



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Chemical tools to monitor and control human proteasome activities

Bruin, G. de

### Citation

Bruin, G. de. (2016, June 1). *Chemical tools to monitor and control human proteasome activities*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/39834>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/39834>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/39834> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Bruin, G. de

**Title:** Chemical tools to monitor and control human proteasome activities

**Issue Date:** 2016-06-01

## Samenvatting

Dit proefschrift beschrijft de ontwikkeling van nieuwe chemische tools om proteasoom activiteit te kunnen beïnvloeden en zichtbaar te maken. Proteasomen zijn grote eiwit complexen met meerdere katalytische activiteiten die verantwoordelijk zijn voor de afbraak van 80-90% van de eiwitten in eukaryotische cellen. Een eiwit dat afgebroken moet worden, wordt gelabeld met meerdere ubiquitine moleculen die vervolgens worden herkend door proteasomen. Eenmaal ter plaatse aangekomen wordt de ubiquitine-keten verwijderd, waarna het eiwit wordt ontvouwen en afgebroken door de verschillende proteolytische activiteiten in het proteasoom. Alle cellen bevatten zogeheten constitutieve proteasomen (cCPs), welke drie verschillende katalytisch actieve eenheden bevatten, namelijk  $\beta 1c$  (caspase-achtig, knipt na zure aminozuren),  $\beta 2c$  (trypsine-achtig, knipt na basische aminozuren) en  $\beta 5c$  (chymotrypsine-achtig, knipt na hydrofobe aminozuren). Proteasomen breken eiwitten af tot korte peptiden, die verder in de cel afgebroken worden tot losse aminozuren. Een klein deel van de peptiden wordt aan de buitenkant van de cel gepresenteerd aan het immuunsysteem. Dit proces wordt ook wel antigeen-presentatie genoemd. Het immuunsysteem herkent lichaamsvreemde peptiden op de buitenkant van de cel en kan hiertegen een immuunreactie opwekken. Immune cellen en cellen die blootgesteld zijn aan bepaalde ontstekingsfactoren (cytokinen) brengen ook immunoproteasomen (iCPs) tot expressie. In immunoproteasomen zijn  $\beta 1c$ ,  $\beta 2c$  en  $\beta 5c$  vervangen door  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  en  $\beta 5i$ . Peptiden die door immunoproteasomen worden geproduceerd, ondergaan verbeterde antigeen-presentatie. Op deze manier speelt het proteasoom een belangrijke rol in het immuunsysteem. Naast constitutieve- en immunoproteasomen bestaan er ook proteasomen waarin eenheden van beide typen in voorkomen, zogenaamde gemengde proteasomen (mCPs). Remming van het proteasoom is cytotoxisch voor sommige tumorcellen en zou (auto)-immuun ziekten kunnen onderdrukken. Om deze redenen is het proteasoom een belangrijk doelwit voor medicijn ontwikkeling binnen de oncologie en de immunologie. Op dit moment worden verschillende proteasoom remmers gebruikt en ontwikkeld voor de behandeling van multipel myeloom (ziekte van Kahler) en mantelcel lymfoom. Ook zijn er immunoproteasoom selectieve remmers in de klinische testfase voor de behandeling van auto-immuun ziekten. Tijdens de

