



Naar een algemene synthese strategie voor het genereren van pseudodesmine A analogen

Proefschrift voorgelegd tot het behalen van
de graad van Master in de Chemie door

Matthias De Vleeschouwer

Academiejaar 2010-2011

Promotor: prof. dr. Jose Martins
Copromotor: prof. dr. Annemieke Madder
Begeleiders: Jos Van den Begin en Davy Sinnaeve

Inhoud

Voorwoord	4
Lijst der gebruikte afkortingen	6
Lijst der gebruikte aminozuren.....	8
Hoofdstuk 1: Inleiding en projectschets	9
Hoofdstuk 2: Literatuurstudie	12
2.1 AMP's, CLP's en de viscosine groep.....	12
2.1.1 AMP's	12
2.1.2 CLP's.....	13
2.1.3 De viscosine groep	17
2.1.4 Pseudodesmine	18
2.2 Synthesestrategieën	22
2.2.1 Vasthechting via de zijketen.....	22
2.2.2 Burke, Knight en Chandrasekhar methode.....	24
2.2.3 Stawikowski en Cudic methode	26
2.3 Doelstellingen.....	28
2.3.1 Ontwikkelen van een efficiënte syntheseroute naar analogen van pseudodesmine A.....	28
2.3.2 Onderzoek naar zelfassociatiegedrag van analogen van pseudodesmine A.....	30
Hoofdstuk 3: Gebruikte materialen en methoden.....	31
3.1 Synthese van peptiden op vaste drager.....	31
3.2 De vaste drager	32
3.3 Beschermgroepen	34
3.3.1 Fmoc-beschermgroep voor tijdelijke N ^α -bescherming	34
3.3.2 Bescherming van de zijketens	35
3.3.3 Allyl en Alloc-bescherming	35
3.4 Koppelingsmethoden.....	37
3.4.1 Carbodiimides	37
3.4.2 Actieve esters	37
3.4.3 Koppelingsreagentia.....	38
3.5 Kleurtesten.....	39
3.5.1 TNBS-test.....	40
3.5.2 NF31-test	40
3.5.3 NF31/DMAP-test	40
3.6 Toestelspecificaties	41
3.7 Productspecificaties.....	41
Hoofdstuk 4: Synthese van individuele gemodificeerde bouwstenen	43

4.1 Allyloxycarbonyl beschermd isoleucine (Alloc-Ile)	43
4.1.1 Eerste poging voor synthese van Alloc-Ile.....	43
4.1.2 Tweede poging voor synthese van Alloc-Ile	45
4.1.3 Derde poging voor synthese van Alloc-Ile	45
4.2. Fmoc-D-Gln(NTrt)-OPfp	46
4.3 DZ-OPfp.....	48
Hoofdstuk 5: Testsynthese op kleine schaal.....	49
5.1 Controle van het startmateriaal.....	49
5.2 Koppeling van de gepreactiveerde bouwstenen	50
5.2.1 Ontscherming van Fmoc-D- <i>allo</i> -Thr en koppeling Fmoc-D-Gln(NTrt)-OPfp	51
5.2.2 Ontscherming van Fmoc-D-Gln(NTrt) en koppeling Fmoc-L-Leu-OPfp.....	52
5.2.3 Ontscherming van Fmoc-L-Leu en koppeling DZ-OPfp	54
5.3 Koppeling van Alloc-Ile.....	55
5.3.1 Testpogingen voor koppeling van Alloc-Ile.....	55
5.3.2 Succesvolle koppeling van Alloc-Ile.....	57
5.4 Allyl- en Alloc-ontscherming.....	58
5.4.1 Uittesten van de Allyl-ontscherming	58
5.4.2 Allyl en Alloc-ontscherming van V.8	59
5.5 Cyclisatie.....	60
5.6 Afsplitsing en zuivering	62
5.7 Conclusies	63
Hoofdstuk 6: Synthese van een alternatieve bouwsteen.....	65
6.1 Trt-ontscherming van Fmoc-D-Gln(NTrt)-OH	65
6.2 Activatie van Fmoc-D-Gln-OH.....	66
Hoofdstuk 7: Opschaling en optimalisatie	69
7.1 Geautomatiseerde koppeling van de eerste 6 aminozuren.....	69
7.2 Koppeling van de gepreactiveerde bouwstenen	70
7.3 Testkoppeling van Alloc-Ile: poging tot optimalisatie	72
7.3.1 Eerste poging voor koppeling van Alloc-Ile.....	72
7.3.2 Tweede poging voor koppeling van Alloc-Ile.....	73
7.3.3 Derde poging voor koppeling van Alloc-Ile.....	74
7.4 Koppeling van Alloc-Ile: geoptimaliseerde condities	76
7.5 Allyl en Alloc-ontscherming	78
7.6 Sluiting en afsplitsing.....	79
7.7 Conclusie en discussie.....	83
Hoofdstuk 8: Karakterisatie met NMR.....	84

8.1 Structuuranalyse	84
8.2 Temperatuurstudie in CD ₃ CN.....	88
8.3 Gedrag in apolaire omgeving	89
8.4 Conclusie	91
Hoofdstuk 9: Experimenteel.....	92
Hoofdstuk 10: Conclusie, discussie en perspectieven.....	121
Bibliografie.....	124
English Summary	

Voorwoord

Beste lezer,

Het schrijven van een thesis is voor mij iets zoals het spelen van een finale in een badmintontornooi: je bereikt de laatste fase van iets waar je hard voor gewerkt hebt. De weg die je tot dan toe hebt afgelegd is er reeds een geweest van succes maar ook van vele inspanningen en soms ook eens mindere momenten. In die zin is het thesisjaar dan ook als de laatste wedstrijd die je speelt voor de ultieme bekroning: het behalen van een diploma. Wat de uitslag ook moge zijn, ik ben blij dat ik de finale gehaald heb, iets wat ik niet had durven verhoppen toen ik de middelbare school verliet.

Net als in de sport is het behalen van een mooi resultaat niet enkel te danken aan één persoon maar aan het hele team. Zonder jullie was ik nooit zover geraakt en daarom wil ik alle mensen bedanken die mij de kans gaven om te studeren en voor mij supporterden langs de zijlijn. Hierbij denk ik aan mijn ouders, grootouders en broer. Altijd stonden jullie voor mij klaar.

Vervolgens zou ik graag professoren J. Martins en A. Madder bedanken. Beiden wil ik hen bedanken om het vertrouwen dat ze mij gaven en hun enthousiasme voor het project. Specifiek zou ik José willen danken voor mij warm te maken voor dit boeiende onderwerp. Annemieke wil ik bedanken om steeds te luisteren naar mijn ideeën en vragen, maar ook voor de antwoorden op deze vragen.

Een van de bijzonderheden van deze thesis is dat ik in twee verschillende onderzoeksgroepen heb gewerkt. Mijn thesisjaar bracht ik zowel door in de “synthesegroep” van professor Madder als in de “NMR-groep” van professor Martins. Daarom had ik naast 2 promotoren ook nog 2 mentoren: Jos en Davy. In de ruime zin van het woord ben ik blij dat ik door dit multidisciplinaire onderzoek het beste van twee werelden heb mogen ervaren.

Van Jos heb ik heel veel praktische vaardigheden geleerd, van het onder de knie krijgen van vaste fase chemie tot het ontwerpen van artistieke logo's en invullen van ‘administratieve’ formulieren. Daarnaast vond ik in Jos een begeleider terug waarmee ik op dezelfde golflengte zat voor veel aspecten. Hiermee bedoel ik niet enkel de radiozender in het labo, maar veel meer het vermogen om zowel over ernstige als over dagdagelijkse zaken te praten.

Daarnaast ben ik bijzonder blij dat ik de laatste weken van mijn thesisjaar heb kunnen leren van Davy, de persoon die reeds vele geheimen van pseudodesmine A heeft doorgrond. In die zin voel ik mij vereerd dat ik mij op zijn onderzoeksdomein mocht begeven. In zijn boek en artikels vond ik bovendien heel veel informatie die mij op allerlei manieren hebben geholpen. In hem herkende ik het enthousiasme voor dit onderzoeksitem. Bedankt voor je luisterend oor en goede samenwerking.

Daarnaast ontmoette ik op de werkvloer verschillende interessante personen, daarbij denk ik aan de personen behorende tot de onderzoeksgroep van professor Madder en Martins, maar zeker ook aan deze van professor De Clercq en Hoogenboom. Het was zeer fijn om met jullie de tijd samen door te brengen. Hierbij denk ik in het bijzonder aan personen aanwezig in “labo C” en de “eilandgenoten” in de NMR-groep. Ook bedankt An, Johan, Lieselot, Kurt, Yara, Vicky, Marieke, Ellen, Dieter en Duchan om mij met raad en daad bij te staan tijdens het thesisjaar, zij het door het voeren van een discussie of door het mij verschaffen van artikels en nadere uitleg. Kurt en Davy wil ik daarbij ook expliciet bedanken voor het nalezen van mijn scriptie.

Mijn dank gaat ook uit naar Tim Courtin en Ir. Jan Goeman. Tim wil ik bedanken voor het opnemen van mijn ^{19}F -spectra, het verhelpen van de computerproblemen en steeds met de lach op het gezicht. Jan wil ik bedanken voor de LC-MS analyses en zijn uitleg hierbij.

Mijn beste vrienden wil ik bedanken voor hun onvoorwaardelijk vriendschap sinds 1^e latijnse C. Ook aan mijn vriendin had ik veel steun. Ik kijk er al naar uit om jullie 's zomers terug frequenter te zien.

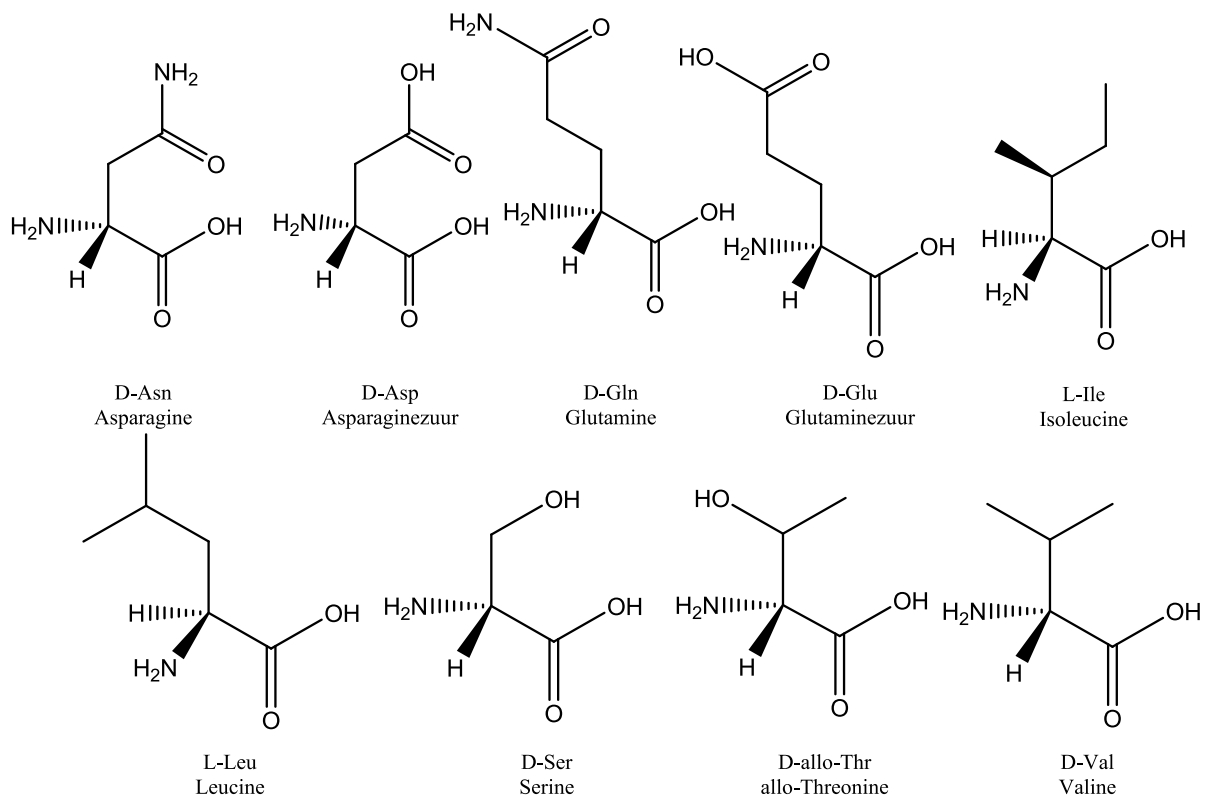
Bedankt (en tevens proficiat) aan mijn klasgenoten die ook mijn vrienden werden, voor het samen doorbrengen van deze vijf jaren. Ook bedankt aan Dieter, mijn vaste 'reisgezel' of het nu per trein, per fiets of in het labo was.

Lijst der gebruikte afkortingen

Alloc	allyloxycarbonyl
AMP	antimicrobieel peptide
Asn	asparagine
Asp	asparaginezuur
Boc	tert-butoxycarbonyl
BOP	benzotriazol-1-yl-oxy-tris(dimethylamino)-fosfoniumhexafluorofosfaat
COSY	correlatie spectroscopie
CLP	cyclisch lipodepsipeptide
Cys	cysteïne
DZ	decaanzuur
DCC	dicyclohexylcarbodiimide
DCM	dichloormethaan
DIC	diisopropylcarbodiimide
DIPEA	diisopropylethylamine
DMAP	4-dimethylaminopyridine
DMF	dimethylformamide
DMTMM Cl	4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorfoliniumchloride
DMTMM BF ₄	4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorfoliniumtetrafluoroboraat
DMSO	dimethylsulfoxide
DOSY	diffusion ordered spectroscopy
DVB	divinylbenzeen
ESI	electrospray ionisation
Fmoc	9-fluorenylmethoxycarbonyl
GC-MS	gaschromatografie-massaspectrometrie
Gln	glutamine
Glu	glutaminezuur
Glx	glutamine of glutaminezuur
HATU	2-(1H-9-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-aminiumhexafluorofosfaat

HBTU	2-(1H-9-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-aminiumhexafluorofosfaat
HDZ	3-hydroxydecaanzuur
HOAt	1-hydroxy-7-azabenzotriazool
HOBt	1-hydroxybenzotriazool
HPLC	high pressure liquid chromatography (hoge druk vloeistofchromatografie)
Ile	isoleucine
LC-MS	vloeistofchromatografie-massaspectrometrie
Leu	leucine
MeIm	N-methylimidazool
MSNT	1-(mesityleen-2-sulfonyl)-3-nitro-1,2,4-triazool
MTBE	methyl- <i>tert</i> -butylether
NHS	N-hydroxysuccinimide
NMM	N-methylmorfoline
NMP	N-methylpyrrolidon
NMR	nucleaire magnetische resonantie
PEG	polyethyleenglycol
Pfp	pentafluorofenyl
PyBOP	benzotriazol-1-yloxy-tris-pyrrolidino-fosfoniumhexafluorofosfaat
RT	room temperature (kamertemperatuur)
R _t	retentietijd
Ser	serine
TFA	trifluoroazijnzuur
THF	tetrahydrofuran
Thr	threonine
TIS	triisopropylsilaan
TOCSY	totale correlatie spectroscopie
TLC	thin layer chromatography (dunne laag chromatografie)
TNBS	trinitrobenzeensulfonzuur
Trt	trityl

