



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Inverse electron demand Diels-Alder pyridazine elimination: synthetic tools for chemical immunology

Geus, M.A.R. de

Citation

Geus, M. A. R. de. (2021, October 7). *Inverse electron demand Diels-Alder pyridazine elimination: synthetic tools for chemical immunology*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3215037>

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/1887/3215037>

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

Nederlandse samenvatting

Chemische strategieën hebben de opheldering van nieuwe elementen van de biologie mogelijk gemaakt door nauwkeurige controle uit te oefenen op processen in cellen en zelfs in hele organismen. Dit is mogelijk dankzij bio-orthogonale chemie: reacties die gemakkelijk en selectief optreden onder fysiologische omstandigheden zonder te interfereren met natuurlijke biochemische processen. De ‘inverse electron demand Diels-Alder’ (IEDDA) pyridazine eliminatie ontstond in 2013 als een nieuwe bio-orthogonale reactie en vormt een goed voorbeeld van wat nu bekend staat als dissociatieve bio-orthogonale chemie. Het onderzoek dat in dit Proefschrift wordt beschreven, beoogt om synthetische strategieën te ontwikkelen die het mogelijk maken om de IEDDA pyridazine eliminatie als een veelzijdige ‘toolbox’ te benutten in de chemische biologie. Zo beschrijft het de modificatie van antigene (MHC-I) peptiden en (CD1d) glycolipiden met een *trans*-cyclo-octeen (TCO) om chemische controle over de herkenning van deze biomoleculen door immuuncellen mogelijk te maken. Synthetische vorderingen die de volledige reikwijdte van de IEDDA pyridazine eliminatie omvatten, worden aanvullend beschreven.

Hoofdstuk 1 introduceert de IEDDA pyridazine eliminatie in de context van dissociatieve bio-orthogonale chemie. Mechanistische aspecten van de reactie worden besproken, evenals verschillende toepassingen waar deze techniek voor is gebruikt. Een overzicht van andere nieuwe bio-orthogonale reacties, waarbij eveneens covalente bindingen worden verbroken, wordt gepresenteerd.

Hoofdstuk 2 beschrijft een geoptimaliseerde synthese van een bifunctioneel TCO-reagens dat veelvuldig is toegepast voor ‘click to release’ chemie. Een belangrijke wijziging van bestaande literatuurprocedures is de kristallisatie van een iodolacton intermediair na initiële functionalisatie van 1,5-cyclo-octadieen. Transesterificatie van het bicyclische lacton werd vervangen door een één pot, twee-staps verzeping-methylering procedure om de gewenste methyl ester te verkrijgen. Foto-isomerisatie leverde een mengsel van twee TCO isomeren op, dat kon worden gescheiden na een selectieve verzepingsreactie van de axiale isomeer. N-hydroxysuccinimide (NHS) functionalisatie van deze isomeer werd versneld met behulp van nucleofiele katalyse. De equatoriale isomeer werd na NHS functionalisatie onderworpen aan een *trans*-naar-*cis* isomerisatie om het corresponderende *cis*-cyclo-octeen reagens te verkrijgen. Het bifunctionele TCO reagens werd eveneens uitgerust met een EDANS-fluorofoor en een

DABCYL-quencher om een fluorogene ‘TCO-reporter-quencher’ te verkrijgen voor kinetische analyse van de IEDDA pyridazine eliminatie.

Hoofdstuk 3 beschrijft de poging tot ontwikkeling van een op ‘Fmoc solid phase peptide synthesis’ (Fmoc SPPS) gebaseerde strategie voor TCO-gemodificeerde peptidesynthese. Een model verbinding, een axiaal, allylisch gesubstitueerde TCO-carbamaat, werd bestudeerd in aanwezigheid van gedeutereerd trifluoroazijnzuur (TFA-D) met behulp van ^1H en ^{13}C nucleaire magnetische resonantie (NMR). De waargenomen stabiliteit onder verdunde TFA concentraties (<10% v/v) werd toegeschreven aan preferentiële protonering op C3 en anchimere assistentie van de carbamaatgroep naar C2 van het verkregen kation. Een Fmoc-Lys(TCO)-OH bouwsteen werd gesynthetiseerd en geïncorporeerd in de SIINFEKL-peptidesequentie op vaste drager. Globale ontscherming van dit peptide leidde tot substantiële TCO-isomerisatie en zelfs carbamaat hydrolyse onder verdunde TFA concentraties (bijvoorbeeld 5% v/v) die wel leken te worden verdragen in de NMR-stabiliteitsexperimenten.

