



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Synthesis of cyclic peptides as bioconjugation platforms

Peterse, E.

Citation

Peterse, E. (2021, June 29). *Synthesis of cyclic peptides as bioconjugation platforms*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3192731>

Version: Publisher's Version

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3192731>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <https://hdl.handle.net/1887/3192731> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Peterse, E.

Title: Synthesis of cyclic peptides as bioconjugation platforms

Issue Date: 2021-06-29

Samenvatting

In de jaren 1940 zorgde de ontdekking en isolatie van het antibioticum streptomycine uit de bacterie *Streptomyces griseus* voor een grootschalige zoektocht naar nieuwe bioactieve stoffen uit de natuur. Deze zoektocht leverde een scala aan verbindingen op, waaronder naast antibiotica ook antikanker medicijnen, afweerremmers, antimycotica en anthelminthica. Onder deze moleculen bevindt zich een belangrijke familie van macrocyclische peptiden, welke een keten van aminozuren zijn die een gesloten ring vormen van meer dan twaalf atomen via verbinding van de

zijketens en/of de termini. Antibiotische peptiden hebben voornamelijk gebruik gevonden tegen plaatselijke infecties vanwege verschillende beperkingen voor inwendig gebruik, zoals slechte orale opname of ernstige bijwerkingen. In recente jaren is er met hernieuwde interesse naar cyclische peptiden gekeken als potentiële geneesmiddelen en zijn er meerdere nieuwe macrocyclische peptiden klinisch onderzoek belandt. Een andere toepassing die cyclische peptiden hebben gevonden is als multifunctioneel platform waarin het peptide zorgt voor een structureel motief waaraan verschillende moleculaire entiteiten kunnen worden vastgemaakt.

Hoofdstuk 1 behandelt de voornaamste strategieën die zijn toegepast om cyclische peptiden te synthetiseren waarvan de moeilijkste stap de macrocyclisatie is. Ter illustratie worden de synthese van enkele bioactieve peptiden besproken die gebruikmaken van deze strategieën. Daarnaast wordt de toepassing van cyclische peptiden als multifunctioneel platform bediscussieerd en worden er representatieve voorbeelden gegeven.

Bij het vastmaken van de lysine ϵ -amines of ornithine δ -amines aan vaste dragers wordt in het algemeen gebruik gemaakt van een geactiveerde electrofiele vaste drager, welke vatbaar is voor degradatie. **Hoofdstuk 2** beschrijft de totstandkoming van een methode om de zijketen van lysines en ornithines te verankeren aan een nucleofiele hydroxymethylfenyloxy (Wang) linker op een TentaGel vaste drager door middel van een urethaan verbinding. Wanneer deze verbinding vergeleken wordt met de standaard C-terminale verankering blijven de eigenschappen van de linker hetzelfde en kan het amine worden verlost van de vaste drager met de gebruikelijke behandeling met trifluorazijnzuur, waarbij ook koolstofdioxide gevormd wordt. De beschreven methode omvat de formatie van een isocyanaat, welke verkregen kan worden door de *N*-Boc urethaan te reageren met een dehydraterend reagens. Dibutyltin dilauraat en zirconium(IV) acetylacetaat bleken de koppeling tussen het isocyanaat en de vaste drager efficiënt te katalyseren. Deze methode werd vervolgens gebruikt om vier verschillende cyclische peptiden te synthetiseren waarvan de opbrengsten en zuiverheid vergelijkbaar waren met eerder beschreven methodes.