Lijst der gebruikte aminozuren



Hoofdstuk 1: Inleiding en projectschets

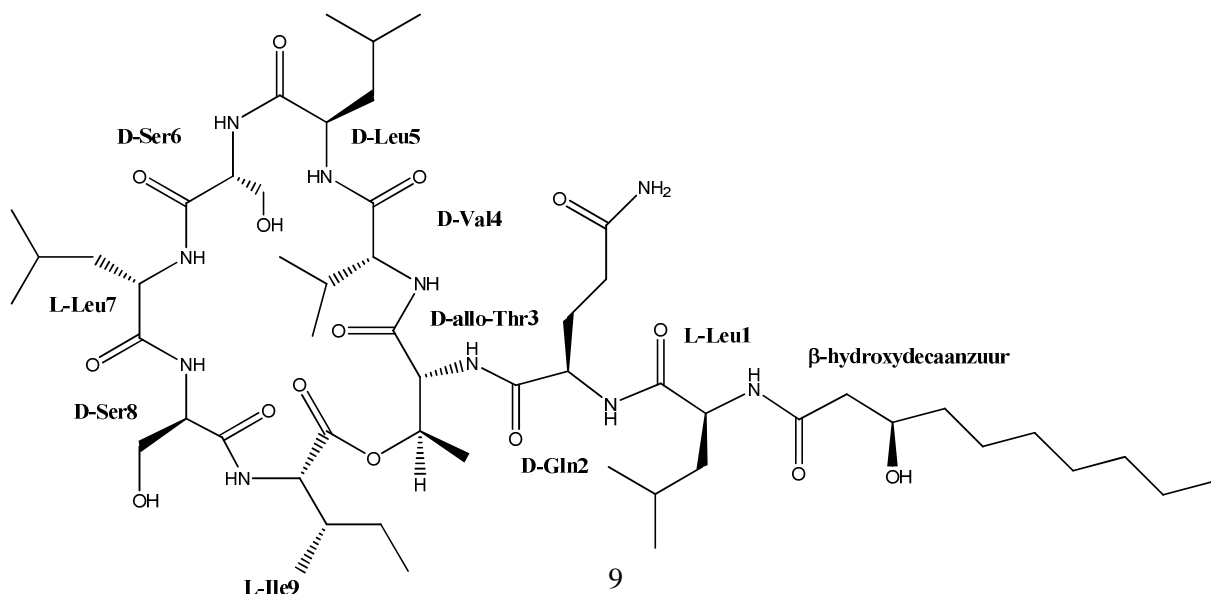
Dit werk handelt over de synthese en analyse van pseudodesmine-analogen. Het kadert in een ruimere context naar het onderzoek op pseudodesmine A, een cyclisch lipodepsipeptide (CLP). CLP's omvatten een grote groep aan structureel verwante moleculen. Algemeen geldt dat een CLP een vetzure "staart" heeft die gekoppeld is aan de N-terminus van een oligopeptide, waarbij de cyclische structuur gevormd wordt door een lactonring. De C-terminus is steeds betrokken in de vorming van deze esterbinding.[1]



Figuur 1.1 'Black belly' salamander

Pseudodesmine A wordt geproduceerd door een bacterie van het geslacht *Pseudomonas* die voorkomt in het slijmvlies van de 'black belly' salamander. Pseudodesmine A is een interessante molecule voor de farmaceutische industrie omdat ze over een zekere antimicrobiële activiteit beschikt. Zeer hoopgevend is dat deze ook activiteit vertoont tegen een aantal resistente bacteriën zoals MRSA (meticilline-restistente *Staphylococcus aureus*). Dit product werd door Kemin Pharma bezorgd aan de onderzoeksgroep NMR en structuuranalyse van professor J. Martins aan de Ugent. Op dat ogenblik had men geen enkele kennis over de structuur en de werking van deze molecule. In 2005 werd de moleculaire structuur opgehelderd door Davy Sinnave met behulp van ^1H en ^{13}C NMR spectroscopische methoden.[2] Door LC-MS analyse op gederivatiseerde hydrolysefragmenten en XRD-analyse [3] werd uiteindelijk ook de stereochemie volledig bepaald. Tijdens de analyse met NMR werd vastgesteld dat er lijnverbreding optreedt in apolaire solventen, terwijl dit niet het geval is in polaire solventen. Dit werd verklaard door de vorming van supramoleculaire structuren geïnduceerd door het apolair milieu, wat de aanleiding gaf tot uitgebreid structureel onderzoek. In het doctoraatswerk [4] en twee daaruit volgende publicaties [3, 5] wordt dit gedrag verder besproken en wordt er een model opgesteld waarin wordt beschreven hoe deze supramoleculaire structuur zich zou kunnen vormen. Vanuit dit model wordt ook een mogelijke verklaring gegeven voor de biologische activiteit van de molecule. (zie verder)

Pseudodesmine A kan men indelen bij de viscosinegroep. Deze groep is een verzameling van CLP's die een vergelijkbare ketenlengte en verwante aminozuursequentie vertonen. Van sommige leden van deze groep vermoedt men dat de biologische activiteit gebaseerd is op de vorming van ionenporiën in celmembranen. Ook het biologische model dat werd opgesteld voor pseudodesmine, veronderstelt het



Figuur 1.2 Moleculaire structuur van pseudodesmine A

vormen van poriën in celmembranen. Door deze poriën zou een transport van ionen doorheen het membraan mogelijk worden.

Toch blijven vele vragen nog onbeantwoord met betrekking tot de precieze moleculaire opbouw van de supramoleculaire complexen: Wat is het belang van elk individueel aminozuur voor de zelfassociatie? Wat is de invloed van de ketenlengte van de vetzuren op de biologische activiteit? Wat is de impact van de Leu5 stereochemie – het enige stereocentrum dat varieert binnen de viscosinegroep – op de conformatie en het zelfassociatiegedrag van de molecule? Variaties in de moleculen laten eveneens toe om het vooropgestelde model voor biologische activiteit te toetsen. Om de relatie tussen de biologische functie en de structuur beter te kunnen onderzoeken alsook om op grotere schaal verbindingen te kunnen maken is er nood aan een syntheseroute voor dit soort moleculen die tevens de gewenste variaties mogelijk maakt. Eens men een strategie op punt heeft gesteld, wordt het mogelijk om op grotere schaal pseudodesmine-analogen aan te maken en deze ook te testen op biologische activiteit.

Aangezien pseudodesmines slechts vrij recent ontdekt zijn, is er in de literatuur nog geen syntheseroute gekend. Wel zijn er voorbeelden gekend van de synthese van andere CLP's en andere cyclische depsipeptiden. Hierop gebaseerd werd in de onderzoeksgroep voor Organische en Biomimetische chemie van professor A. Madder in 2009 een route opgesteld. Erasmusstudente Anna Malinowska beschrijft de eerste stappen van dit project, waarbij een lineair hexapeptide werd gesynthetiseerd.[6] Na het werk van Anna restten er nog ettelijke uitdagingen, zoals vorming van de esterbinding, de ringsluiting en de synthese van enkele niet-commercieel beschikbare bouwstenen.

Het doel van dit onderzoek is dan ook tot een efficiënte synthestrategie te komen voor pseudodesmine-analogen. Pseudodesmine-analogen zullen daarna bestudeerd worden met NMR-spectroscopie om het gedrag in apolaire solventen en mogelijke zelfassociatie te onderzoeken. In de rest van dit hoofdstuk wordt een kort overzicht gegeven van de rest van deze dissertatie.

In hoofdstuk twee wordt een neerslag gegeven van de literatuurstudie die werd uitgevoerd in verband met het huidige onderwerp. In het eerste deel worden de ruimere context en **eigenschappen van antimicrobiële peptiden (AMP's), CLP's en pseudodesmine** besproken. Hierbij is er ook de nodige aandacht voor het biologische model zoals voorgesteld in het doctoraatsproefschrift van Davy Sinnavee. In het tweede gedeelte van de literatuurstudie worden een aantal gekende voorbeelden van **strategieën** besproken die relevant zijn **voor het synthetiseren van CLP's**. Tot slot van dit hoofdstuk worden de **doelstellingen van deze thesis** in meer detail besproken.

In hoofdstuk drie worden de gebruikte **materialen en methoden** besproken, zodanig dat de geïnteresseerde lezer zich hier meer kan informeren over de toegepaste (analyse)methoden. Ook worden hierin essentiële informatie, kenmerken en begrippen in verband met vaste fase peptide synthese besproken.

In het vierde hoofdstuk wordt de **synthese van drie bouwstenen** besproken die niet commercieel beschikbaar zijn. De voornaamste reden hiervoor is dat pseudodesmine meerdere D-aminozuren bevat, die niet standaard beschikbaar zijn in hun geactiveerde vorm voor peptidesynthese.

In het vijfde hoofdstuk wordt de **voortzetting** van de door **Anna Malinowska opgestarte synthese** besproken. Dit omvat het inbouwen van de volgende bouwstenen, eerste pogingen om de depsibinding

te vormen en de cyclisatie van de lineaire precursor. Het cyclische product wordt ten slotte afgesplitst en gezuiverd met HPLC. De klemtoon ligt vooral op het testen van de synthesecondities.

In hoofdstuk zes wordt de synthese van een onbeschermd **Gln-pentafluorofenylesterderivaat** besproken. Er werd van uitgegaan dat dit derivaat mogelijk een meer effectieve vorming van de depsibinding zou bewerkstelligen nadat eerste pogingen hiertoe bleken te mislukken. Aangezien uiteindelijk werd vastgesteld dat deze bouwsteen gevoelig is voor zijreacties, werd besloten om met de oorspronkelijke bouwsteen verder te werken.

In hoofdstuk zeven wordt de synthese van een pseudodesmine-analoog beschreven op grotere schaal (op 120 mg hars i.p.v. 30 mg voorheen). Een **geoptimaliseerde route** wordt hierin beschreven en er wordt gezocht naar oplossingen voor de moeilijkheden die in het vijfde hoofdstuk naar voren kwamen.

Tot slot wordt de NMR studie van het gedrag van een pseudodesmine-analoog onderzocht en beschreven in hoofdstuk 8.

In hoofdstuk 9 worden de **experimenten** gedetailleerd beschreven. Ook de gebruikte analysetechnieken worden vermeld. Verder vindt men er de toekenning van opgenomen (routine) NMR-spectra.

In de **conclusie** worden de belangrijkste bevindingen herhaald. Eveneens wordt een discussie opgestart waarin een aantal voorstellen worden geformuleerd om de route verder te optimaliseren. Ook wordt een andere werkwijze voorgesteld die mogelijk eveneens toelaat om het pseudodesmine A en analogen op alternatieve wijze te bekomen.

Hoofdstuk 2: Literatuurstudie

2.1 AMP's, CLP's en de viscosine groep

2.1.1 AMP's

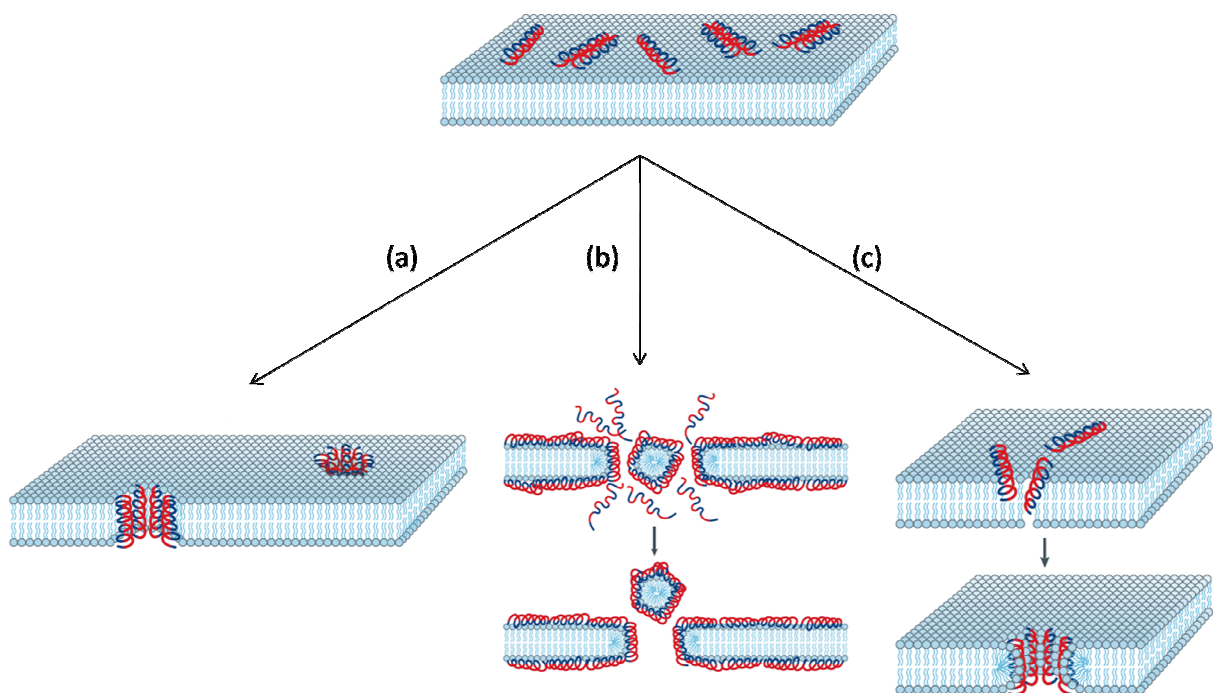
Het onderzoek naar antimicrobiële peptiden (AMP's) is de laatste jaren sterk toegenomen. Meercellige organismen zoals planten en dieren bezitten krachtige AMP's om zich te weren tegen een breed spectrum van microben. Het veronderstelde mechanisme voor hun biologische activiteit is verbonden aan de mogelijkheid om het celmembraan te verstoren of meer specifiek transmembraanporiën te induceren. Dit laat een verbinding toe tussen de intra- en extracellulaire omgeving van bacteriën die hierdoor sterven of een aanzienlijk nadeel ondervinden. Aangezien deze interactie – anders dan de klassieke antibiotica – niet specifiek is, wordt verwacht dat resistentie tegen antimicrobiële peptiden minder vlot zou kunnen optreden.[7]

AMP's bestaan uit oligopeptideketens met een lengte die kan variëren van 6 tot 60 aminozuren.[8] Een gemeenschappelijk kenmerk is dat deze peptiden amfipatisch zijn, dit wil zeggen dat ze zodanig georganiseerd zijn dat de hydrofiele aminozuren aan de ene kant van de molecule voorkomen en de hydrofobe aminozuren langs de andere zijde gegroepeerd zijn.

Er bestaat echter een enorme diversiteit binnen deze groep, zowel qua secundaire structuur als qua biologische activiteit.[7, 9] Er zijn bijvoorbeeld AMP's bekend die een α -helicale structuur hebben, maar ook AMP's die een antiparallel β -vouwblad vertonen. Op basis van hun aminozuursamenstelling en secundaire structuur kunnen ze onderverdeeld worden in verschillende subgroepen. Een eerste subgroep bevat anionische AMP's. De tweede subgroep bevat lineaire kationische peptiden die in waterige omgeving ongestructureerd zijn, maar in aanwezigheid van surfactanten, zoals natrium dodecylsulfaat, gedeeltelijk of volledig een α -helixstructuur aannemen. Een derde subgroep bevat kationische peptiden die aangerijkt zijn in bepaalde aminozuren. Een vierde subgroep omvat zowel anionische als kationische peptiden die cysteine bevatten en disulfidebruggen vormen. Tot slot wordt een laatste subgroep beschouwd waartoe zowel anionische als kationische peptiden behoren, die fragmenten zijn van grotere proteïnen.[8]

De interactie van AMP's met het celmembraan grijpt plaats bij voldoende hoge concentratie. Bij lage peptide/fosfolipide verhouding, zullen de peptiden zich eerst parallel aan het oppervlak van het celmembraan binden. Bij toenemende peptideconcentratie zullen de peptidemoleculen zich geleidelijk aan loodrecht op het membraan heroriënteren en zich in deze dubbellaag invoegen. Een aantal modellen zijn voorgesteld die deze porievorming beschrijven. (figuur 2.1) [8, 9]

In het *barrel-stave* (“vat-duigen”) model, vormen de AMP-helices een bundel doorheen het membraan, zoals een vat met de AMP-helices als duigen. Hierbij zijn de hydrofobe zijketens naar de buitenkant gericht, terwijl de hydrofiële zijketens zich aan de binnenkant bevinden. In het *carpet* (tapijt) model plaatsen de AMP-moleculen zichzelf parallel aan het oppervlak van het membraan als een uitwendige laag (of tapijt) rondom het membraan. Hierbij kunnen ze optreden als een detergent en uiteindelijk micelstructuren vormen die effectief stukjes van het membraan openbreken. Het derde mechanisme is het *toroidal pore* (toroïdale porie) waarbij de geaggregeerde AMP’s effectief een gat duwen door het membraan. Het *toroïdale* model verschilt van het *barrel-stave* model in die zin dat de peptiden langsheen de wand van de porie nog steeds interageren met het hydrofiële gedeelte van de fosfolipide dubbellaag.