ontwikkeling van deze medicijnen werden de  $\beta$ 5 eenheden beschouwd als de belangrijkste katalytische activiteiten die geremd moeten worden. Echter, het is gebleken dat deze medicijnen ook de andere eenheden (gedeeltelijk) remmen. De laatste jaren heeft onderzoek uitgewezen dat het remmen van ander katalytische actieve eenheden tumorcellen gevoeliger maakt voor  $\beta$ 5 remming en dat dit resistentie tegen proteasoom remmers kan overwinnen. Om deze reden en ook met het doel om de rol van elk type eenheid in de afbraak van eiwitten en antigen-presentatie te kunnen bestuderen, wordt er veel onderzoek gedaan naar eenheid-selectieve proteasoom remmers. Veel proteasoom remmers bestaan uit een elektrofiële val, die covalent aan het katalytische actieve residu van de proteasoom eenheid bindt, en een peptide sequentie, die zorgt voor herkenning en initiële binding van de remmer aan de eenheid. Hiermee samenhangend is er ook veel interesse in methoden die het gelijktijdig meten van alle proteasoom katalytische activiteiten mogelijk maken. Zulke methoden zouden de ontwikkeling van eenheid selectieve remmers en het bepalen van de samenstelling van proteasomen in cellijnen en (zieke) weefsels kunnen ondersteunen en bevorderen. Dit proefschrift beschrijft de ontwikkeling van verschillende eenheid selectieve remmers en 'activity-based probes' (ABPs). De ABPs beschreven in dit proefschrift zijn fluorescent gelabelde verbindingen die covalent en onomkeerbaar binden aan een katalytische actieve eenheden, waardoor de katalytische actieve eenheden zichtbaar gemaakt kunnen worden. Verder beschrijft dit proefschrift een methode om, gebruikmakende van eenheid selectieve ABPs, de activiteit van alle katalytisch actieve constitutieve- en immunoproteasoom eenheden gelijktijdig te kunnen meten. Ook wordt er een methode beschreven om de samenstelling van proteasomen te kunnen bestuderen met als doel om gemengde proteasomen aan te kunnen tonen. De tools die voort zijn gekomen uit het onderzoek beschreven in dit proefschrift kunnen worden gebruikt om zowel de rol van elke katalytisch actieve eenheid als de rol van gemengde proteasomen te bestuderen in bijvoorbeeld antigen-presentatie en kanker. De selectieve remmers kunnen mogelijk gebruikt worden als leidende structuren voor het ontwikkelen van medicijnen voor verdere behandeling van kanker en auto-immuun ziekten.

In **hoofdstuk 1** wordt het katalytische mechanisme van eiwit afbraak door het proteasoom en het concept en mechanisme van proteasoom remmers besproken. In **hoofdstuk 2** wordt een overzicht gegeven van alle mogelijke methoden om proteasoom activiteit te meten. Deze methoden zijn gebaseerd op de hydrolyse van substraten of op het gebruik van ABPs. De methoden zijn en worden gebruikt in de zoektocht naar nieuwe proteasoom remmers, voor het bepalen van proteasoom activiteit en voor het geven van inzicht in de samenstelling van proteasomen.

**Hoofdstuk 3** beschrijft de ontwikkeling van een methode om alle zes de katalytische activiteiten van humane constitutieve- en immunoproteasomen gelijktijdig te kunnen meten. Een cocktail van drie ABPs is samengesteld, elk uitgerust met een verschillende fluorescente groep, en met als doelwit  $\beta 1c/\beta 1i$  (Cy5-NC-001),  $\beta 2c/\beta 2i$  (BODIPY(FL)-LU112) of  $\beta 5c/\beta 5i$  (BODIPY(TMR)-NC-005). Op SDS-PAGE verschaftte deze cocktail volledige scheiding van alle humane (immuno)-proteasoom eenheden die gemodificeerd waren met deze ABPs. Deze methode maakt het snel screenen van mogelijk proteasoom remmers mogelijk evenals het snel bepalen van de relatieve hoeveelheid van de zes katalytisch actieve eenheden in cellijnen of monsters afkomstig van patiënten. Door gebruik te maken van deze methode werd aangetoond dat kwaadaardige bloedcellen voornamelijk immunoproteasoom eenheden tot expressie brengen. Dit in tegenstelling tot bijvoorbeeld multipel myeloom cellijnen die ongeveer gelijke hoeveelheden van constitutieve- en immunoproteasoom eenheden tot expressie brengen. Gebaseerd op deze observatie werden acute lymfatische leukemie (ALL) cellen afkomstig van patiënten behandeld met een combinatie van  $\beta 5i$  en  $\beta 1i$  selectieve remmers, wat zeer cytotoxisch bleek te zijn. Hieruit kan geconcludeerd worden dat het selectief remmen van het immunoproteasoom een goede strategie kan zijn om bijwerkingen van proteasoom remmers te verminderen, omdat de meeste lichaamcellen lage of geen immunoproteasoom expressie hebben.