Er zijn recentelijk bevindingen gerapporteerd waar de versterkende werking tussen diverse (geconjugeerde) Toll-like receptor (TLR) liganden is onderzocht. **Hoofdstuk 3** beschrijft de synthese van een platform dat bedoeld

is om de invloed van de ruimtelijke ordening van een paar van TLR-liganden op de immunogeniciteit te onderzoeken. Er is gebruik gemaakt van het cyclodecapeptide gramicidine S, dat zijn aminozuur zijketens aan de tegenovergestelde kanten presenteert dankzij zijn secundaire structuur. Drie verschillende gramicidine S structuren zijn gesynthetiseerd die van elkaar verschillen in dat ze hun twee amine functionaliteiten in verschillende richtingen positioneren. De amines zijn uitgerust met een maleimide- en een BCN-groep om een snelle en schone conjugatie met TLR-liganden te kunnen bewerkstelligen. TLR2, 7 en 9 agonisten zijn gesynthetiseerd die uitgerust zijn met de complementaire reactieve groep (thiol of azide) voor een totaal van negen verschillende combinaties van liganden en oriëntaties. Om het mogelijk te maken de BCN-groep, die een gespannen alkyne bevat, te introduceren op de vaste drager is de methode die beschreven is in Hoofdstuk 2 uitgebreid naar de extreem zuurgevoelige TentaGel S AC hars en is de methode om de peptide van de vaste drager te verwijderen en te zuiveren geoptimaliseerd.

Hoofdstuk 4 beschrijft de uitbreiding van het platform beschreven in Hoofdstuk 3 om het presenteren van drie verschillende TLR-agonisten mogelijk te maken. De keuze voor tetrazine/norborneen ligatie is gemaakt voor de introductie van het derde ligand welke leidde tot de nodige aanpassingen in het originele ontwerp. The BCN-groep werd vervuild voor de loggere DBCO-groep om kruisreacties van de tetrazine te voorkomen. Twee gramicidine S platforms zijn gesynthetiseerd met drie amine functionaliteiten in verschillende oriëntaties. De norborneen- en DBCO-groepen zijn geïnstalleerd op de vaste drager waarvoor een extra beschermgroep nodig was tijdens de peptide synthese. De trifluoroacetamide groep bleek een effectieve beschermgroep en kon ontschermd worden na behandeling van ammonia in methanol op hogere temperaturen en met behulp van microgolfbestraling. Om gebruik te kunnen maken van de derde ligatiemethode was er een TLR7-ligand gesynthetiseerd die uitgerust was met een tetrazine en was er een adapter molecuul gesynthetiseerd voor de TLR9-agonist. Met deze moleculen zijn er drie verschillende combinaties van liganden en oriëntaties mogelijk.

Hoofdstuk 5 beschrijft de synthese van een fusie eiwit door middel van een chemische conjugatie strategie. Een linker systeem is ontworpen dat de focus

legde op het functionaliseren van het eiwit in een zo laat mogelijk stadium. Anti-PD1 en anti-CD4 VHH antilichamen zijn genetisch gemodificeerd met een C-terminale cysteïne als aangrijppunt voor de conjugaties en deze antilichamen waren verkregen in goede opbrengsten. Een linker systeem bestaande uit twee componenten zijn gesynthetiseerd voor de fusie van de twee antilichamen. De ene linker bestond uit een iodoacetamide groep voor de conjugatie met het cysteïne residue en een azidegroep voor een SPAAC reactie. De complementaire linker was uitgerust met een maleimide groep die kan reageren met de thiol aanwezig op het antilichaam en de gespannen cycloalkyn BCN als tegenhanger van de azide. De linkers bleken succesvol geconjugerd aan anti-PD1 VHH antilichamen en een testligatie tussen de alkyn en azide is uitgevoerd waarin de vorming van het fusie eiwit was geobserveerd.

Aansluitend op de inleiding en de vier experimentele hoofdstukken biedt het proefschrift tenslotte een blik naar de toekomst, in het licht van de behaalde en beschreven resultaten, en waarin – nu de constructen en bioorthogonale platforms gereed zijn – kort aangestipt wordt voor welk type bioconjugaten, en in het verlengde daarvan voor welk biologisch onderzoek dan wel biomedische toepassingen, het onderzoek beschreven in dit proefschrift van nut zou kunnen zijn.