Figuur 2.1 AMP's hechten zich eerst vast parallel aan het membraan. Wanneer de lokale concentratie verhoogt dan treedt er porievorming op in het membraan. Verschillende modellen zijn beschreven. (a) *Barrel-stave* model; (b) *Carpet*-model; (c) *Toroidal pore* model. Het hydrofiële gedeelte van de molecule is rood gekleurd en het hydrofobe deel blauw. Figuur aangepast uit review van Brogden[8]

Wat het exacte mechanisme ook is, de vorming van poriën of opening van het membraan heeft verschillende ongunstige of zelfs letale effecten voor de aangevallen bacterie. Mogelijke gevolgen zijn het weglekken van celinhoud of het ontstaan van een ionenflux die op zijn beurt een reeks veranderingen kan induceren.

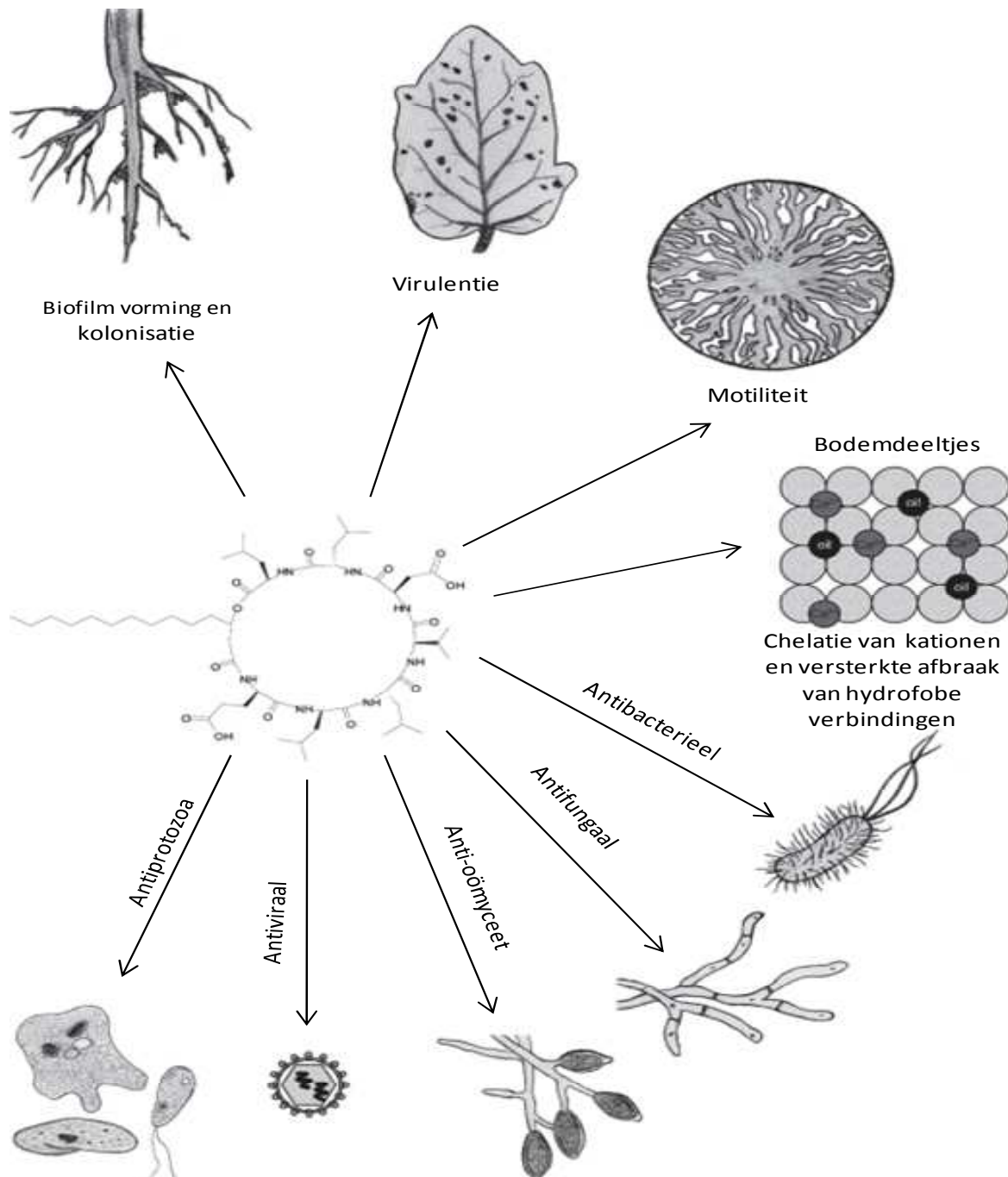
In het algemeen veronderstelt men dat het voor bacteriën zeer moeilijk is om immuun te worden tegen AMP's omdat dit vrij ingrijpende veranderingen aan het membraan impliceert. De ontwikkeling van AMP's als geneesmiddel krijgt daardoor veel aandacht, maar verloopt tot hertoe niet heel vlot. Dit omdat in dierlijke modellen de AMP's in vitro enkel actief waren in concentraties die dicht bij de, voor de proefdieren letale concentratie lagen. Desalniettemin heeft men aangetoond dat ze de activiteit van de klassieke antibiotica versterken, vermoedelijk omdat ze de toegankelijkheid tot de bacteriële cel verhogen.[7]

2.1.2 CLP's

In het vorige deel werd beschreven hoe AMP's actief zijn tegen bacteriën. Micro-organismen produceren echter vaak ook zelf peptiden die een soortgelijk gedrag vertonen als AMP's.[9] Men kan

een onderscheid maken al naargelang ze op ribosomale of niet-ribosomale wijze gesynthetiseerd worden. De cyclische lipodepsipeptiden (CLP's) kan men bij de laatste groep onderverdelen. [10]

CLP's zijn secundaire metabolieten, dit wil zeggen dat ze niet rechtstreeks betrokken zijn bij de groei, ontwikkeling of voortplanting van het organisme. CLP's zijn kleine moleculen die bestaan uit een oligopeptide waarbij de N-terminus verbonden is met een lange vetzuren keten. Ze vormen een cyclische structuur via een lactonbinding. Kenmerkend voor deze groep is dat deze esterbinding meestal gevormd wordt tussen de C-terminus en een alcoholgroep afkomstig van een Ser of Thr zijketen. Een peptide waar naast amidebindingen ook esterbinding(en) voorkomen wordt een depsipeptide genoemd.[4]



Figuur 2.2 Overzicht van de biologische functies van CLP's. Aangepast uit [11]

De productie van CLP's wordt beschouwd als een gemeenschappelijk kenmerk van de *Pseudomonas*

bacteriën. Ook andere bacteriegeslachten zoals *Bacillus* produceren CLP's.[1] Aangezien pseudodesmine geproduceerd wordt door bacteriën van het *Pseudomonas* geslacht, zal enkel op deze eerste groep ingegaan worden, hoewel CLP's van de laatste groep soortgelijke eigenschappen vertonen. De structurele en biologische diversiteit van CLP's is enorm (figuur 2.2)[11]. Zo zorgen CLP's onder meer voor een competitief voordeel ten opzichte van andere micro-organismen (bv. virussen, bacteriën en fungi) omdat ze deze rechtstreeks aanvallen. Daarnaast ondervinden ze ook nog een ander voordeel: sommige CLP's zorgen ook voor een verhoogde motiliteit (vermogen tot bewegen) van de bacteriën, waardoor deze zich gemakkelijker naar gunstigere omgevingen kunnen verplaatsen. Deze CLP's gedragen zich vaak als biosurfactant en veranderen de viscositeit van celoppervlakken en zo ook de motiliteit. Daarnaast zijn CLP's afkomstig van *Bacillus* organismen vaak in staat om kationen te complexeren.

De productie van CLP's gebeurt niet ribosomaal, zoals de klassieke eiwitsynthese, maar wordt gestuurd door niet-ribosomale peptide synthetases (NRPS). Dit zijn grote enzymen die bestaan uit verschillende domeinen. Ze laten de synthese toe van oligopeptiden die niet met de klassieke eiwitsynthese geproduceerd kunnen worden. Ze zorgen onder meer voor de incorporatie van verschillende ongebruikelijke aminozuren, D-aminozuren, carbon- en vetzuren. Bovendien laten ze de ringsluiting van de molecule toe.[1, 12] Elk van de domeinen van deze enzymen is verantwoordelijk voor de katalyse van specifieke enzymatische activiteiten.

Naast een grote functionele diversiteit is er ook een grote structurele diversiteit. Vroeger werden de CLP's afkomstig van *Pseudomonas* stevast onderverdeeld in vier groepen.[1, 13] Recentelijk zijn de CLP's afkomstig van dit geslacht geclassificeerd in 6 groepen: viscosine, amphisine, tolaasine, syringomicine, putisolvine en syringopeptine.[14] Deze indeling is gebaseerd op de lengte en de samenstelling van de vetzuren staart evenals het aantal, het type en de configuratie van aminozuren in de oligopeptideketen. (Tabel 2.1)

De CLP's van de viscosine groep bestaan uit een nonapeptide keten waarbij de N-terminus verbonden is met een vetzuren "staart", meestal 3-hydroxydecaanzuur. Deze groep wordt in meer detail besproken in 2.1.3. De CLP's van de amphisine groep zijn zeer gelijkend op deze van de viscosine groep, maar bestaan uit 11 aminozuren in plaats van 9. Het sequentiemotief van hydrofiele en hydrofobe residuen is ook zeer gelijklopend aan dat van de viscosine groep.

De overige vier groepen verschillen van de viscosine en amphisine groepen omdat ze meer en ongewone aminozuren bevatten zoals bijvoorbeeld 4-chlorothreonine en homoserine. De CLP's van de tolaasine groep zijn relatief grote moleculen die tussen de 19 en 25 aminozuren bevatten. Ze bevatten meerdere variaties in samenstelling en lengte van zowel de peptide als vetzuren keten. Ze hebben ook een zeer kleine ringstructuur in vergelijking met de andere groepen, op de putisolvine groep na. De syringomycine groep bevat net als de viscosine groep 9 aminozuren, maar eerstgenoemde groep bestaat onderling uit sterk verschillende aminozuren. De lactonring wordt gevormd tussen een serine hydroxyl groep op de N-terminale positie en de C-terminale carbonzuur eindgroep. De N-terminus is daarnaast verbonden met een 3-hydroxy of 3,4-dihydroxy vetzuur dat 10, 12 of 14 koolstofatomen bevat.[1, 13]

Groep/Naam	Structuur
Viscosine	
Viscosine	FA-β-OH-L-Leu-D-Glu-D-a-Thr-D-Val-L-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Ser-L-Ile
Viscosinamide	FA-β-OH-L-Leu-D-Gln-D-a-Thr-D-Val-L-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Ser-L-Ile
Massetolide A	FA-β-OH-L-Leu-D-Glu-D-a-Thr-D-Val-L-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Ser-L-Ile
WLIP	FA-β-OH-L-Leu-D-Glu-D-a-Thr-D-Val-L-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Ser-L-Ile
Pseudophormine A	FA-β-OH-L-Leu-D-Glu-D-a-Thr-D-Ile-D-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Ser-L-Ile
Pseudodeszime A	FA-β-OH-L-Leu-D-Gln-D-a-Thr-D-Val-L-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Ser-L-Ile
Amphisine	
Arthrofacine	FA-β-OH-D-Leu-D-Asp-D-a-Thr-D-Leu-D-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Ser-L-Ile-L-Ile-L-Asp
Amphisine	FA-β-OH-D-Leu-D-Asp-D-a-Thr-D-Leu-D-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Gln-L-Leu-L-Ile-L-Asp
Lokisine	FA-β-OH-D-Leu-D-Asp-D-a-Thr-D-Leu-D-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Ser-L-Ile-L-Asp
Pholipeptine	FA-β-OH-D-Leu-L-Asp-L-Thr-D-Leu-D-Ser-D-Leu-D-Ser-D-Leu-L-Ile-D-Asp
Tensine	FA-β-OH-D-Leu-D-Asp-D-a-Thr-D-Leu-D-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Gln-L-Leu-L-Ile-L-Glu
Tolaasine	
Tolaasine I	FA-β-OH-Dhb-Pro-Ser-Leu-Val-Ser-Leu-Val-Val-Gln-Leu - - - Val-Dhb-α-Thr-Ile-Hse-Dab-Lys
Fuscopeptine	FA-β-OH-Dhb-Pro-Leu-Ala-Ala-Ala-Val-Gly-Ala-Val-Ala - - - Val-Dhb-α-Thr-Ala-Dab-Dab-Phe
C-orpeptine	FA-β-OH-Dhb-Pro-Ala-Ala-Ala-Val-Val-Dhb-Hse-Val-alle-Dhb-Ala-Ala-Val-Dhb-α-Thr-Ala-Dab-Ser-Ile
Syringomycine	
Syngomycine A	FA-β-OH-L-Ser-D-Ser-D-Dab-L-Dab-L-Arg-L-Phe-Z-Dhb-L-Asp(3-OH)-L-Thr(4-Cl)
Syngostatine A	FA-β-OH-L-Ser-D-Dab-L-Dab-D-Hse-L-Om-L-a-Thr-Z-Dhb-L-Asp(3-OH)-L-Thr(4-Cl)
Syngotoxine B	FA-β-OH-L-Ser-D-Dab-L-Gly-D-Hse-L-Om-L-a-Thr-Z-Dhb-L-Asp(3-OH)-L-Thr(4-Cl)
Pseudomycine A	FA-β-OH-L-Ser-D-Dab-L-Asp-D-Lys-L-Dab-L-a-Thr-Z-Dhb-L-Asp(3-OH)-L-Thr(4-Cl)
Comycine A	FA-β-OH-L-Ser-D-Om-L-Asn-D-Hse-L-His-L-a-Thr-Z-Dhb-L-Asp(3-OH)-L-Thr(4-Cl)
Putisolvine	
Putisolvine I	CH ₃ (CH) ₄ CO-D-Leu-D-Glu-D-Leu-D-Ile-D-Gln-D-Ser-D-Val-D-Ile-D-Ser-L-Leu-L-Val-X-Ser
Putisolvine II	CH ₃ (CH) ₄ CO-D-Leu-D-Glu-D-Leu-D-Ile-D-Gln-D-Ser-D-Val-D-Ile-D-Ser-L-Leu-L-Xle-X-Ser
Syringopeptine	
SP22	FA-β-OH-Dhb-Pro-Val-Val-Ala-Ala-Val - - - Val-Dhb-Ala-Val-Ala-Ala-Dhb-α-Thr-Ser-Ala-Dhb-Ala-Dab-Tyr
SP25	FA-β-OH-Dhb-Pro-Val-Ala-Ala-Val-Leu-Ala-Ala-Dhb-Val-Dhb-Val-Ala-Ala-Dhb-α-Thr-Ser-Ala-Val-Ala-Dab-Dab-Tyr
SP25[Phe25]	FA-β-OH-Dhb-Pro-Val-Ala-Ala-Val-Leu-Ala-Ala-Dhb-Val-Dhb-Val-Ala-Ala-Dhb-α-Thr-Ser-Ala-Val-Ala-Dab-Dab-Phe

Dhb: 2,3-dehydr-o-2-aminobutyric acid, Dab: 2,4-aminobutyric acid, Hse: homoserine, Asp(β-OH): 3-hydroxy aspartic acid, Thr(4-Cl): 4-chlorothreonine, Orn: ornithine, FA: fatty acid

