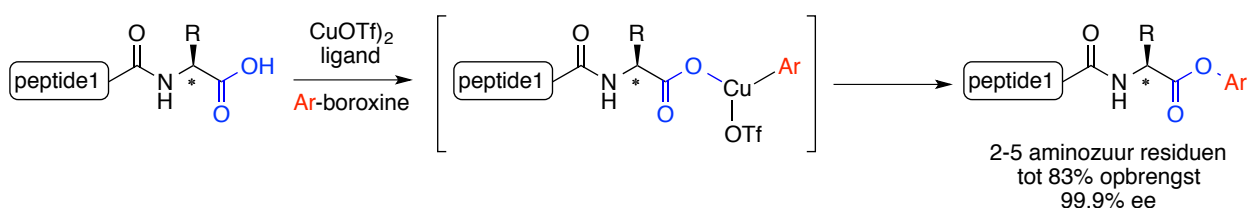
**Scheme 2.** a) C-Terminale racemisatie voorafgaand aan cyclisatie en b) enantiozuivere synthese van homodiketopiperazinen.

De optimale geometrie van *cyclo*(-Phe- $\beta$ Ala-)-homodiketopiperazine, bepaald met behulp van DFT berekeningen, toont de voorkeur voor de halve-stoel-conformatie met *s-cis* amidebindingen (Figuur 1). Dit illustreert dat de directe lactamvorming niet afhankelijk is van de gecompliceerde hulpgroepen die beschreven zijn in de literatuur.



**Figuur 1.** De berekende conformeren van *cyclo(-Phe-βAla-)*

In hoofdstuk 3 wordt behandeld hoe arylesters van peptiden zonder epimerisatie kunnen worden gesynthetiseerd. Lineaire peptides met C-terminaal vrij zuur worden omgezet tot arylesters via een Chan-Lam-Evans (CLE) type veresteringsreactie. Hierbij wordt de mogelijke epimerisatie van het C-terminale aminozuur vermeden, doordat in dit door koper(II)triflaat gekatalyzeerde proces, de peptide-ester gevormd wordt met inbouw van *beide* zuurstofatomen van het carbonzuur in de esterbinding van het eindproduct (Schema 3). Dit is tegengesteld aan de situatie die wordt gecreëerd wanneer men traditionele koppelingsreagentia gebruikt. De arylgroep kan het best worden ingevoerd door het gebruik van boroxines als de arylbron. Deze ondergaan in de reactie een transmetallering-stap met het koper-complex.



**Schema 3.** Chan-Lam-Evans type vorming van peptide-esters

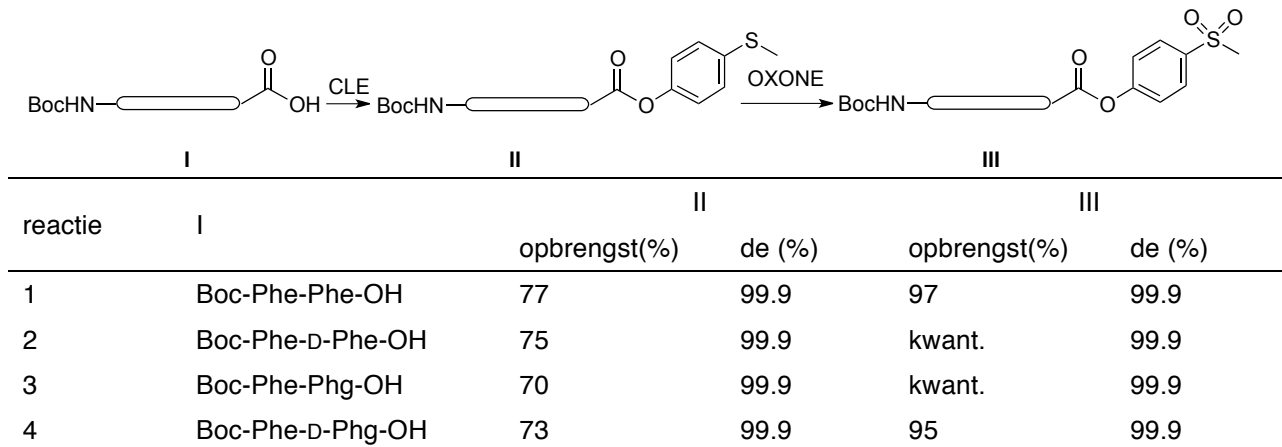
Het gebruik van elektronen-arme (4-nitrofenyl)boroxines in de peptide-verestering resulteerde in lage opbrengsten van de reactie, maar desalniettemin bleef de stereochemie van het peptide wel behouden. De synthese van geactiveerde peptide-esters werd ondernomen in twee stappen; allereerst via de introductie van een 4-(methylthio)-fenyl ester, gevolgd door de oxidatie naar de meer geactiveerde 4-(methylsulfonyl)fenyl ester, met behulp van OXONE of *m*-CPBA. Specifieke substraten met het C-terminale aminozuur fenyglycine (Phg), dat extreem gevoelig is voor epimerisatie, konden via deze methode ook omgezet worden in geactiveerde esters in goede opbrengst en uitstekende stereochemische zuiverheid (Schema 4).

