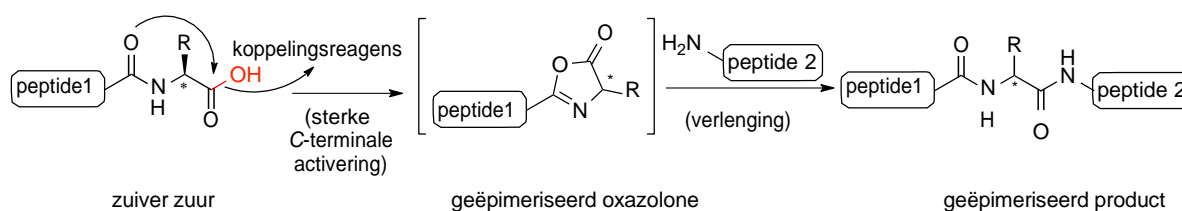




*Epimization-free C-terminal Peptide Activation, Elongation and Cyclization*  
S. Popović

# SAMENVATTING

Na het baanbrekende werk van Fischer en Fournéau 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.

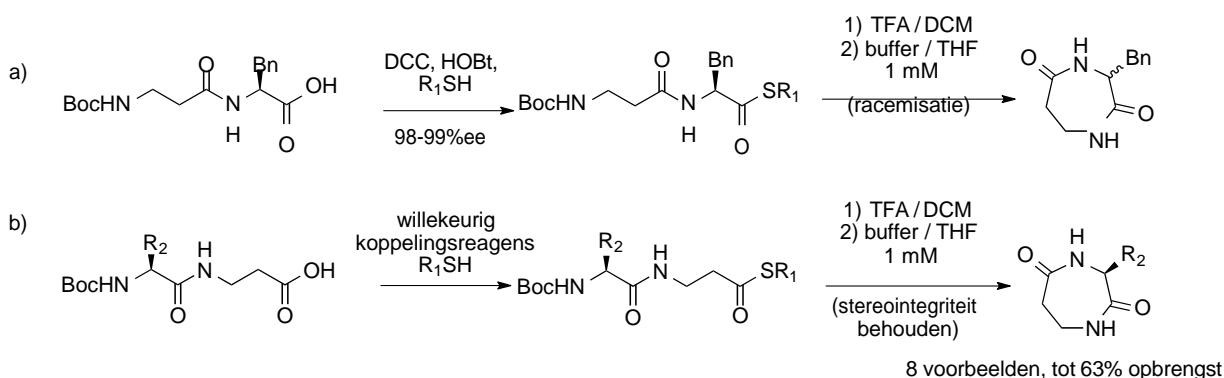
Het doel van dit proefschrift is het zoeken naar een oplossing van de voornoemde problemen door de ontwikkeling van epimerisatie[vrije methoden voor C[terminale peptide[activering voor verlenging van de peptideketen aan de C[terminus, met als ultieme uitdaging de synthese van kleine cyclische peptiden.

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.

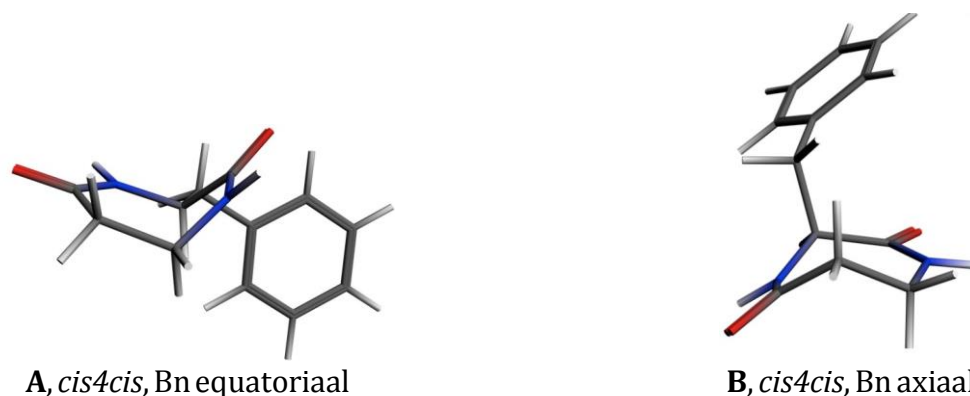
Hoofdstuk 2 staat in het teken van de synthese van homodiketopiperazinen, zevenringen met een aanzienlijke ringspanning. Ondanks het kleine ringsysteem is het bij elkaar brengen van de uiteinden niet gemakkelijk, mede door de opbouw van ringspanning wat kan leiden tot oligomerisatie en racemisatie. Om 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[βAla[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 β[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* ([βAla[Phe] waren significant lager (64%) dan de *ee* waarden van het uitgangspeptide Boc[βAla[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 oxazoloni[intermediären voorafgaand aan ringsluiting, door intramoleculaire deprotonering. Thioverestering van de omgekeerde peptidesequentie, waarbij het C[terminale aminozuur geen stereocentrum bevat (Boc[AA[βAla[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.