Tabel 2.1 Primaire structuur van representatieve CLP's geproduceerd door Pseudomonas bacteriën. Aangepast uit [12]

De putisolvine groep vertoont een aantal unieke eigenschappen. Deze groep bevat CLP's met 12 aminozuren en een vetzuraast bestaande uit 6 koolstofatomen. De cyclisatie in deze groep is ook verschillend van andere CLP's omdat de sluiting gebeurt tussen C-terminus en het 9^e aminozuur (Ser). CLP's van de syringopeptine bevatten 22 tot 25 aminozuren en de lactonring wordt gevormd tussen de allo-threonine en de C-terminus.[12]

Pseudomonas CLP's oefenen verschillende biologische functies uit, waaronder hun functie als biosurfactant of hun invloed op motiliteit zoals eerder aangehaald. De laatste jaren is er ook sterke aandacht uitgegaan naar hun werking als antibioticum, die net als bij de AMP's gebaseerd zou zijn op hun interactie met het plasmamembraan. Men kan dus ook hier veronderstellen dat bacteriën niet snel resistent zullen worden tegen deze antibiotica. Voor hun biologische werking moeten ze dus in staat zijn het plasmamembraan te bereiken. Dit is vermoedelijk de reden waarom CLP's de groei van Gram-negatieve bacteriën niet kunnen verhinderen.[1] Dergelijke bacteriën beschikken naast het plasmamembraan ook nog over een uitwendig membraan, dat waarschijnlijk de toegang tot het plasmamembraan verhindert. De groei van Gram-positieve bacteriën, die geen beschermend uitwendig plasmamembraan bevatten, kan wel verhinderd worden door leden van alle CLP-groepen.[13]

De oorzaak van de antibiotische werking kan gezocht worden in de desintegratie van het membraan of in door porievorming doorheen het membraan. Deze porievorming geeft aanleiding tot het ontstaan van kanalen die passief ionentransport toelaten, met allerlei ongunstige processen als gevolg. Zo worden door syringomycine poriën gevormd met een straal van ca. 1 nm. Deze zijn toegankelijk voor mono en divalente kationen. Deze ionenkanalen veroorzaken een influx van H^+ en Ca^{2+} en een efflux van K^+ . Dit leidt tot een daling van de pH gradiënt over het plasmamembraan en tot een reeks van Ca^{2+} gestuurde signaalprocessen. Een verhoogde instroom van Ca^{2+} -ionen induceert bijvoorbeeld de kinase gestuurde fosforylatie van membraanproteïnen. De porievorming van syringomycine werd ook aangetoond door Hutchison *et al.* Ze toonden eveneens aan dat de biologische activiteit van dit peptide gebaseerd is op de vorming van transmembraan poriën.[15, 16]

Porievorming door WLIP (*the White Line Inducing Principle*) en tolaasine I in artificiële membranen werd ook aangetoond door Coraiola *et al.*[17]. Dit deed men door de calceïne efflux uit een artificieel membraan te meten, nadat dit in contact was gebracht met een CLP. De grootte (en de aanwezigheid) van deze poriën werd aangetoond door Lo Cantore.[18] Zij voegden een osmoliet (een beschermgroep die de gevormde porie afsluit) met een bepaalde grootte toe aan het uitwendige medium. Met behulp van turbidimetrie kon dan de poriegrootte bepaald worden. De gevonden poriestraal bedroeg voor WLIP en tolaasine I respectievelijk 1.6 en 2.1 nm.

2.1.3 De viscosine groep

Pseudodesmine is een lid van de viscosine groep. Deze groep wordt in twee subgroepen onderverdeeld afhankelijk van de absolute configuratie van het stereocentrum van de Leu in de 5^e positie, de enige positie binnen de groep waar variatie in de stereochemie plaatsgrijpt. Viscosine, viscosinamide en de massetolides behoren tot de L-subgroep. Pseudodesmine, pseudophomines en WLIP worden in de D-subgroep onderverdeeld. (Tabel 2.2) Enkel binnen de laatste subgroep zijn conformationele studies uitgevoerd. Uit kristalstructuren stelt men vast dat leden van deze subgroep bijna identieke conformaties aannemen. Men veronderstelt dat de stereochemie van Leu5 een sterke impact heeft op de totale conformatie en dus mogelijk ook op de structuur-functie relatie.[4]

Wanneer men de sequentie van de groepsleden van naderbij bekijkt (zie tabel 2.2), stelt men vast dat er veel structurele kenmerken behouden blijven. Ten eerste ziet men dat de positie en de hydrofiele residuen (Glx2, Ser6 en Ser8) altijd dezelfde zijn. Bij de hydrofobe residuen variëren enkel de aminozuren op positie 4 en 9. Verder wordt de stereochemie ook bewaard bij alle varianten in deze groep met uitzondering van Leu5. Dit wijst erop dat het afwisselende patroon van hydrofiele en hydrofobe bouwstenen belangrijk is voor de biologische functie van deze groep CLP's. Uit onderzoek op pseudodesmines werd duidelijk dat de hydrofiele residuen zodanig gepositioneerd zijn dat men een

amfipatisch geheel krijgt. Dit amfipatisch karakter wordt een belangrijke rol toegedicht in het hypothetisch model van de vorming van ionenporiën.[5]

Viscosinegroep	Structuur	1	2	3	4	5	6	7	8	9
L-subgroep										
Viscosine	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CO}$	-L-Leu-D	-Glu-D	-aThr-D	-Val-L	-Leu-D	-Ser-L	-Leu-D	-Ser-L	-Ile
Viscosinamide	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CO}$	-L-Leu-D	-Gln-D	-aThr-D	-Val-L	-Leu-D	-Ser-L	-Leu-D	-Ser-L	-Ile
Massetolide A	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CO}$	-L-Leu-D	-Glu-D	-aThr-D	-aIle-L	-Leu-D	-Ser-L	-Leu-D	-Ser-L	-Ile
D-subgroep										
Pseudodesmine A	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CO}$	-L-Leu-D	-Gln-D	-aThr-D	-Val-D	-Leu-D	-Ser-L	-Leu-D	-Ser-L	-Ile
Pseudodesmine B	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CO}$	-L-Leu-D	-Gln-D	-aThr-D	-Val-D	-Leu-D	-Ser-L	-Leu-D	-Ser-L	-Val
WLIP	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CO}$	-L-Leu-D	-Glu-D	-aThr-D	-Val-D	-Leu-D	-Ser-L	-Leu-D	-Ser-L	-Ile
Pseudophomin A	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CO}$	-L-Leu-D	-Glu-D	-aThr-D	-Ile-D	-Leu-D	-Ser-L	-Leu-D	-Ser-L	-Ile
Pseudophomin B	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CO}$	-L-Leu-D	-Glu-D	-aThr-D	-Ile-D	-Leu-D	-Ser-L	-Leu-D	-Ser-L	-Ile

Tabel 2.2 Representatieve leden van de viscosine groep

Het eerste lid van de groep, dat ook zijn naam gaf aan de groep is viscosine. Deze CLP bestaat uit 9 aminozuur residuen, waarvan er zeven deel uit maken van de cyclische structuur. De C-terminus is veresterd met de alcoholgroep van D-allo-Thr3. De N-terminus is verbonden met een 3-hydroxydecanoaat als vetzure groep. Deze kenmerken vindt men terug bij alle viscosine groepsleden, hoewel de ketenlengte van de vetzure staart kan verschillen.

Viscosinamide verschilt enkel van viscosine door de aanwezigheid van een glutamine in plaats van een glutaminezuur residu. Bij fysiologische pH zal laatstgenoemde groep in zijn glutamaat vorm voorkomen. Viscosinamide heeft dus geen enkele ioniseerbare functionele groep, en dit uit zich in verminderde oplosbaarheid in water.[4] De massetolides, waarvan in tabel 2.2 slechts één wordt weergegeven, verschillen onderling in de hydrofobe aminozuren op positie 4 en 9 en ook in de lengte van de vetzure keten.

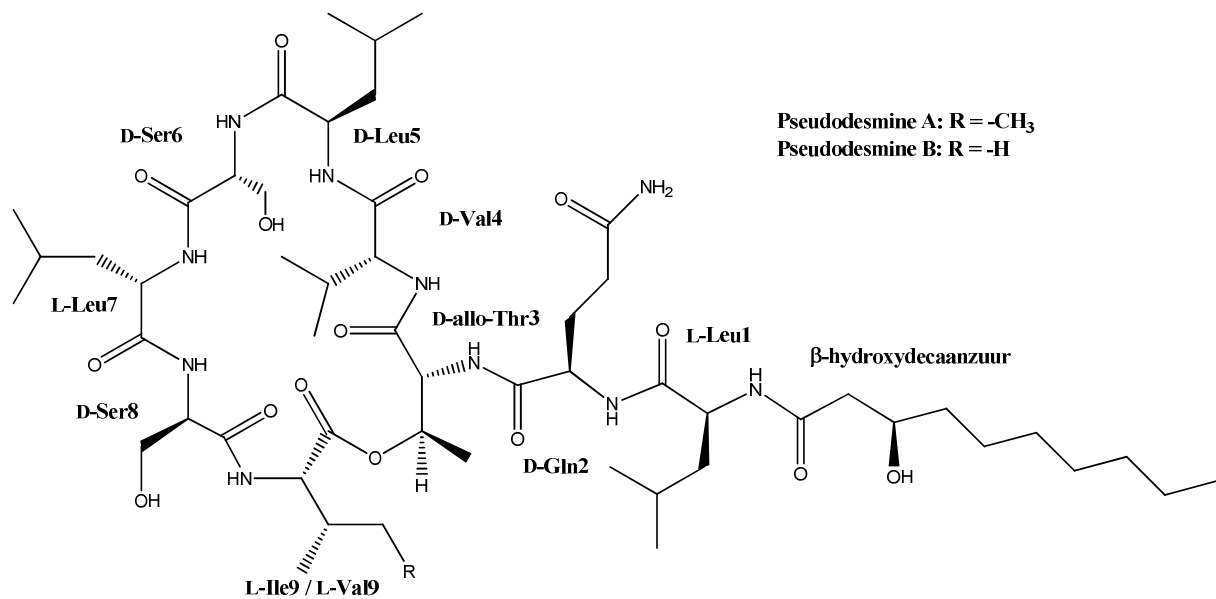
Een van de meest gekende leden van de D-subgroep is de *White Line Inducing Principle* (WLIP). Dit werd voor het eerst beschreven in 1991 [19] als een product geïsoleerd uit *Pseudomonas reactans*. Het bleek dat deze verbinding verantwoordelijk was voor de witte lijn die verschijnt op een agarplaat wanneer *Pseudomonas reactans* samen met *Pseudomonas tolaasii* gekweekt wordt. Deze witte lijn wordt gebruikt om de aanwezigheid van *Pseudomonas tolaasii* aan te tonen, die de bruine vlekken ziekte veroorzaakt op sommige eetbare paddenstoelen. WLIP is op de stereochemie van de Leu5 na, identiek aan viscosine. Zoals eerder werd vermeld is WLIP in staat om poriën te vormen en zich in een celmembraan in te voegen.[17, 18]

Pseudophomine A en B verschillen onderling enkel in de ketenlengte van het vetzure gedeelte. De vetzure staart telt bij pseudophomine B 12 koolstofatomen. Vermeldenswaardig hierbij is dat het een significant hoger inhiberend effect vertoont op de geteste pathogenen dan pseudophomine A dat twee koolstofatomen minder heeft in de vetzure staart.[4]

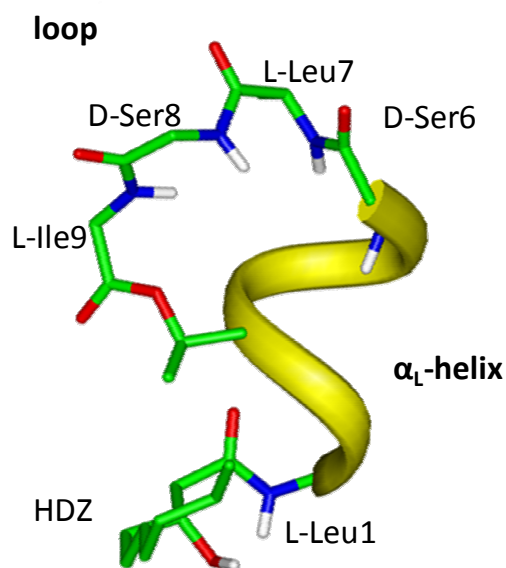
2.1.4 Pseudodesmine

A (en B) wordt aangemaakt door *Pseudomonas* bacteriën (vermoedelijk van de soort *toalaasii*) die leven in het slijmvlies van de ‘black belly’ salamander. De isolatie, voorafgaande karakterisatie en biologische screening van deze molecule is uitvoerig gedocumenteerd.[20] De initiële ontrafeling van de moleculaire structuur en gedeeltelijke bepaling van de stereochemie werd verricht door

multidimensionele NMR-technieken en door LC-MS-analyse van een volledig gehydrolyseerd staal.[2] Later werd ook nog een XRD-kristalstructuur verkregen die toeliet om de volledige stereochemie te bevestigen. [3]



Figuur 2.3 Moleculaire structuur van pseudodesmine A en B



Figuur 2.4 NMR-structuur van pseudodesmin A. Aangepast uit [3]

De pseudodesmines zijn de eerste structuren in de D-subgroep die beschikken over een glutamine residu in plaats van een glutamaat residu. Pseudodesmine A kan dus beschouwd worden als de amidevorm van WLIP. Pseudodesmine B heeft op de 9^e positie een Val in plaats van een Ile. (figuur 2.3)

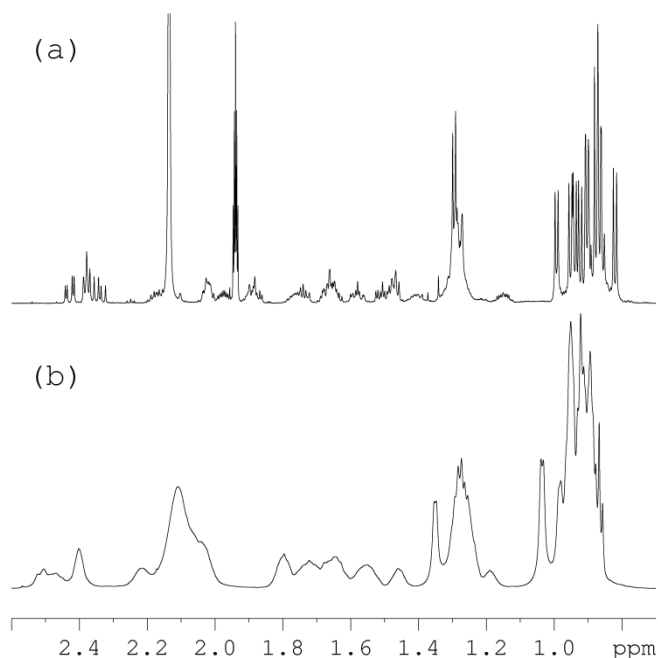
De ringstructuur bestaat uit 7 aminozuren en loopt van D-allo-Thr3 tot L-Ile9. (figuur 2.4) De esterbinding wordt gevormd tussen de C-terminus (Ile9) en de alcoholgroep afkomstig van de zijketen van threonine. De N-terminus (L-Leu1) is verbonden met β -hydroxydecaan-zuur. Opmerkelijk is dat de molecule ook een linkshandige α -helix bevat die zich uitstrekt van D-Gln2 tot D-Leu5 en enkel bestaat uit D-aminozuren. (figuur 2.4) Eiwitten die ribosomaal gemaakt worden, zijn enkel opgebouwd uit L-aminozuren en geven dus enkel aanleiding tot rechtshandige helices. De

alternerende L-D-L configuratie in het Leu7-Ile9 tripeptide vormt een lus, die de peptideketen toelaat terug te plooiën en zo de C-terminus in de geschikte positie brengt om een lacton binding te vormen met de Thr3 zijketen. [3]

Pseudodesmine A en B werden beiden gescreend op hun biologische activiteit tegen een reeks relevante pathogenen waaronder bacteriën, virussen en fungi.[3] Ze blijken voornamelijk actief te zijn tegen Gram-positieve bacteriën, waaronder ook een aantal resistente stammen zoals VRE (vancomycine resistente *Enterococcus*) en MRSA (methicilline resistente *Staphylococcus aureus*) Deze laatste wordt in de volksmond ook de ziekenhuisbacterie genoemd, hoewel het juist is om te zeggen dat MRSA de meest gekende ziekenhuisbacterie is. Anderzijds is hun inhibitiespectrum niet zo breed en krachtig als dat van de klassieke antibiotica zoals vancomycine.[4] Een opmerkelijke vaststelling is dat pseudodesmine A een hogere activiteit vertoont dan pseudodesmine B. Dit lijkt erop te wijzen dat een hogere activiteit gecorreleerd is met een hogere hydrofobiciteit van de zijketens.