**Hoofdstuk 4** beschrijft een systematische analyse van de substraat specificiteit van humane constitutieve- en immunoproteasomen en gist proteasomen. Voor deze studie werden 18 oligopeptiden uitgerust met een epoxyketon als elektrofiel val gesynthetiseerd. Op de eerste positie ten opzichte van het epoxyketon (P1) werden alanine (Ala), leucine (Leu), asparagine zuur (Asp), glutamine zuur (Glu), fenylalanine (Phe), tyrosine (Tyr), isoleucine (Ile) of valine (Val) ingebouwd; op P2 Ala of Leu; op P3 proline (Pro) of Leu. Gist proteasoom kristallen werden behandeld met deze remmers en kristal structuren werden bepaald. Deze studie verschaftte nuttige inzichten in de substraat specificiteit van humane proteasoom eenheden en leverde ontwerp parameters op voor nieuwe eenheid selectieve remmers. Een van de verrassende vindingen was dat alle eenheden Val en Ile op P1 niet tolereren. Verder werd gevonden dat gist  $\beta 1$  en humane  $\beta 1c$  Asp op P1 prefereren boven Glu. Zoals verwacht, als gevolg van mutaties in  $\beta 1i$  ten opzichte van  $\beta 1c$ , geeft  $\beta 1i$  de voorkeur aan hydrofobe residuen op P1 (Phe of Leu). Ook verschaftte deze studie een verklaring voor de  $\beta 1$  selectiviteit van remmers met Pro op P3. Verder werd gevonden dat Ala op P1 in combinatie met Leu op P3 zorgt voor  $\beta 5c$  selectiviteit en dat Glu op P1 in combinatie met Leu op P3 resulteert in  $\beta 2c$  selectiviteit.

**Hoofdstuk 5** beschrijft het ontwerp en de synthese van verbeterde  $\beta$ 1i en  $\beta$ 5i selectieve remmers. Gebaseerd op de kristalstructuren van constitutieve proteasomen en immunoproteasomen van de muis in complex met de  $\beta$ 5i selectieve remmer PR-957 werd de hypothese gesteld dat het inbouwen van grotere groepen op P1 zou leiden tot verbeterde  $\beta$ 5i selectiviteit. Een kleine bibliotheek van verbindingen gebaseerd op PR-957 (P1: Phe) met grote residuen op P1 werd gesynthetiseerd. De verbinding met cyclohexylalanine (Cha) op P1 liet een vijfvoudige toename in selectiviteit zien ten opzichte van PR-957. Het inbouwen van Cha op P1 in PR-924 (een andere  $\beta$ 5i selectieve remmer) resulteerde in de meest selectieve  $\beta$ 5i remmer top op heden bekend (LU-015i). In een gerelateerde studie werden analogen van de  $\beta$ 1 selectieve remmer NC-001 gesynthetiseerd. Eerst werden verschillende Pro analogen ingebouwd op P3, wat leidde tot de ontdekking dat 4,4-F<sub>2</sub>-Pro  $\beta$ 1i selectiviteit induceert. Tijdens de ontwikkeling van  $\beta$ 5i selectieve remmers werd gevonden dat verbindingen met Phe en vooral Cha op P1 selectief waren voor  $\beta$ 1i ten opzichte van  $\beta$ 1c. Het combineren van deze vindingen leidde tot de zeer selectieve en potente  $\beta$ 1i remmer met Cha op P1 en 4,4-F<sub>2</sub>-Pro op P3 (LU-001i).

In **hoofdstuk 6** worden de  $\beta$ 1i en  $\beta$ 5i selectieve remmers uit hoofdstuk 5 als uitgangspunt genomen voor de ontwikkeling van  $\beta$ 1i en  $\beta$ 5i selectieve ABPs. LU-001i bevatte al een azide functionaliteit en kon daardoor gemakkelijk omgezet worden tot Cy5-LU-001i, door middel van een koper gekatalyseerde azide-alkyn cycloadditie reactie ('click' chemie) met Cy5 alkyne. LU-015i bevatte geen azide en daarom werd er een N-terminale azide ingebouwd, gevolgd door een click-reactie met een fluorofoor. Dit resulteerde echter in ABPs met lage selectiviteit. Daarom werd er een Cy5 fluorofoor op de P2 positie van LU-015i ingebouwd. Dit resulteerde in de potente en  $\beta$ 5i selectieve ABP Cy5-LU-015i. Zowel Cy-LU-001i als Cy5-LU-015i kunnen gebruikt worden om selectief  $\beta$ 1i respectievelijk  $\beta$ 5i te modificeren, zonder dat de andere eenheden gelabeld worden.