Het gebruik van 4-(methylsulfonyl)fenyl peptide-esters in zowel C-terminale verlenging- als cyclisatiereacties wordt beschreven in hoofdstuk 4, waarbij extra aandacht gaat naar de stereo - integriteit van deze reacties. De voorbeelden van peptideverlengingsreacties behelzen onder andere: 1) NCL-reacties in waterige buffer, waarbij er zelfs voor peptiden die Phg bevatten buitengewoon goede resultaten behaald konden worden. 2) Peptidevorming in een droog organisch oplosmiddel (THF), wat nuttig kan zijn voor koppeling van apolaire, hydrofobe peptiden (Schema 5). Het ongekende behoud van de stereochemie in deze reacties werd, na wat aanlooppromen, bereikt door het toepassen van een oude truc, namelijk langzame additie. Voor NCL-reacties betekende dit dat de actieve peptide-ester langzaam werd toegevoegd aan een waterige buffer met een overmaat van het nucleofiel cysteïne, waardoor de actieve ester direct wegreageert.

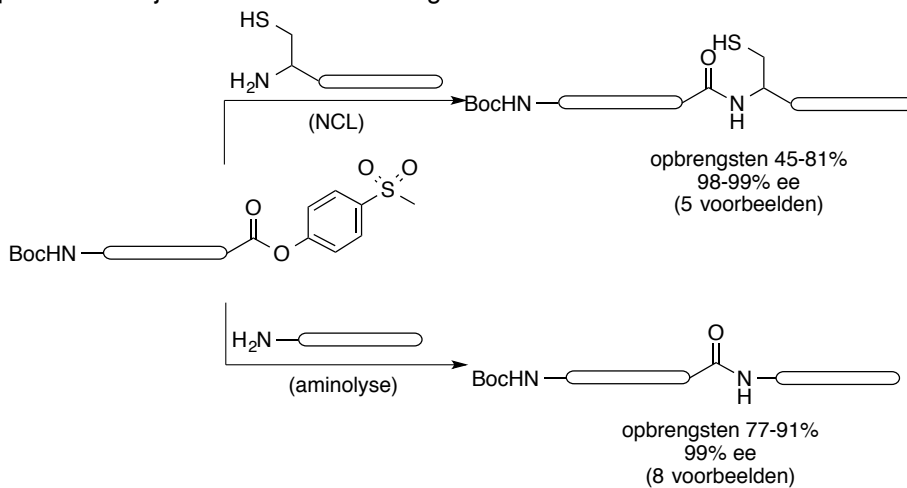


## Samenvatting

Peptidevorming werden uitgevoerd in droge THF, waarbij ofwel een base, of een overmaat van een vrij amine aan de actieve arylester werd toegevoegd. In deze opstelling is het echter wel van cruciaal belang om de concentratie van de base laag te houden, om enige epimerisatie alsnog te voorkomen.

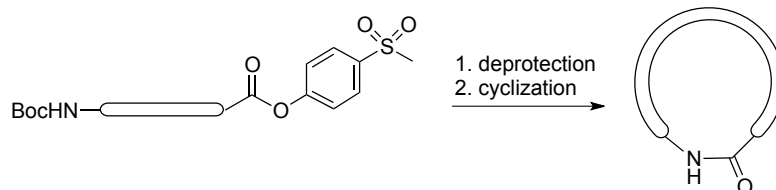


### Schema 4. Epimerisatievrije C-terminale activering



### Schema 5. Epimerisatievrije C-terminale verlenging via NCL of directe peptidevorming

Door de hoge vatbaarheid voor epimerisatie, en cyclo-oligomerisatie is de grootste uitdaging natuurlijk de synthese van ringgespannen cyclische peptiden. Door zorgvuldige uitwerking van de reactiecondities, zijn *cyclo(-βAla-Phe-)* en *cyclo(-βAla-D-Phe-)* gesynthetiseerd in enantiozuivere vorm. Als laatste is de synthese van gramicidine S voltooid via een meerstapsproces dat C-terminale activering, alsmede koppeling van peptidefragmenten en cyclisatie behelst.



reactie	product	opbrengst (%)	ee (%)
1	<i>cyclo(-βAla-Phe-)</i>	55	99
2	<i>cyclo(-βAla-D-Phe-)</i>	55	99
3	gramicidine S, <i>cyclo(-D-Phe-Pro-Val-Orn-Leu-)</i> <sub>2</sub>	42	nb

### Schema 6. Racemisatie-vrije cyclisatie van homodiketopiperazinen en gramicidine S.

Het werk dat in dit proefschrift is beschreven is gericht op het verbeteren van de huidige methoden is peptidesynthese. Zoals beschreven in het eerste hoofdstuk, en bevestigd door de behaalde resultaten in het tweede hoofdstuk, kunnen zich problemen voordoen in peptidekoppelingen die uitgevoerd worden met standaard koppelingsreagentia, wanneer er een chiraal C-terminaal aminozuur aanwezig is. Het is duidelijk geworden dat het oplosmiddel, de hoeveelheid base, volgorde van toevoeging van reagentia en zelfs de aanwezigheid van een peptidekoppelingspartner met een vrij amine een enorm effect kunnen hebben op het behoud van de stereochemie van het peptide. Het nieuw ontwikkelde epimerisatievrije CLE peptideveresteringsprotocol is een welkome uitbreiding van de synthetische 'toolbox' voor cyclisatie- en koppelingsreacties van peptiden. De methode kan verbeterd en uitgebreid worden door de ontwikkeling van een nieuwe katalysator die ook elektron-arme boroxines kan gebruiken in de verestering, waardoor de huidige oxidatieve stap voor verdere activering van de aryl-ester overbodig wordt gemaakt. Dit heeft als gevolg dat ook oxidatie-gevoelige aminozuren, zoals methionine en cysteïne, in een peptide kunnen worden geïncorporeerd. Desalniettemin toont dit experimenteel werk aan dat de voortgang op het gebied van C-terminale peptideverlenging door CLE-peptideverestering en de daarop volgende NCL-, directe peptidevormings- of lactamiserings-reactie, meer onderzoek op dit gebied rechtvaardigt.