Zelfassociatiegedrag

Een bijzondere eigenschap is het solventafhankelijke gedrag van pseudodesmine A. Dit uit zich sterk in 1D-¹H NMR-spectra, waarin men een spectaculair verschil vaststelt afhankelijk van het solvent waarin de molecule is opgelost. (figuur 2.5) Wanneer pseudodesmine A is opgelost in een reeks van solventen met een concentratie tussen 2 en 3 mM stelt men vast dat de lijnbreedte van de resonanties



Figuur 2.5 Alifatische gebied van het 700.13 MHz ¹H NMR-spectrum in a) polair solvent: (CD₃CN) en b) apolair solvent: (CDCl₃) overgenomen uit [3]

sterk toeneemt in apolaire solventen zoals chloroform en dioxaan.[5]

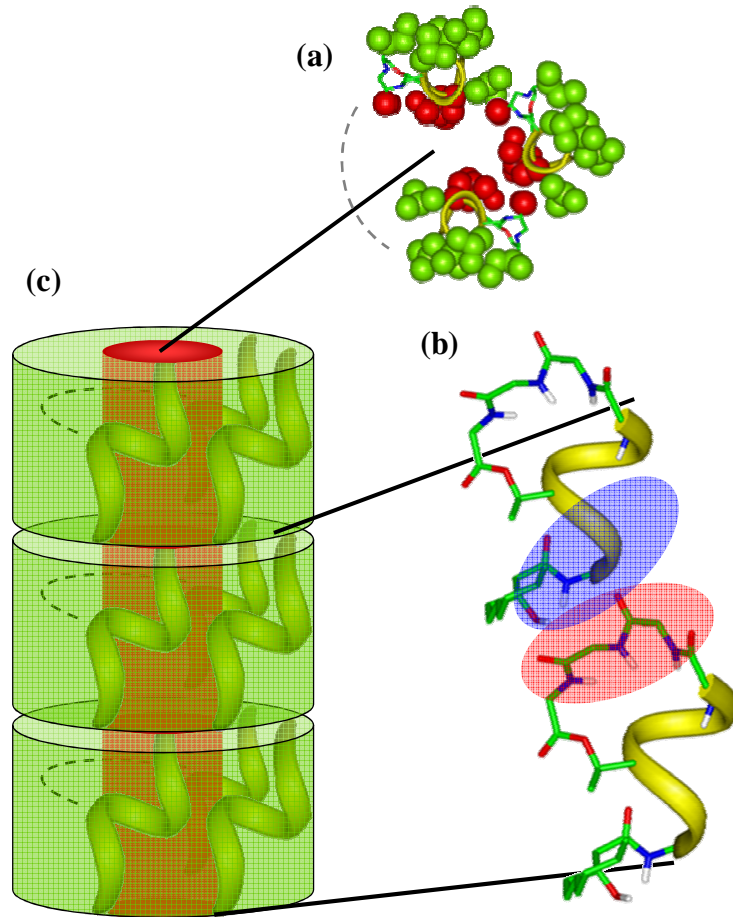
Lijnverbreding wijst algemeen op een toename van de transversale relaxatiesnelheidsconstante R_2 . Aangezien alle resonanties in gelijke mate verbreed zijn, is de lijnverbreding niet te wijten aan een conformationeel of chemisch uitwisselingsproces, zoals bijvoorbeeld plaatsgrijpt bij protonatie/deprotonatie van een zuur proton. Een andere oorzaak moest dus aan de basis van dit fenomeen liggen. Deze oorzaak is een toegenomen rotationele correlatietijd τ_c . De relaxatiesnelheidsconstante R_2 is immers evenredig met de τ_c , dat afhankelijk is van de viscositeit van het solvent en de grootte van de opgeloste stof. Het verschil in viscositeit tussen de verschillende solventen alleen is echter niet voldoende om de verbreding te verklaren. Door

middel van NMR-onderzoek op pseudodesmine A toonde men aan, door meting van de translationele diffusiecoëfficiënt, dat de klaarblijkelijke hydrodynamische straal r_H (maat voor de grootte van de stof) toeneemt volgens afnemende polariteit van het solvent enerzijds en volgens toenemende pseudodesmine concentratie anderzijds [4, 5] Dit geeft aan dat zelfassociatie optreedt, waarbij pseudodesmine moleculen in een apolaire omgeving aggregeren, terwijl deze moleculen in hun monomere vorm blijven in polaire solventen.

Dit zelfassociatiegedrag werd onderzocht door Sinnaeve *et al*, die op basis van NMR-data een model voorstelden voor de opbouw en organisatie van de supramoleculaire structuur die ontstaat in apolair milieu. (figuur 2.6) [5]. Dit structuurmodel biedt een verklaring voor de biologische activiteit. Men veronderstelt hierbij dat pseudodesmine A in het apolaire celmembran kan zelfassociëren en hierbij

ionenporiën vormt doorheen het membraan. In de literatuur werd al meerdere malen verondersteld dat de vorming van ionenporiën die passief transport toelaten, gerelateerd is aan de antimicrobiële werking van CLP's. [15]

In dit model zijn er twee verschillende interacties van groot belang. Ten eerste stelt men vast dat pseudodesmine A een amfipatische structuur heeft. Overigens treft men in de hele viscosinegroep



Figuur 2.6 Veronderstelde model voor zelfassociatie. A) bovenaanzicht van een ongedefinieerd aantal pseudodesmine A moleculen die hun hydrofiële zijketens (rood) naar elkaar richten en de hydrofobe (groen) naar buiten. B) De vrije NH-groepen langs de N-terminus van de helix interageren door elektrostatische interactie met de vrij CO-groepen in de lus die zich aan de C-terminus van de helix bevindt. C) De twee processen samen leveren een grote supramoleculaire structuur op. Overgenomen uit [3]

andere vorm van intermoleculaire interactie die nu plaatsgrijpt ter hoogte van de peptidehoofdketen. De vrije amidegroepen langs de N-terminale zijde van de helix kunnen waterstofbruggen vormen met de vrije carbonylgroepen van een andere molecule langs de C-terminale zijde van de helix of in de lus (deel b in figuur 2.6). [4, 5]

Onder invloed van deze twee processen zou zich dan een grote supramoleculaire structuur vormen, waarbij men eerst aggregatie heeft van het eerste type zodat één laag wordt gevormd, waarna aggregatie van het tweede type optreedt en dus de verschillende lagen zich op elkaar stapelen. Zo verkrijgt men een supramoleculaire structuur die zou kunnen fungeren als een ionenporie. Deze heeft een hydrofiële binnenkant die coördinatie toelaat van kationen met de alcohol- en vrije carbonylgroepen. Zo ontstaat er een kanaal dat passief transport van ionen zou kunnen toelaten. De functie van de vetzuren staart is vermoedelijk het verhogen van de membraanoplosbaarheid of het

eenzelfde patroon aan van hydrofobe en hydrofiële aminozuurposities, wat er op duidt dat het bewaren van dit patroon van cruciaal belang is. In figuur 2.6a zijn de hydrofiële en hydrofobe zijketens respectievelijk rood en groen ingekleurd. Wanneer men deze moleculen in een apolaire omgeving brengt, dan verwacht men dat de hydrofiële oppervlakken zich naar elkaar toe richten, waarbij tegelijkertijd de hydrofobe oppervlakken zich naar de buitenkant richten om zo het energetisch ongunstige contact tussen het hydrofiële oppervlak en het apolair solvent te minimaliseren. Dit principe is voor AMP's in het algemeen ook zeer gekend. Deze aggregatie alleen is echter onvoldoende om een transmembraan porie te vormen omdat de dimensies van één zulk aggregaat te klein zijn om het celmembraan te overbruggen.

Dit kan wel door rekening te houden met longitudinale aggregatie. Dit gebeurt door een

verankeren van het CLP in het membraan door interactie met de vetzuren groepen van de fosfolipidelaaag. Het is hoogst waarschijnlijk dat de biologische activiteit van andere helix-bevattende CLP's met amfipatisch karakter zoals WLIP, de pseudophomines, amphisine en tensine eveneens op deze manier te verklaren is.[5]

De auteur van het model beklemtoont echter dat men een alternatief mechanisme, waarbij individuele moleculen of kleine oligomeren optreden als een soort mobiele ionen dragers doorheen het membraan, niet volledig kan uitsluiten. Toch lijkt het erg onwaarschijnlijk dat dit laatste het geval zou zijn omdat dit niet in overeenstemming is met de vorming van een grote supramoleculaire structuur in niet-polaire solventen als dioxaan, chloroform en benzeen. Weliswaar is een organisch solvent niet zomaar te vergelijken met de binnenzijde van een biologische membraan, maar beiden vormen een apolaire omgeving.[5]

2.2 Synthestrategieën

Na in deel 2.1 de eigenschappen en de biologische achtergrond van de molecule te hebben toegelicht, wordt in dit deel besproken hoe men deze moleculen kan synthetiseren. Mijn onderzoek bouwt voort op de synthestrategie die in voorafgaand werk door Anna Malinowska werd onderzocht.[6]

In haar literatuurstudie haalt zij twee synthestrategieën aan – op vaste drager – die mogelijk nuttig kunnen zijn om analogen van pseudodesmine A aan te maken. De eerste werd ontwikkeld door Burke, Knight en Chandrasekhar.[21] Een recentere strategie werd ontwikkeld door Stawikowski en Cudic.[22] In 2.2.2 en 2.2.3 respectievelijk worden deze strategieën besproken en met elkaar vergeleken.

Algemeen geldt dat de ringsluiting een van de moeilijkste punten is bij de synthese van CLP's.[21] De cyclische structuur kan men verkrijgen door vorming van een amide- of esterbinding. Experimenteel wordt vastgesteld dat het (in het algemeen) gemakkelijker is om moleculen te cycliseren via de vorming van een amidebinding dan via de vorming van een depsibinding.[23] Dat valt meer dan waarschijnlijk te verklaren doordat een amine een beter nucleofiel is dan een alcohol.

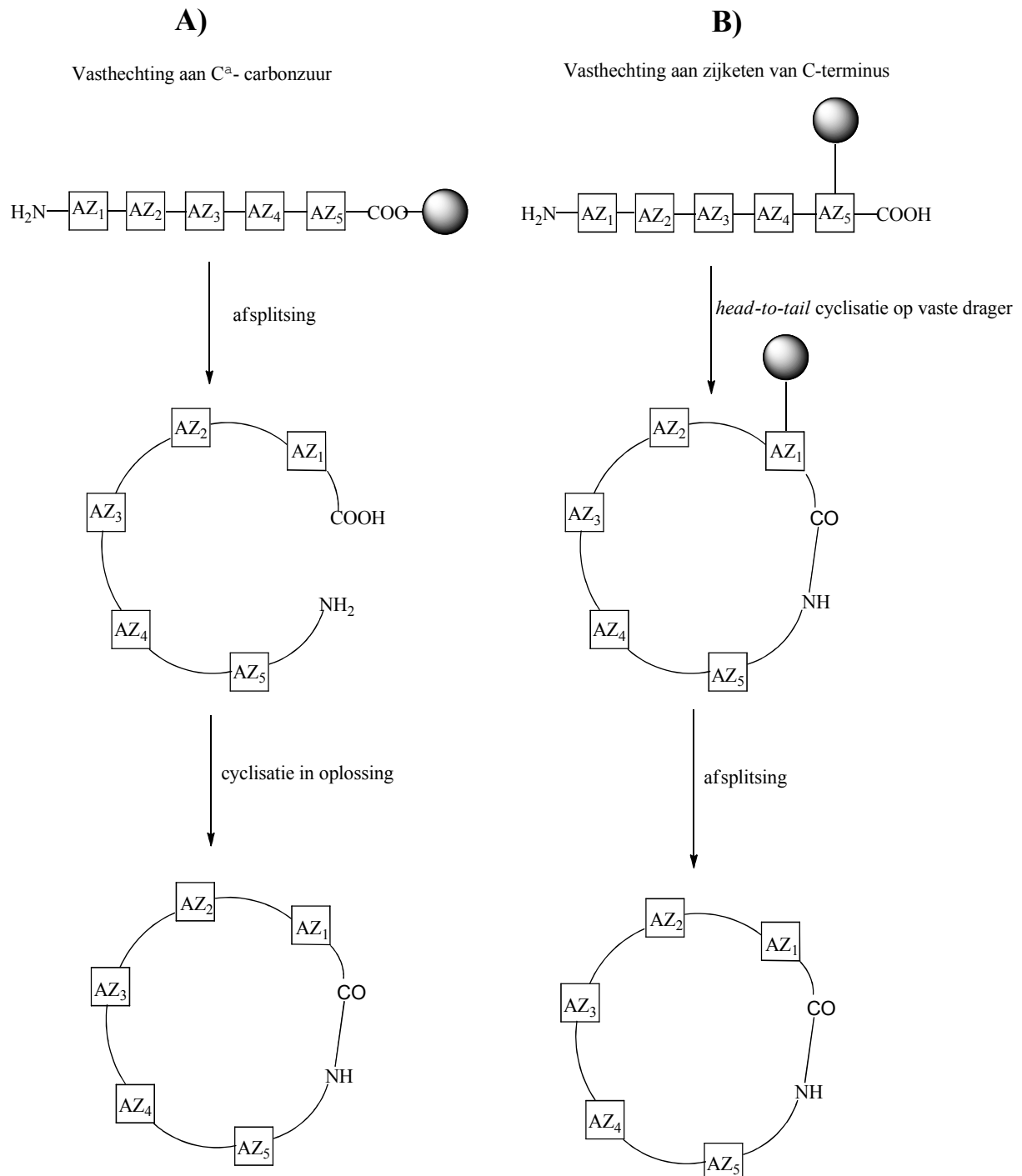
Hoewel de onderstaande methodes beiden een strategie op vaste fase inhouden, mag men hieruit geenszins besluiten dat men CLP's niet in oplossing zou kunnen maken. In de literatuur zijn er voorbeelden gekend van CLP's die ofwel helemaal niet [23, 24] of slechts gedeeltelijk op vaste fase gemaakt worden.[25] Anderzijds is het zo dat men sinds de jaren '90 een significante voorkeur vaststelt voor het maken van cyclische peptiden op vaste drager. De vaste drager heeft als grote voordeel dat een overmaat aan reagens kan gebruikt worden om reacties volledig te laten aflopen.