**Hoofdstuk 7** beschrijft de ontwikkeling van selectieve  $\beta$ 5c remmers. In deze studie werden verschillende grote aminozuren op P3 ingebouwd in de verder onveranderde N<sub>3</sub>Phe-xxx-Leu-Leu-EK sequentie. De verbinding met Cha op P3 bleek een laag nanomolaire  $\beta$ 5c remmer te zijn met een tienvoudige selectiviteit voor  $\beta$ 5c ten opzichte van  $\beta$ 5i. Enkele andere verbindingen bleken ook  $\beta$ 5c selectief te zijn, maar deze waren veel minder potent. Zoals beschreven in hoofdstuk 4 wordt Ala op P1 getolereerd door  $\beta$ 5c maar niet door  $\beta$ 5i. Daarom werd een serie verbindingen gemaakt met Ala op P1 en grote aminozuren op P3. De verbinding met Cha op P3 en Ala op P1 liet zeer hoge  $\beta$ 5c selectiviteit zien, hoewel  $\beta$ 2c/ $\beta$ 2i ook geremd werden. Deze verbindingen lieten ook zien dat biphenylalanine (BiPhe) op P3 niet getolereerd wordt door  $\beta$ 2c/ $\beta$ 2i. Daarom werd bicyclohexylalanine (BiCha) (gesynthetiseerd door hydrogenatie van BiPhe, resulterend in een mengsel van *cis/trans*-

isomeren) ingebouwd op P3 met Ala op P1. Deze verbinding (LU-005c) liet zeer hoge  $\beta$ 5c selectiviteit zien, maar bleek helaas niet bruikbaar in levende cellen. Als gevolg van de zeer hydrofobe eigenschappen kan LU-005c waarschijnlijk de celmembraan niet passeren. Substitutie van de N-terminale  $N_3$ Phe door Leu, gevolgd door koppeling van 2-morpholinoacetaat als N-cap resulteerde in LU-015c. Hoewel LU-015c minder selectief bleek dan LU-005c, was LU-015c wel beter cel permeabel en kan deze verbinding gebruikt worden om  $\beta$ 5c volledig te remmen zonder dat de andere eenheden beïnvloed worden in zowel levende cellen als in cel extracten. Op de P2 positie van LU-015c werd een BODIPY(FL) fluorofoor ingebouwd, wat resulteerde in een ABP (BODIPY(FL)-LU-015c) die selectief is voor  $\beta$ 5c ten opzichte van  $\beta$ 5i, hoewel  $\beta$ 2c/ $\beta$ 2i ook gedeeltelijk gemodificeerd werden door deze ABP.

**Hoofdstuk 8** beschrijft de ontwikkeling van een potente en zeer selectieve  $\beta$ 1c remmer. Vanuit de systematische studie beschreven in hoofdstuk 4 werd het duidelijk dat  $\beta$ 1c selectief kan worden geremd door de P1 Asp bevattende verbinding Ac-PAD-EK. Deze verbinding was echter niet heel potent en daarom voor verbetering vatbaar. Om dit te bewerkstelligen werd Asp ingebouwd op P1 in de geoptimaliseerde sequentie van de  $\beta$ 1 selectieve remmer NC-001, wat resulteerde in de selectieve en veel potentere verbinding LU-001c (20x potenter dan Ac-PAD-EK). Deze verbetering kan verklaard worden door de aanwezigheid van een P4 residu (Ala) en een verlengd P2 residu (norleucine, Nle) in LU-001c vergeleken met Ac-PAD-EK (geen P4 residu en Ala op P2). Deze extra groepen bieden mogelijk extra interacties tussen de remmer en de  $\beta$ 1c eenheid waardoor de remmer beter gestabiliseerd wordt. LU-001c is negatief geladen bij fysiologische pH en daarom niet cel permeabel. LU-001c is uitgerust met een N-terminale azide groep en kon daarom gemakkelijk omgezet worden in een ABP door een 'click' reactie met BODIPY(FL)-alkyn. De resulterende ABP (BODIPY(FL)-LU-001c) kon gebruikt worden om  $\beta$ 1c volledig te labelen zonder dat andere eenheden gemodificeerd worden.

De aanwezigheid van een basisch residu op P1 of P1 en P3 in proteasoom remmers resulteert in  $\beta$ 2c/ $\beta$ 2i selectiviteit. LU-102 (P1: 4-aminomethylfenylalanine) is de meest potente en cel permeabele  $\beta$ 2c/ $\beta$ 2i selectieve remmer die bekend is. LU-102 is echter 30 keer minder potent in levende cellen vergeleken met zijn activiteit in cellysaat. Dit kan waarschijnlijk verklaard worden door de positieve lading van de benzylamine groep die slechte membraan permeabiliteit veroorzaakt. Het inbouwen van basische groepen met een  $pK_a$  dicht bij de fysiologische pH zal vermoedelijke resulteren in verbindingen met verbeterde cel permeabiliteit. **Hoofdstuk 9** beschrijft de synthese en evaluatie van verbindingen met verschillende lysine analogen met verlaagde  $pK_a$  waarden op P1 en/of P3. Ook werd histidine ingebouwd op P1. Allylisch ( $pK_a$  9.7) en propargylisch ( $pK_a$  8.9)  $\epsilon$ -amine lysine analogen werden gesynthetiseerd via de chirale fase transfer gekatalyseerde