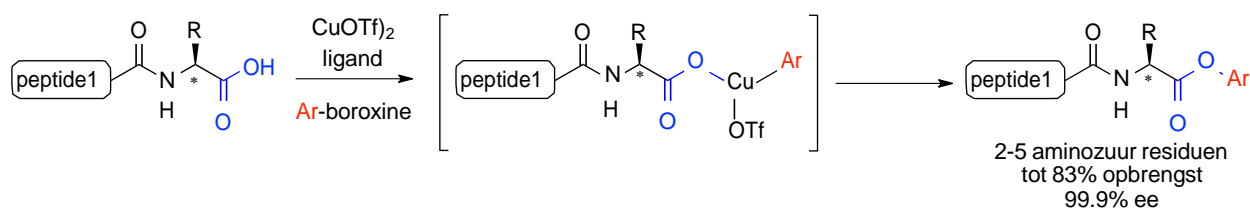
**Scheme 2.** a) C-Terminale racemisatie voorafgaand aan cyclisatie en b) enantiozuivere synthese van homodiketopiperazinen.

De optimale geometrie van *cyclo*([Phe[βAla])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 amino zuur vermeden, doordat in dit door koper(II)triflaot gekatalyseerde 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.

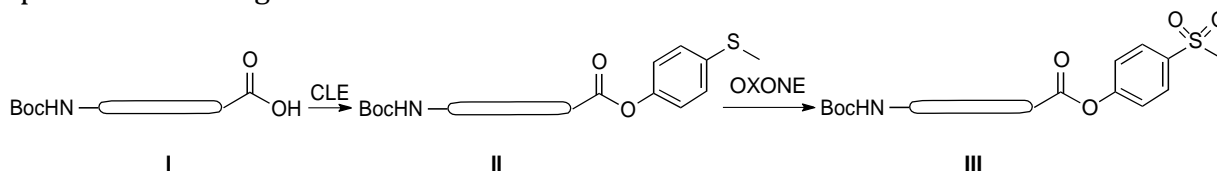


**Schema 3.** Chan-Lam-Evans type vorming van peptide-esters

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*4CPBA. Specifieke substraten met het C[terminale amino zuur fenyglycine (Phg), dat extreem gevoelig is voor epimerisatie, konden via deze methode ook omgezet worden in geactiveerde esters in goede opbrengst en uitmuntende stereochemische zuiverheid (Schema 4).

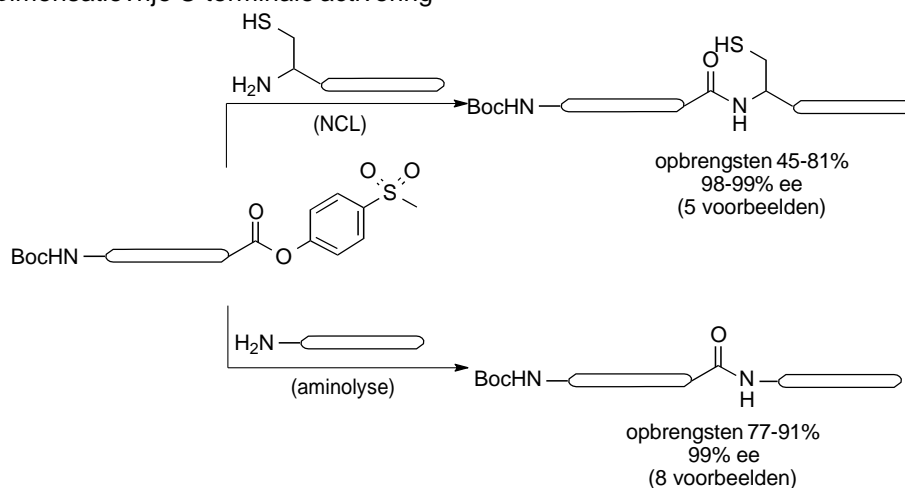
Het gebruik van 4[(methylsulfonyl)fenyl peptide[esters in zowel C[terminale verlenging[ als cyclisatiereacties wordt beschreven in hoofdstuk 4, waarbij extra aandacht gaat naar de stereo [integriteit van deze reacties. De voorbeelden van peptideverlengingsreacties behelzen onder andere: 1) NCL[reacties 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.

Peptidevorming werden uitgevoerd in droge THF, waarbij ofwel een base, of een overmaat van een vrij amine aan de actieve aryylester 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.



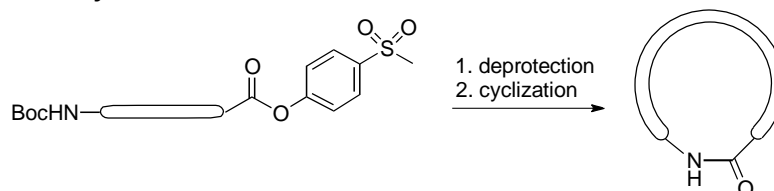
reactie	I	II	II	III	III
		opbrengst(%)	de (%)	opbrengst(%)	de (%)
1	Boc-Phe-Phe-OH	77	99.9	97	99.9
2	Boc-Phe-D-Phe-OH	75	99.9	kwant.	99.9
3	Boc-Phe-Phg-OH	70	99.9	kwant.	99.9
4	Boc-Phe-D-Phg-OH	73	99.9	95	99.9

**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 behelste.



reactie	product	opbrengst (%)	ee (%)
1	<i>cyclo</i> (-βAla-Phe-)	55	99
2	<i>cyclo</i> (-βAla-D-Phe-)	55	99
3	gramicidine S, <i>cyclo</i> (-D-Phe-Pro-Val-Orn-Leu-)2	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 in 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 elektronarme 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 oxidatiegevoelige 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 lactamiseringsreactie, meer onderzoek op dit gebied rechtvaardigt.