2.2.1 Vasthechting via de zijketen

Als men kijkt naar voorbeelden van synthese van CLP's op vaste drager, waarbij de ringsluiting gebeurt door de vorming van een amidebinding, kan men twee verschillende strategieën onderscheiden. [23]

In een eerste aanpak wordt het peptide via het C^α-carbonzuur vastgehecht aan het hars en wordt de lineaire precursor opgebouwd via synthese van de C- naar de N-terminus. (figuur 2.7 A) De lineaire precursor wordt vervolgens afgesplitst van het hars en de finale cyclisatie wordt uitgevoerd in oplossing. Naast de methode van Chandrasekhar beschreven in 2.2.2 bestaan er nog talloze andere voorbeelden. [21, 26-28]

De tweede aanpak ontstaat door een trifunctioneel aminozuur op het hars te immobiliseren via zijn zijketen (“*side-chain attachment*”). De cyclisatie gebeurt op vaste fase en vereist het gebruik van drie niveaus van orthogonale bescherming. (figuur 2.7 B) Na afsplitsing van het hars verkrijgt men het cyclische product. De Stawikowski en Cudic strategie besproken in 2.2.3, is een voorbeeld van deze werkwijze. In de literatuur vindt men ook nog andere voorbeelden van CLP’s die op deze wijze worden gemaakt.[29-33]



Figuur 2.7 Twee mogelijke strategieën voor het synthetiseren van CLP’s

Eén van de voordelen van de tweede methode is dat de ringsluiting gebeurt wanneer het peptide nog gebonden is op de vaste drager. Omdat verankerde peptiden niet vrijelijk naar elkaar toe kunnen bewegen, zullen intramoleculaire reacties bevoordeeld zijn. In oplossing worden dergelijke condities

enkel bereikt wanneer men onder sterk verdunde omstandigheden werkt. Men spreekt dan ook van een pseudoverdunningseffect [29] Aangezien de ringsluiting een kop-staart sluiting is, vereist dit noodzakelijkerwijze dat het oligopeptide op een andere plaats dan de C-terminus aan het hars wordt vastgehecht. Er dient hiervoor dan ook gebruik gemaakt te worden van de functionele groepen in de zijketens van welbepaalde aminozuren. Dit brengt het voornaamste nadeel van deze methode aan het licht: het vereist de aanwezigheid van geschikte trifunctionele aminozuren in de peptidesequentie.

Hoewel voorbeelden gekend zijn van syntheses waar de immobilisatie gebeurt via de zijketen functionele groep, is weinig gekend in verband met aanhechting aan de vaste drager via Ser of Thr zijketens. Vroegtijdige afsplitsing via de vorming van dehydroalanine vormt hier immers een gevaar. [29] Vasthechting via de zijketens van Asp [22, 32] en Glu [30, 31] wordt dan ook beschouwd als een meer betrouwbare werkwijze.

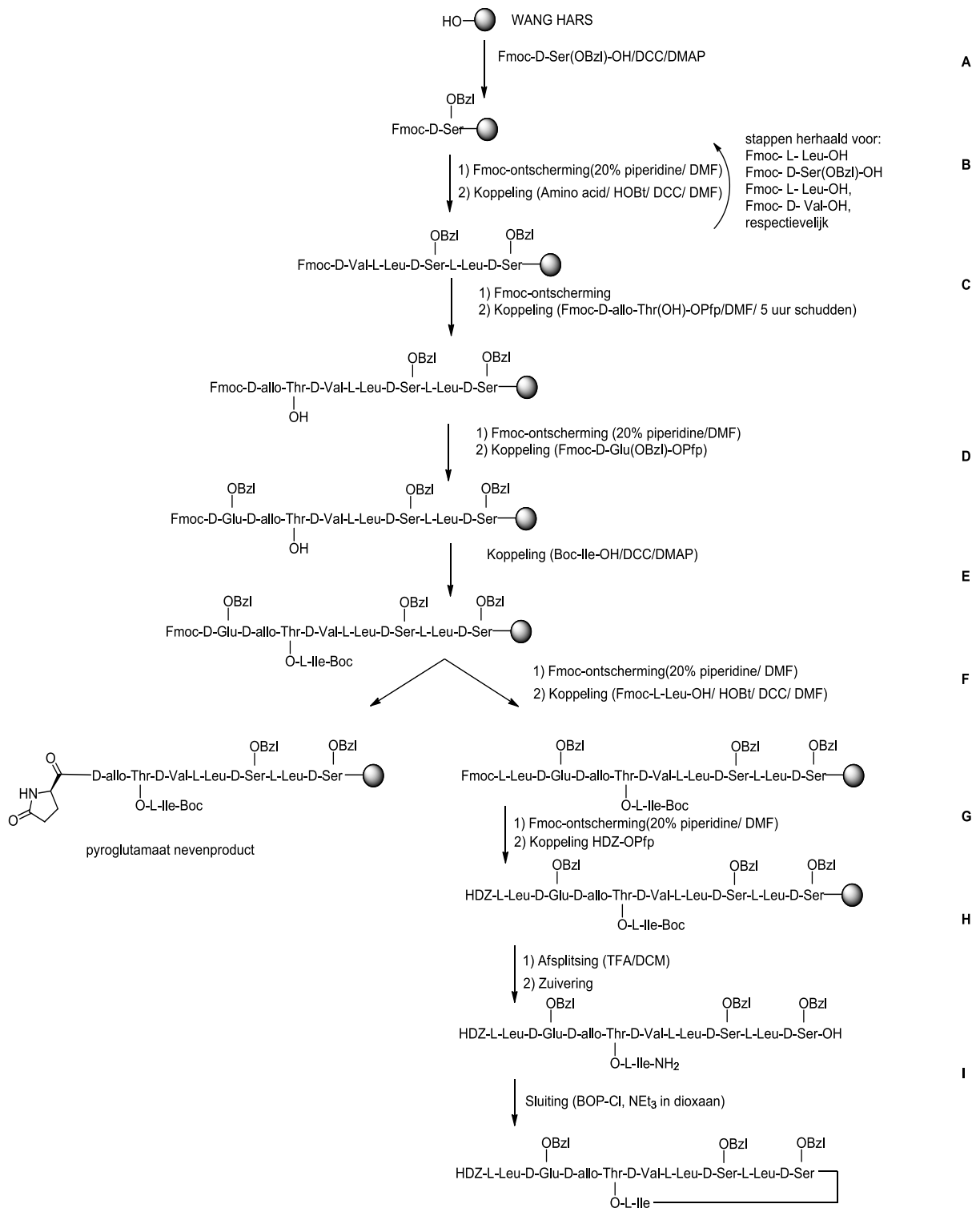
2.2.2 Burke, Knight en Chandrasekhar methode

Voor viscosine, een gelijkaardige CLP binnen dezelfde groep als pseudodesmine, werd reeds een syntheseroute opgesteld. Vanwege de veelbelovende antivirale en antimicrobiële eigenschappen tegen verschillende mycobacteriën [34] werd inderdaad al gauw naar de structuur van deze verbinding gezocht, maar ook naar een route om dit product te verkrijgen. Burke, Knight en Chandrasekhar ontwikkelden een syntheseroute voor viscosine in 1989. (figuur 2.8) [21]

In deze route wordt eerst een lineaire precursor gemaakt op vaste drager. Na afsplitsing wordt het peptide in oplossing gesloten door de vorming van een amidebinding tussen D-Ser(OBzl)-OH, dit is de C-terminus van de precursor, en de aminegroep van L-Ile. Na benzyl-ontscherming bekomt men viscosine. Het chromatogram en NMR-spectra van het synthetische viscosine zijn identiek aan dat van het natuurlijke product.

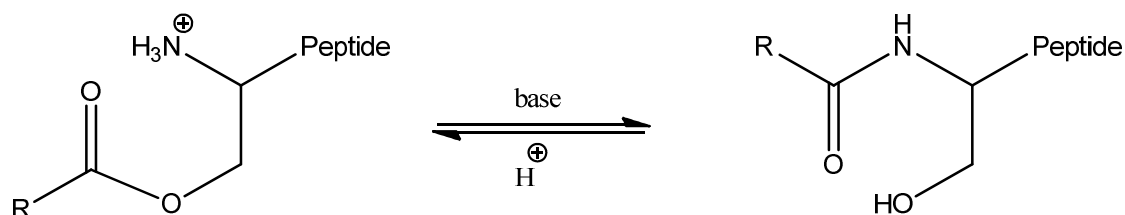
Als eerste bouwsteen wordt Fmoc-D-Ser(OBzl)-OH vastgehecht aan het alkoxybenzyl alcohol hars via activatie met DIC en 0.1 equivalent DMAP (A). De volgende vier aminozuren worden gekoppeld via de standaardaanpak, waarbij na Fmoc-ontscherming het volgende Fmoc-beschermde aminozuur wordt ingevoerd via activatie met HOBt/DCC in DMF.(B)

Na Fmoc-ontscherming van het laatste aminozuur in de keten, wordt het 'vertakkingspunt' ingevoerd. Dit is D-allo-Thr waarbij de zijketen onbeschermd wordt ingevoerd. (C) Wil men dit Fmoc-D-allo-Thr(OH)-OH koppelen via DCC, dan zou men een significante hoeveelheid acylering van deze zijketen kunnen veroorzaken. Daarom wordt in deze strategie gebruik gemaakt van een pentafluorofenylester van D-allo-Thr, daar het gekend is dat dit type esters sneller met amines dan met alcoholen reageren.



Figuur 2.8 Burke, Knight en Chandrasekhar route. Gebaseerd op publicatie Burke, Knight en Chandrasekhar [21]

Wanneer men nu een ester tracht te vormen door koppeling van het alcohol van Fmoc-D-allo-Thr met het carbonzuur van Boc-Ile, treedt een ongewenste $O \rightarrow N$ -acylshift op tijdens de daaropvolgende Fmoc-ontscherming in basisch milieu. Een succesvolle strategie om dit te vermijden, is om eerst de volgende amidebinding te vormen door het Fmoc-ontschermde hars te koppelen met Fmoc-D-Glu(OBzl)-OPfp (D), en slechts daarna de esterbinding te vormen (E). Een omgekeerde $N \rightarrow O$ -acylshift wordt niet verwacht aangezien in niet-zure omstandigheden wordt gewerkt. (figuur 2.9) [35, 36]



Figuur 2.9 Reversibele O-N-acylshift. Overgenomen uit [35]

Bij de Fmoc-ontscherming van Fmoc-D-Glu(OBzl) in stap **F** kan er in belangrijke mate cyclisatie met vorming van een pyroglutamaat optreden. Door de duur van de reactie te beperken en deze onmiddellijk te laten volgen door de koppeling met Fmoc-L-Leu-OH (DCC/HOBt) werd deze zijreactie vermeden. Tot slot werd het lineaire peptide afgewerkt door de N-terminus te acyleren met het Pfp-ester van D-3-hydroxydecaanzuur. (**G**) Men maakt hierbij andermaal gebruik van het Pfp-ester om reactie met de threonine alcoholgroep te vermijden.

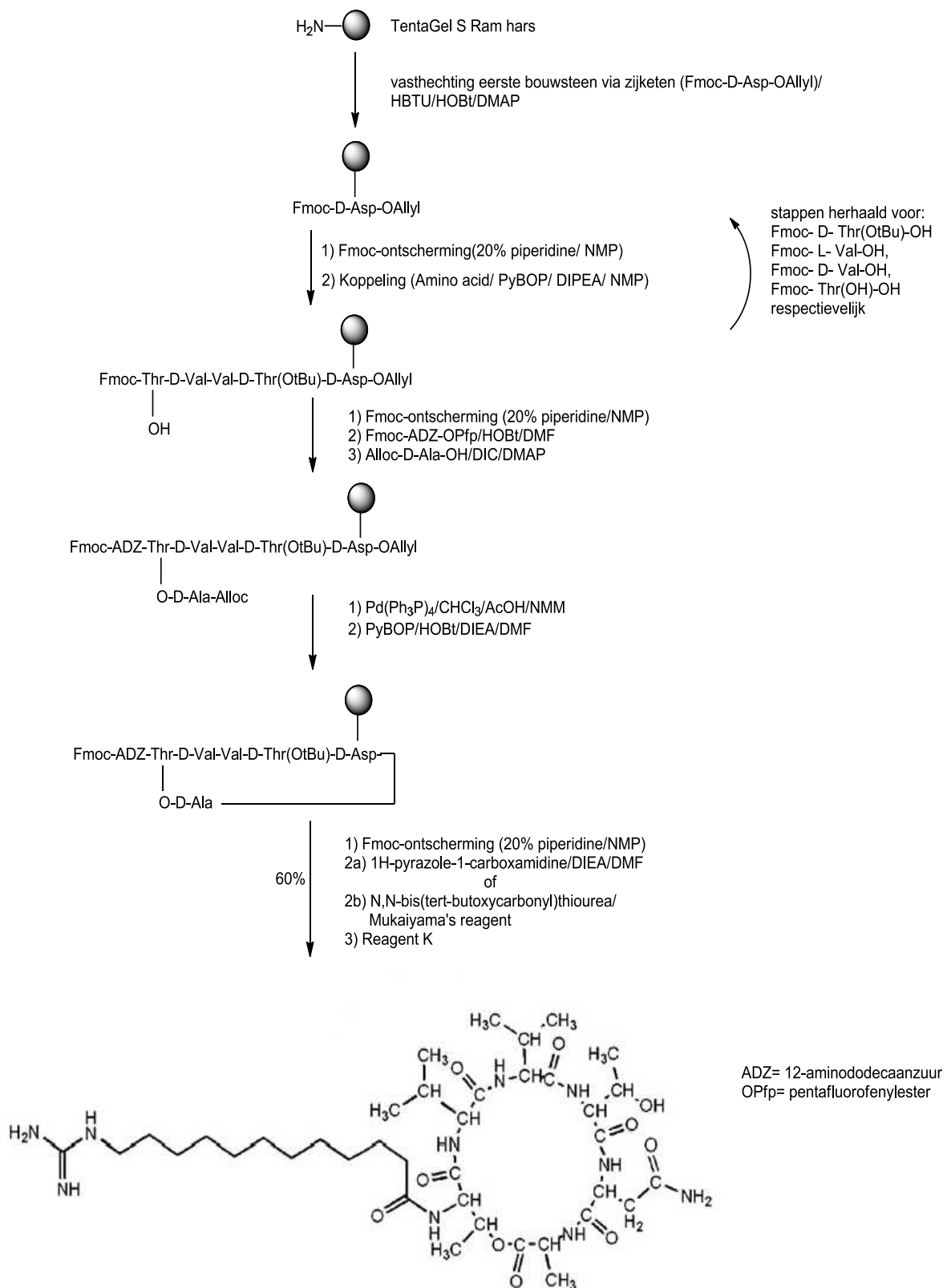
Na afsplitsing van het lineaire peptide (**H**) dient men eerst een HPLC-zuivering uit te voeren, wat het voornaamste knelpunt in deze route is. Wil men over behoorlijke hoeveelheden eindproduct beschikken, dan dient men dus eerst een aanzienlijke hoeveelheid lineaire precursor te isoleren om te compenseren voor de verliezen die gepaard gaan met deze zuivering. Hiervoor wordt een apolaire C₁₈-kolom aangewend.[37] Pas hierna wordt de ringsluiting uitgevoerd (**I**). Daar dit in oplossing gebeurt, dient de concentratie voldoende laag gehouden te worden om polymerisatiereacties te vermijden. In de laatste stap worden de benzyl-beschermgroepen verwijderd, waarna een finale HPLC-opzuivering kan plaatsvinden.

Samengevat kan men stellen dat het voordeel van deze strategie is dat een synthese wordt beschreven voor een molecule die heel goed lijkt op pseudodesmine A, waardoor men kan verwachten dat men een quasi identieke werkwijze kan uitvoeren voor laatstgenoemde CLP. Anderzijds is het rendement van deze strategie vrij laag onder meer door meerdere malen een moeilijke zuivering met HPLC. Daarnaast maakt men gebruik van benzyl-beschermgroepen die men finaal dient te verwijderen en ook dient men de ringsluiting uit te voeren onder sterk verdunde omstandigheden.

2.2.3 Stawikowski en Cudic methode

Stawikowski en Cudic ontwikkelden een route voor de synthese van analogen van fusaricine A. Dit is een CLP met antibiotische eigenschappen dat geïsoleerd werd uit een *Bacillus polymyxa* KT-8 stam.

Deze strategie maakt eveneens gebruik van de standaard Fmoc/tBu aanpak. Anders dan in de vorige methode wordt het eerste aminozuur aangehecht via de zijketen aan de vaste drager. Het lineaire peptide, inclusief de vetzure staart, wordt gemaakt met behulp van orthogonale beschermgroepen, waarna een *head-to-tail cyclisation* (kop-staart sluiting) wordt uitgevoerd terwijl de lineaire precursor nog steeds is vastgehecht op vaste fase.[22] Deze route wordt schematisch voorgesteld in figuur 2.10.