alkylering van een glycine-gebaseerde template. De meeste gesynthetiseerde verbindingen waren  $\beta 2c/\beta 2i$  selectief, echter alle verbindingen waren veel minder potent dan LU-102. Interessant genoeg lieten zowel de P1 allylisch amine als propargylisch amine bevattende verbindingen vergelijkbare potentie zien, wat er op wijst dat lagere  $pK_a$  waarden wel getolereerd worden door  $\beta 2c/\beta 2i$ . Dat deze verbindingen zoveel minder potent zijn kan waarschijnlijk verklaard worden door de kortere afstand tussen de amine en het  $\alpha$ -koolstof atoom in de lysine analogen vergeleken met arginine in de eerste generatie  $\beta 2c/\beta 2i$  selectieve remmers en de benzylamine groep in LU-102.

Wanneer cellen zowel constitutieve- als immunoproteasoom eenheden tot expressie brengen worden niet alleen zuivere cCPs en iCPs gevormd, maar ook proteasomen die beide type eenheden bevatten. Deze zogenaamde gemengde proteasomen (mCPs) zijn aangetoond in verschillende weefsels. In **hoofdstuk 10** wordt een nieuwe methode beschreven die inzicht geeft in de samenstelling van proteasomen in cellysaat. Omdat de afstand tussen de katalytisch actieve eenheden klein genoeg is kan er fluorescentie resonantie energie transfer (FRET) plaatsvinden tussen FRET donor en acceptor ABPs die gebonden zijn aan verschillende actieve eenheden. Proteasomen blijven intact wanneer een cel extract wordt gescheiden op native PAGE en FRET signalen kunnen zichtbaar gemaakt worden door het fluorescent scannen van de gel. Het optimale FRET donor-acceptor paar voor deze toepassing bleek BODIPY(FL) als donor en Cy5 als acceptor te zijn. Dit FRET-paar liet een FRET efficiëntie zien van bijna 100% en minimale achtergrond. Een set van tien ABPs, uitgerust met BODIPY(FL) of Cy5 en selectief voor  $\beta 1c/\beta 2i$ ,  $\beta 2c/\beta 2i$ ,  $\beta 5c/\beta 5i$ ,  $\beta 1c$ ,  $\beta 1i$ ,  $\beta 5c$  of  $\beta 5i$  werd ontwikkeld (zoals beschreven in de voorgaande hoofdstukken). Deze set van ABPs werd aangevuld met vijf eenheid selectieve remmers (selectief voor  $\beta 1c$ ,  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$ ,  $\beta 5c$  of  $\beta 5i$ ). Met behulp van deze selectieve remmers kunnen acht verschillende eenheid-paren worden geremd, wanneer twee van deze remmers tegelijkertijd worden gebruikt. Door steeds een geschikt FRET ABP paar en twee selectieve remmers te selecteren kunnen FRET signalen van acht verschillende eenheid paren verkregen worden. Bijvoorbeeld, wanneer een monster eerst behandeld wordt met een  $\beta 1c$  en  $\beta 5i$  selectieve remmer en vervolgens met een FRET ABP paar selectief voor  $\beta 1c/\beta 1i$  en  $\beta 5c/\beta 5i$ , dan worden alleen  $\beta 1i$  en  $\beta 5c$  gelabeld. Wanneer nu een FRET signaal verkregen wordt, dan duidt dit op de aanwezigheid van  $\beta 1i/\beta 5c$  bevattende proteasomen. Proteasomen bevatten twee  $\beta$ -ringen waarvan de samenstelling niet noodzakelijk hetzelfde hoeft te zijn. Proteasomen die verschillende  $\beta$ -ringen bevatten worden ook wel asymmetrische gemengde proteasomen ( $m_a$ CPs) genoemd. Gebruikmakend van  $\beta 1c$ ,  $\beta 1i$ ,  $\beta 5c$  en  $\beta 5i$  selectieve ABPs konden proteasomen die asymmetrisch zijn wat betreft de samenstelling van de  $\beta 1$  en  $\beta 5$  eenheden zichtbaar gemaakt worden. Bijvoorbeeld, wanneer een monster behandeld wordt met een  $\beta 1c$  selectieve donor ABP en