Hoofdstuk 4 beschrijft een nieuwe methode voor *in vitro* en *in vivo* chemische controle van T-cel activatie. MHC-I epitopen werden ontworpen met allyl-gesubstitueerde TCO-modificatie op lysine residuen met de aanname dat deze modificatie de herkenning van dergelijke epitopen door T-cellen zou belemmeren, terwijl de IEDDA pyridazine eliminatie deze herkenning selectief zou kunnen herstellen. In tegenstelling tot de synthetische methode die werd onderzocht in Hoofdstuk 3, werd de MHC-I peptidesequentie gesynthetiseerd met Fmoc SPPS voordat de TCO-groep werd geïnstalleerd. N-terminale bescherming met de base-labiele MSc-groep vóór zure afsplitsing van de peptidesequentie maakte regioselectieve TCO-modificatie van de ϵ -aminogroep van lysine mogelijk. MSc-ontscherming onder basische omstandigheden werd gevolgd door HPLC-zuivering om de gewenste beschermde epitopen te verkrijgen. Lysine-beschermde epitopen van OVA257-264 (OT-I, SIINFEKL) en DbM187-195 (NAITNAKII) vertoonden binding aan MHC-I terwijl T-cel herkenning afwezig was. IEDDA pyridazine eliminatie herstelde effectief de T-cel activatie *in vitro* en *in vivo*. Bovendien werd de ‘click to release’ benadering toegepast om antigeenkruispresentatie te bestuderen met een N-terminaal verlengd epitoom, OVA247-264 (DEVSGLEQLESIINFEKL).

Hoofdstuk 5 beschrijft het ontwerp en de synthese van TCO-beschermde derivaten van α -galactosylceramide (α GalCer) en α -galactosylphytosphingosine (α GalPhs). De zelfadjuverende strategie door Painter, Hermans en collega's, waar een inactieve pro- α GalCer na esterase of protease-activiteit kan omleggen tot α GalCer, vormde de basis voor het ontwerp van deze benadering om chemisch geïnduceerde activatie van ‘invariant natural killer T-cellen’ (iNKTs) te bewerkstelligen. Er werd geredeneerd dat de amino-functionaliteit van α GalPhs zou kunnen worden beschermd als een TCO-carbamaat en dat daaropvolgende acylering met hexacosaanzuur zou resulteren in een

TCO-beschermd pro- α GalCer. De belangrijkste stappen van de synthese waren onder meer een α -selectieve glycosylering onder NIS / TMSOTf activatie, met behulp van een 2,3-TBS-4,6-DTBS-beschermd thiogalactoside donor en een 2-azido-3,4-cyclisch carbonaat beschermd phytosphingosine, gevolgd door hydrogenering, TCO-carbamaat formatie en verzeping. Directe desilylering resulteerde in de TCO-beschermd α GalPhs, terwijl verestering en daaropvolgende ontscherming de TCO-beschermd pro- α GalCer opleverde.

Hoofdstuk 6 beschrijft synthetische methodologie voor de synthese van allylische TCO-ethers gebruikmakende van twee nieuwe reagentia. Een cyclo-octeen-*tert*-butylcarbonaat was ontworpen om CCO-ethers op te leveren na reactie met fenolen onder palladiumkatalyse terwijl Lewis-zuur activering van een cyclo-octeen-trichloroimidaat resulteerde in CCO-ethers uit alifatische alcoholen. Fotochemische isomerisatie van de CCO-ether levert de overeenkomstige TCO-ether op. De activiteit van een nieuwe '*lac* operon' inductor (IPG) werd gemanipuleerd door een TCO-ethergroep aan de 3-OH-positie te bevestigen, waardoor 3-TCO-IPG werd verkregen. Recombinante expressie experimenten in *E. coli* onthulden dat 3-TCO-IPG geen invloed had op de expressieniveaus in afwezigheid van 3,6-dimethyl-tetrazine, terwijl ontscherming van 3-TCO-IPG in aanwezigheid van 3,6-dimethyl-tetrazine in staat was om recombinante eiwitexpressie aan te zetten.

Tot slot beschrijft **Hoofdstuk 7** een gedetailleerde samenvatting van het Proefschrift, waarbij na ieder Hoofdstuk aanbevelingen worden gepresenteerd voor vervolgonderzoek.