Figuur 2.10 Stawikowski & Cudic route. Aangepast uit publicatie Stawikowski en Cudic [22]

Een PEG-bevattend hars (TentaGel S Ram) bleek voor deze synthese het meest geschikt. Het eerste aminozuur Fmoc-D-Asp-Oallyl wordt via de zijketen vastgehecht aan dit hars via een HBTU/HOBt/DMAP procedure, waarna de klassieke Fmoc-gebaseerde koppelingsprocedure wordt gebruikt voor de aanhechting van de volgende vier aminozuren.

Het laatst gekoppelde threonine residue wordt ingevoerd met een onbeschermd alcoholfunctie, zodanig dat de esterbinding kan gevormd worden door koppeling met Alloc-D-Ala. Volgens de literatuur is het gebruik van DIC/DMAP de beste methode voor het maken van esterbindingen op vaste drager. [27] Bij een poging om hierna de Fmoc-beschermgroep te verwijderen van de Thr3 met piperidine, stelde men vast dat een O → N-acylshift optreedt. Dit is in overeenstemming met wat in de literatuur wordt beschreven: “peptiden die onbeschermd Ser of Thr residuen bevatten, ondergaan een N→O acylshift onder zure omstandigheden, terwijl het blootstellen van de corresponderende depsipectiden aan een basisch milieu, leidt tot de tegenovergestelde O→N acylshift”. [35, 36]

Een elegante oplossing voor dit probleem werd door Stawikowski en Cudic ontwikkeld door eerst 12-aminododecaanzuur in te bouwen in de lineaire precursor, vooraleer Alloc-D-Ala6 te koppelen met vorming van de esterbinding. [22] Hierna worden de Alloc en Allyl beschermgroepen selectief verwijderd door behandeling met Pd(Ph₃P)₄ [38], waarna het lineaire peptide gecycliseerd wordt tussen de D-Ala6 en D-Asn5 residuen.

De aminegroep van de vetzure staart wordt ten slotte omgezet in de gewenste guanidinium groep. Finale ontscherming en afsplitsing werden uitgevoerd met de klassieke ontschermingscocktail reagens K. Na afsplitsing van het eindproduct wordt eenmalig een zuivering met HPLC uitgevoerd. [6, 22]

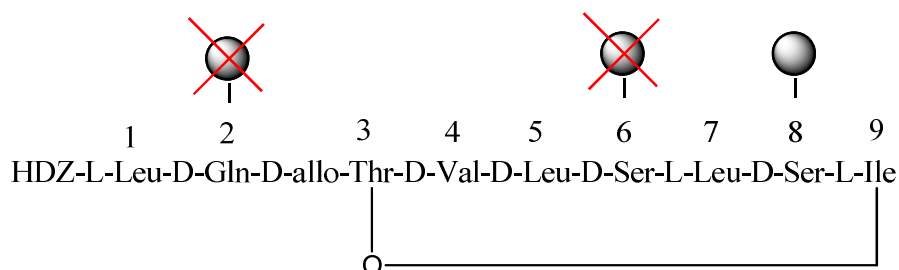
Samengevat is deze methode dus een vlotte en efficiënte procedure die geniet van het pseudo-verdunningseffect bij de ringsluiting. Een nadeel van deze procedure is dat een geschikt trifunctioneel aminozuur dient aanwezig te zijn nabij de C-terminus.

2.3 Doelstellingen

2.3.1 Ontwikkelen van een efficiënte syntheseroute naar analogen van pseudodesmine A

Zoals eerder geïllustreerd is pseudodesmine A een zeer interessante verbinding omwille van zijn biologische activiteit en zijn zelfassociatiegedrag. Daarom is het de eerste doelstelling van dit werk om een syntheseroute op punt te stellen om deze verbindingen te maken. Om dit doel te bereiken werd in preliminair werk besloten om de hoger beschreven Cudic strategie uit te proberen omdat deze als efficiënter wordt beschouwd gezien de cyclisatie uitgevoerd wordt op de vaste drager. Een route werd hierbij uitgestippeld gebaseerd op de Stawikowski-Cudic methode. (figuur 2.11)

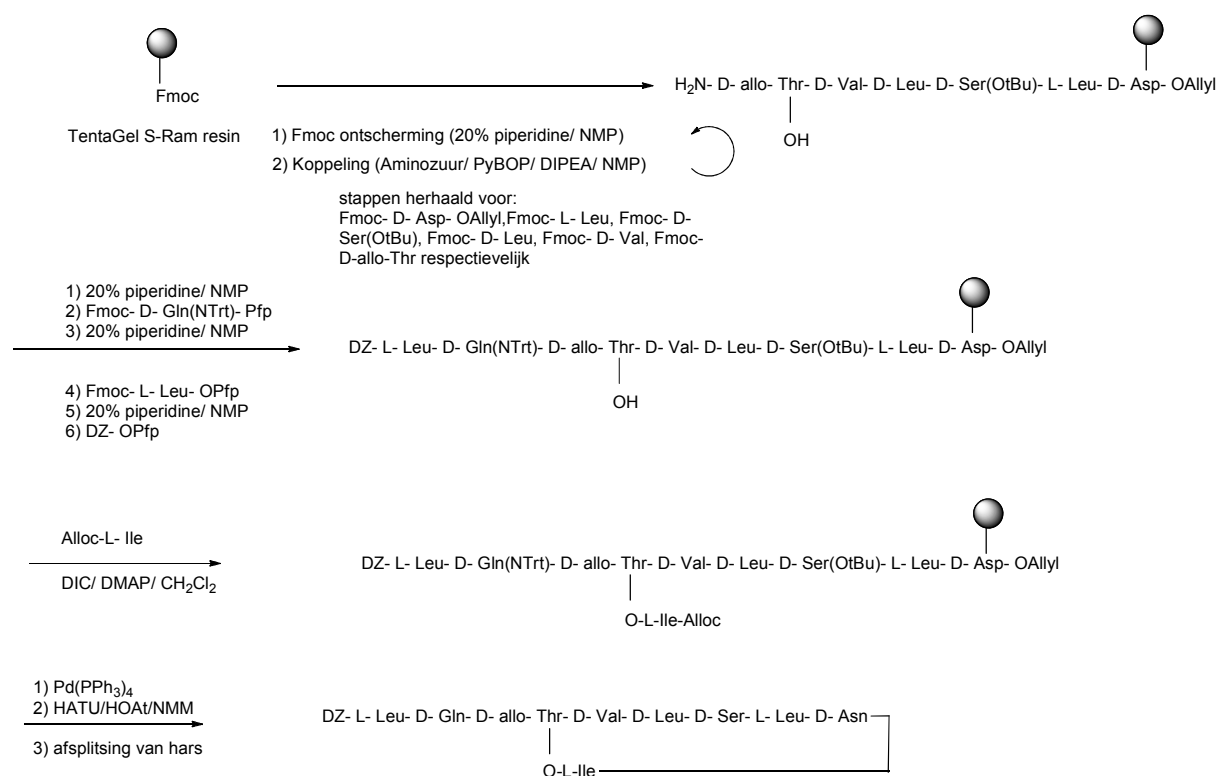
De eerste bouwsteen zal via de zijketen worden vastgehecht aan het TentaGel S Ram hars. Aangezien de synthese van C naar N-terminus verloopt, wordt gezocht naar een beschikbare zijketen voor vasthechting zo dicht mogelijk bij de C-terminus. Als men het peptide optekent met de N-terminus links en de C-terminus rechts, dan stelt men vast dat Ser8 als meest preferentiële positie naar voren komt als aanhechtingspunt. (figuur 2.11)



Figuur 2.11 Mogelijke posities voor vasthechting zijketen

Er werd gekozen om de zijketen vast te hechten via een carbonzuur eerder dan via een alcoholfunctie en aldus (zie deel 2.2.3) werd besloten om de Ser8 te vervangen door een Asp8. Vermits deze een amidebinding vormt op het TentaGel S Ram hars, zal men na afsplitsing uiteindelijk een Asn residu verkrijgen. Deze keus werd gemaakt om in eerste instantie aandacht te kunnen besteden aan de problematiek van de peptidesynthese en de ringsluiting zonder dat er rekening dient gehouden te worden met de mogelijke extra complicaties die een alcoholaanhechting met zich meebrengt.

Daarnaast is er ook een tweede modificatie aan het eindproduct die doorgevoerd wordt omwille van tijdsbeperkingen. In plaats van R-3-hydroxydecaanzuur wordt in deze route gebruikt gemaakt van decaanzuur. β -hydroxydecaanzuur is enkel beschikbaar als een racemisch mengsel en de tijdsduur van dit project liet een langdurige opzuivering tot het enantiozuivere product (via herkristallisatie met een chiraal organisch kation) in eerste instantie niet toe. Deze laatste modificatie verandert niets aan de werkwijze. Zo bekomt men de route die weergegeven wordt in figuur 2.12.



Figuur 2.12 Syntheseroute naar analogen van pseudodesmine A

De synthese wordt gestart met de aanhechting van het carbonzuur (van de zijketen) van D-Asp-OAllyl aan het hars. Bescherming van het carbonzuur in de hoofdketen is hiervoor noodzakelijk. Dit wordt beschermd met een Allyl-groep die selectief verwijderd kan worden net voor de finale sluiting.

De vijf volgende aminozuren zullen worden gekoppeld door gebruik te maken van standaard Fmoc-ontscherming (20% piperidine/NMP) en standaard koppelingsmethoden (PyBOP/DIPEA/NMP). Na de koppeling van Fmoc-D-allo-Thr zullen we gebruik maken van het gepreactiveerde Fmoc-D-Gln(NTrt)-OPfp om uitsluitend koppeling op de vrije -NH₂ groep te bekomen en niet op de vrije -OH groep. Om L-Leu en DZ te koppelen wordt omwille van dezelfde reden gebruik gemaakt van hun gepreactiveerde vorm (respectievelijk Fmoc-L-Leu-OPfp en DZ-OPfp)

Het laatste aminozuur, Alloc-Ile, wordt aangehecht via een esterbinding met het alcohol van D-allo-Thr waarbij gebruik wordt gemaakt van DIC/DMAP. De laatste en wellicht moeilijkste stap is de ringsluiting, door de vorming van een amidebinding tussen Alloc ontschermd L-Ile9 en Allyl-

ontschermde D-Asp8. Met behulp van $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ kunnen deze beide beschermende groepen selectief verwijderd worden [39] waarna met behulp van HATU/HOAt/NMM de molecule kan gecycliseerd worden. Finale afsplitsing van het hars kan dan gebeuren met een 95% TFA oplossing.

In het preliminaire werk (uitgevoerd door A. Malinowska) werd enkel de koppeling van de eerste zes aminozuren bereikt. Deze route zal worden voortgezet op het hexapeptide dat in het voorgaand onderzoek werd gesynthetiseerd.[6] In hoofdstuk 7 zal de synthese *ab initio* herhaald worden waarbij ook de mogelijkheid tot gedeeltelijke automatisatie zal worden onderzocht.

2.3.2 Onderzoek naar zelfassociatiegedrag van analogen van pseudodesmine A

Nadat het pseudodesmine A analoog is gemaakt, zal dit met NMR onderzocht worden. Een NMR-spectrum van deze molecule zal worden opgenomen in zowel een polair (CH_3CN) als een apolair solvent (CDCl_3). Met deze spectra krijgt men niet alleen een idee over de zuiverheid van de molecule, maar men zal ook kunnen onderzoeken of dit analoog eveneens zelfassociatiegedrag vertoont in apolair milieu. Hiermee kan meteen de impact van de modificaties op de totale conformatie onderzocht worden.

Hoofdstuk 3: Gebruikte materialen en methoden

3.1 Synthese van peptiden op vaste drager

Peptidesynthese op vaste drager werd oorspronkelijk ontwikkeld door Merrifield in 1963.[40] Sindsdien is deze synthese op vaste fase steeds verder ontwikkeld en uitgegroeid tot een van de meest gebruikte methoden om oligopeptiden te maken.[41]

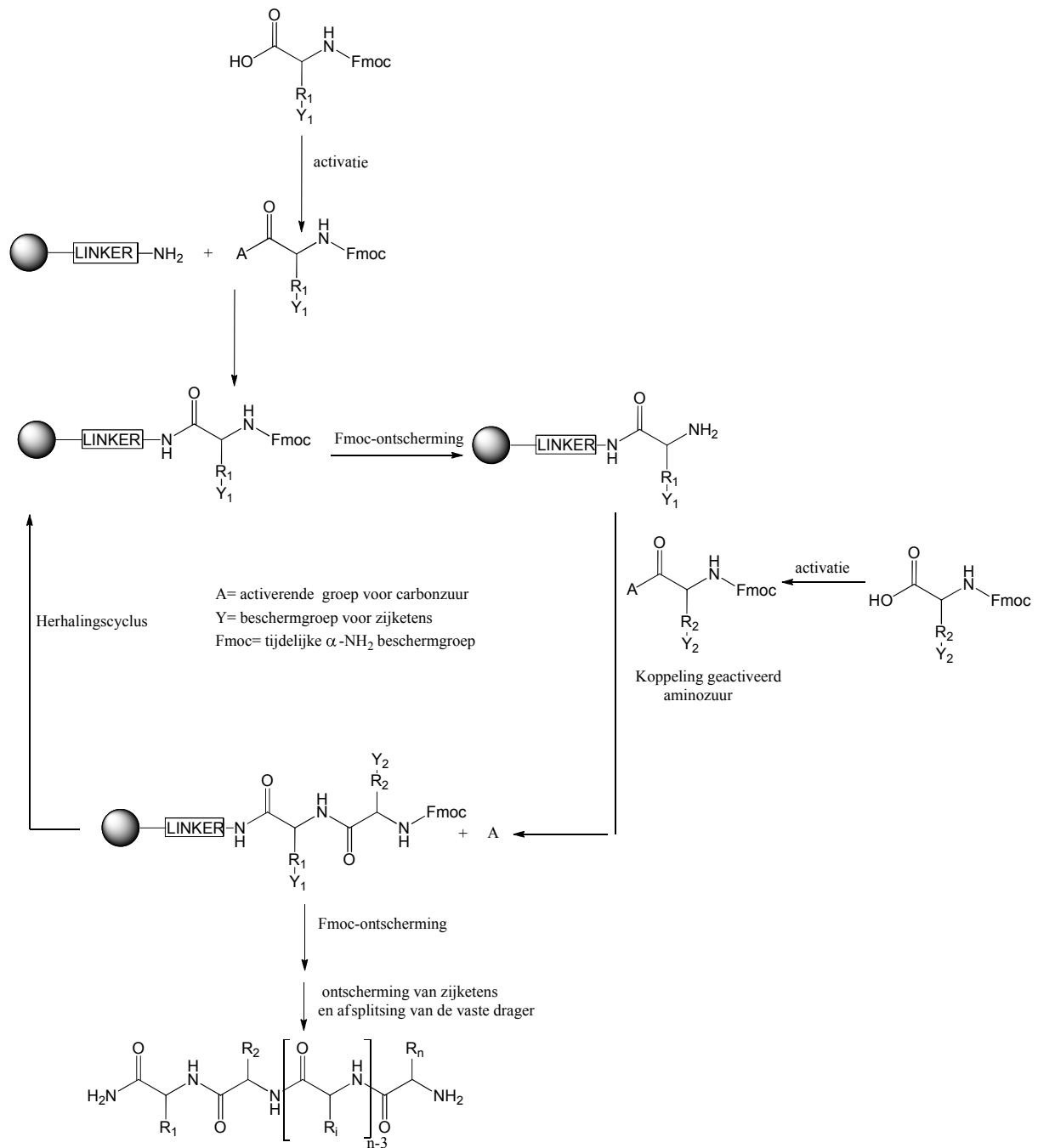
Bij synthese op vaste fase is het peptide gebonden op een onoplosbare drager. Het grote voordeel ten opzichte van synthese in oplossing, is dat men een overmaat aan reagentia kan gebruiken om de reacties volledig te doen aflopen, waarbij ongereageerde reagentia verwijderd worden door eenvoudige filtratie en wasprocedures. De eenvoudige procedure laat automatisatie toe, waardoor de benodigde tijd voor de synthese sterk vermindert. Hiervoor is het wel noodzakelijk dat elke individuele stap verloopt met een hoog rendement. Tot slot is er ook nog het voordeel van het pseudoverdunningseffect bij cyclisatie van peptiden op het hars.