$\beta$ 1i selectieve acceptor ABP en er wordt een FRET signaal waargenomen, dan duidt dit op proteasomen die asymmetrisch zijn wat betreft de  $\beta$ 1 eenheden. De native PAGE FRET methode is gebruikt om de proteasoom samenstelling van het extract van Raji cellen, die continue alle zes katalytische eenheden tot expressie brengen, te analyseren. Verder is ook het extract van HeLa cellen, die voornamelijk constitutieve proteasoom eenheid tot expressie brengen, geanalyseerd en vergeleken met het extract van HeLa cellen waarin immunoproteasoom eenheid expressie was geïnduceerd door blootstelling aan IFN- $\gamma$  gedurende 24 uur. Hoewel Raji cellen en IFN- $\gamma$  behandelde HeLa cellen vergelijkbare ratio's van constitutieve- en immunoproteasoom eenheden tot expressie brengen, waren de relatieve FRET signalen afkomstig van mCPs in Raji cel extract significant hoger. Dit wijst erop dat na inductie van immunoproteasoom expressie voornamelijk iCPs worden gevormd, terwijl in cellen die continue alle zes de eenheden tot expressie brengen meer mCPs gevormd worden.

Vergeleken met bortezomib heeft het recent goedgekeurde (door de FDA) medicijn ixazomib een hoge off-rate voor  $\beta$ 5c en  $\beta$ 5i (zie hoofdstuk 3). Deze eigenschap ligt waarschijnlijk ten grondslag aan de sterk verbeterde farmacodynamische en farmacokinetische eigenschappen van ixazomib ten opzichte van bortezomib. Ixazomib heeft een glycine op P2 en dus geen aminozuur zijketen die kan interacteren met de proteasoom eenheid, wat de reden zou kunnen zijn voor de instabiliteit van het ixazomib-proteasoom complex. Alle proteasoom eenheden hebben grote, aan oplosmiddel blootgestelde S2-pockets. Dit leidde tot de vraag of grote sterische groepen op P2 de binding van boorzuur bevattende proteasoom remmers zou kunnen beïnvloeden. In **hoofdstuk 11** wordt het inbouwen van adamantylalanine en carboranylalanine op de P2 positie van bortezomib beschreven. Carboranen worden beschouwd als 'super-aromatisch', zijn zeer hydrofoob en zijn toegepast als fenyl-groep isosteren. Daarnaast worden carboranen momenteel onderzocht in boor-neutronenvangst therapie (BNCT), een mogelijk anti-kanker therapie. Voor beide aminozuren is een nieuwe enantioselectieve synthese ontwikkeld die gebruik maakt van Ellman's N-*tert*-butylsulfonamide als chiraal hulpmiddel, met als cruciale stap een asymmetrische Strecker reactie. Beide aminozuren werden gesynthetiseerd als Fmoc bouwstenen met goede opbrengsten en in hoge enantiomere overmaat. Het inbouwen van deze aminozuren op de P2 positie resulteerde in adamantezomib en carbortezomib. Beide remmers lieten een met bortezomib overeenkomende proteasoom remming zien, wat er op wijst dat grote substituenten op P2 worden getolereerd. Hoewel, in tegenstelling tot bortezomib, lieten zowel adamantezomib als carbortezomib (geringe) selectiviteit voor  $\beta$ 1i en  $\beta$ 5i ten opzichte van  $\beta$ 1c en  $\beta$ 5c zien. Daarnaast lieten beide remmers een hogere off-rate zien voor  $\beta$ 5c/ $\beta$ 5i vergeleken met bortezomib, wat er op wijst dat grote substituenten op P2 het  $\beta$ 5 eenheid-

inhibitor complex destabiliseert. Terwijl de off-rate van carbortezomib lager was dan ixazomib, liet adamantezomib een hogere off-rate zien. De off-rate van beide verbindingen bleek hoger voor  $\beta 5c$  dan voor  $\beta 5i$ , wat de selectiviteit voor  $\beta 5i$  verhoogt. Derhalve zou het inbouwen van adamantylalanine of carboranylalanine op P2 een belangrijke design parameter kunnen zijn voor de ontwikkeling van immunoproteasoom selectieve remmers met overeenkomende farmacodynamische en farmacokinetische eigenschappen als ixazomib.