Een belangrijk nadeel is dat de synthese op vaste drager moeilijk op te volgen is: het is immers niet mogelijk het reactieverloop te volgen of de zuiverheid te analyseren met bijvoorbeeld TLC of LC-MS. De ontwikkeling van kleurtesten komt hier in zekere mate aan tegemoet, maar meestal zal men een proefafsplitsing op kleine schaal moeten uitvoeren om dit materiaal dan te onderwerpen aan LC-MS analyse. Een ander nadeel is dat het niet mogelijk is om nevenproducten, die ontstaan op vaste fase, tussendoor te verwijderen. Opzuivering met HPLC na finale afsplitsing van het hars kan dit meestal oplossen.

Bij peptidesynthese op vaste fase wordt het aminozuur doorgaans vastgehecht met zijn C-terminus aan het hars terwijl de N-terminus tijdelijk beschermd wordt. De synthese zal dan doorgaan van de C-terminus naar de N-terminus. Dit is omgekeerd aan de ribosomale synthese, waarbij de ketenverlenging plaatsvindt van de N- naar de C-terminus. Peptidesynthese bestaat uit repetitieve cyclussen van als eerste een ontscherming van de N^α-beschermgroep en als tweede de koppeling van het volgende beschermde aminozuur. De functionele groepen van de zijketens worden ook beschermd, zodanig dat enkel de gewenste functionele groepen met elkaar kunnen reageren.[42]

In figuur 3.1 wordt dit uitgewerkt voor een hars van het type TentaGel S Ram met een Fmoc-groep als tijdelijke α-NH₂-beschermgroep. Het eerste aminozuur wordt verankerd aan het hars met vorming van een amidebinding. Vervolgens wordt N^α-beschermgroep verwijderd waardoor het vrije -NH₂ in de volgende stap kan reageren met de carbonzure groep van een volgende N^α-beschermde aminozuur, dat voordien reeds geactiveerd werd. Voor deze activatie bestaan verschillende manieren, waarvan er een aantal worden besproken in paragraaf 3.3. Deze twee stappen worden herhaald tot het laatste aminozuur is gekoppeld. Hierna volgt een Fmoc-ontscherming en wordt het peptide van het hars gesplitst. Bij dit hars zal dit gebeuren door het hars in contact te brengen met een 95:5 TFA:H₂O mengsel, waarbij simultaan ook de zijketen bescherming wordt opgeheven.

Over het algemeen geldt dat synthese op vaste fase het meest relevant is wanneer men een aantal milligram van een peptide wil verkrijgen. Voor industriële synthese waarbij men kilogram hoeveelheden nastreeft, is synthese in oplossing de beste keuze.[42]



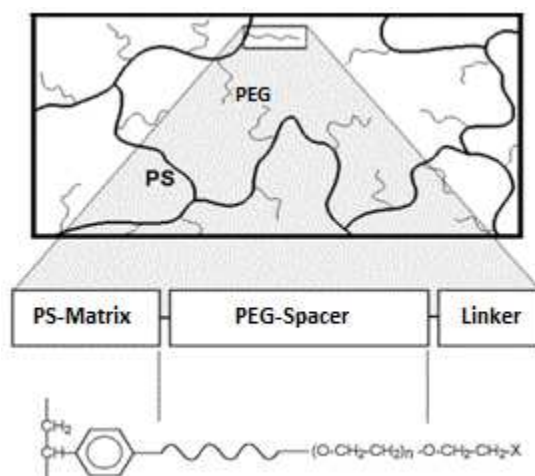
Figuur 3.1 Algemene strategie voor lineaire peptidesynthese op vaste fase. Gebaseerd op [42]

3.2 De vaste drager

Als vaste drager werd gekozen voor het TentaGel S Ram hars.[6] Dit hars is een graft-copolymeer, waarbij PEG geënt werd op DVB-vernet polystyreen. Het gewichtsprocent van de PEG-spacer ligt tussen de 50% en 70%. De PEG-tentakels zijn aan hun uiteinden verbonden met een linker. (figuur 3.2)

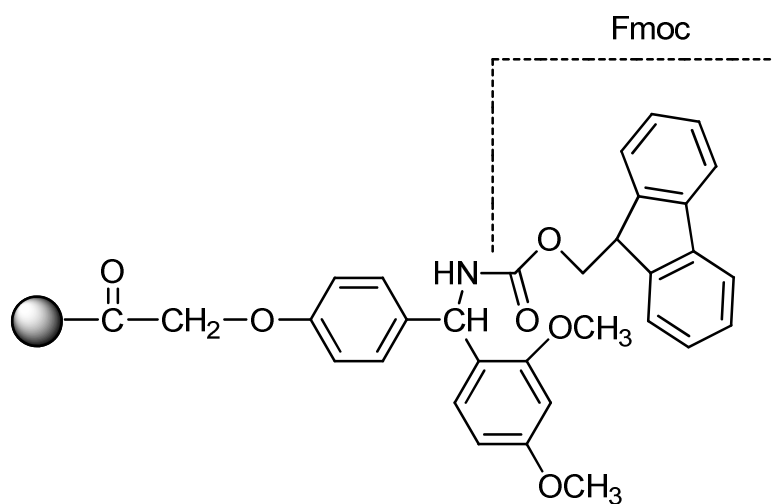
TentaGel harsen combineren de eigenschappen van de goede oplosbaarheid van de PEG-spacer met de robuuste en onoplosbare polystyreenmatrix. Hierdoor wordt een stabiel hars bekomen met een unieke flexibiliteit en zwellingeigenschappen. Dit hars zwelt in een divers aantal polaire en apolaire solventen waardoor men reacties in verschillende solventen kan uitvoeren. Een ander voordeel is dat

de peptidesynthese plaatsvindt aan het uiteinde van de flexibele PEG-tentakels, welke een goede flexibiliteit en solvatatie hebben, zodat reacties in quasi homogene omstandigheden doorgaan.[43]



Figuur 3.2 Opbouw van een TentaGel hars

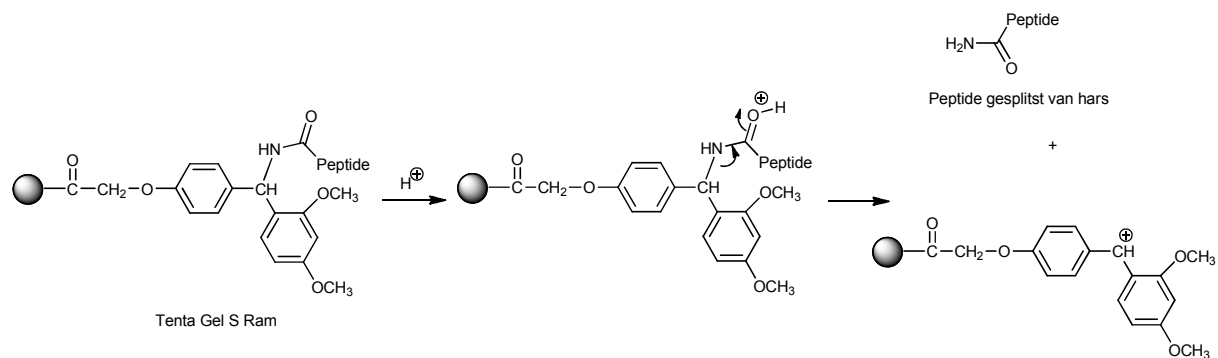
Om het peptide te verankeren maar ook weer los te maken van de vaste drager, wordt gebruik gemaakt van een linker. In ons geval wordt gebruik gemaakt van de zuurgevoelige “S-Ram”-linker. De structuur van de aangekochte TentaGel S Ram hars is weergegeven in figuur 3.3. Na Fmoc-ontscherming verkrijgt men een vrije amine functionaliteit waaraan de aanhechting van het eerste aminozuur plaatsvindt.



Tenta Gel S Ram

Figuur 3.3 TentaGel S Ram (Fmoc-beschermd)

De linker speelt ook een belangrijke rol bij de afsplitsing van het finale peptide. Om het peptide af te splitsen gebruikt men een 95:5 TFA:H₂O mengsel. Bij de afsplitsing wordt een benzhydryl carbokation gevormd zoals aangegeven in figuur 3.4. Dit carbokation wordt door resonantie gestabiliseerd door de twee aromatische ringen en methoxy substitutie in ortho en parapositie.



Figuur 3.4 Mechanisme voor de afsplitsing van het peptide van de vaste drager

3.3 Beschermgroepen

Voor de gecontroleerde synthese van peptiden is de bescherming van de functionele groepen een must. Het is duidelijk dat het noodzakelijk is om de functionele groepen die niet betrokken zijn in de gewenste amidebindingsvorming tijdelijk te blokkeren (= te beschermen). [42]

In het algemeen, zijn er drie types bescherming vereist. Ten eerste dient men de N^{α} -amine groep van het te koppelen aminozuur te beschermen. Men spreekt van “tijdelijke” bescherming omdat deze beschermgroep hierna meteen verwijderd wordt voor de koppeling van het volgende aminozuur.

Het tweede type heeft betrekking op de bescherming van de zijketens. Aminozen die in hun zijketen een functionele groep hebben worden zo beschermd voor zijreacties. Deze beschermgroepen moeten kunnen weerstaan aan de condities die gebruikt worden bij de herhaaldelijke ontscherming van de N^{α} -beschermgroep. Daarom worden zij “permanente” beschermgroepen genoemd, hoewel zij na de laatste koppeling ook selectief ontschermd kunnen worden.

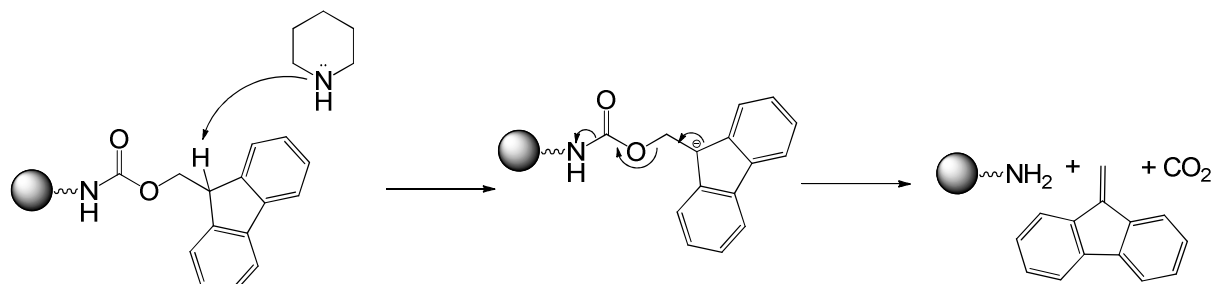
Het derde type is de beschermgroep voor de C-terminus. De grote bijdrage van Merrifield situeert zich hier. Merrifield introduceerde immers een polymeerhars als beschermgroep, met als gevolg dat peptidesynthese kan uitgevoerd worden op een onoplosbare drager. (zie 3.2)[40, 42] In de synthese beschreven in dit werk zal de vaste drager echter aan het carbonzuur van een zijketen worden vastgehecht, terwijl het carbonzuur van de hoofdketen beschermd wordt met een Allyl-groep.

Zeer belangrijk is dat deze verschillende beschermgroepen onderling compatibel zijn, zodanig dat beschermgroepen van het ene type verwijderd kunnen worden zonder de beschermgroepen van het andere type aan te tasten. Als dit het geval is dan spreekt men van orthogonale bescherming.[42] In wat volgt worden de 3 gebruikte orthogonale beschermgroepen besproken

3.3.1 Fmoc-beschermgroep voor tijdelijke N^{α} -bescherming

In dit werk wordt gebruik gemaakt van een Fmoc-strategie. Dit betekent dat men een Fmoc-groep als tijdelijk α -aminebeschermgroep gebruikt. En andere mogelijkheid is de Boc-strategie. Het nadeel van deze laatste strategie is dat deze het gebruik van waterstoffluoride vereist, een reagens dat men om veiligheidsoverwegingen liever vermijdt.

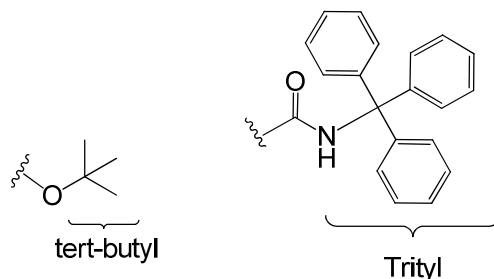
Fmoc-beschermd aminozuren kunnen commercieel aangekocht worden. De aminegroep wordt beschermd als een carbamaat en kan ontschermd worden met behulp van een base. De meest gebruikte procedure is een 20% piperidine oplossing in DMF. [44] Het mechanisme van de Fmoc-ontscherming wordt voorgesteld in figuur 3.5.



Figuur 3.5 Fmoc-ontschermingsmechanisme

3.3.2 Bescherming van de zijketens

Wanneer de Fmoc-groep gebruikt wordt als tijdelijke beschermgroep, dan wordt meestal gekozen voor de tert-Butyl-groep als zijketenbeschermgroep. [41, 42, 44] In dit werk wordt de alcoholfunctie van Ser zo beschermd. De zijketen van Gln wordt beschermd met een Trityl-groep. Beiden zijn zuurgevoelige groepen. De aangewezen condities voor ontscherming zijn respectievelijk 90% en 1% TFA in waterige oplossing. [44] In dit werk zal er echter gebruik worden gemaakt van 95:5 TFA:H₂O als ontschermingsconditie, aangezien de ontscherming van de zijketens simultaan met de afsplitsing van het hars gebeurt.



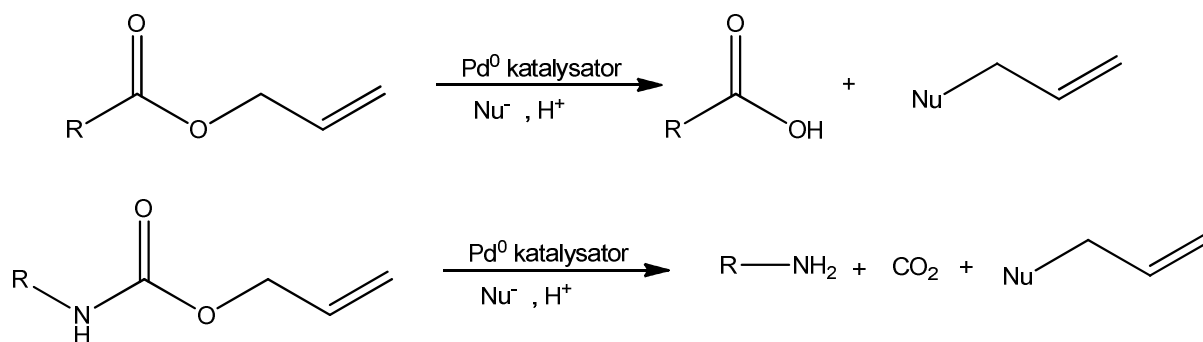
Figuur 3.6 Bescherming van de zijketens

3.3.3 Allyl en Alloc-bescherming

De in dit werk gebruikte synthestrategie vereist het gebruik van een derde orthogonale beschermgroep. De meest voor de hand liggende keuze is Alloc- (en allyl) bescherming.[22] Deze groepen zijn compatibel met de zure en basische ontschermingscondities, die respectievelijk vereist zijn voor zijketen en Fmoc-ontscherming.

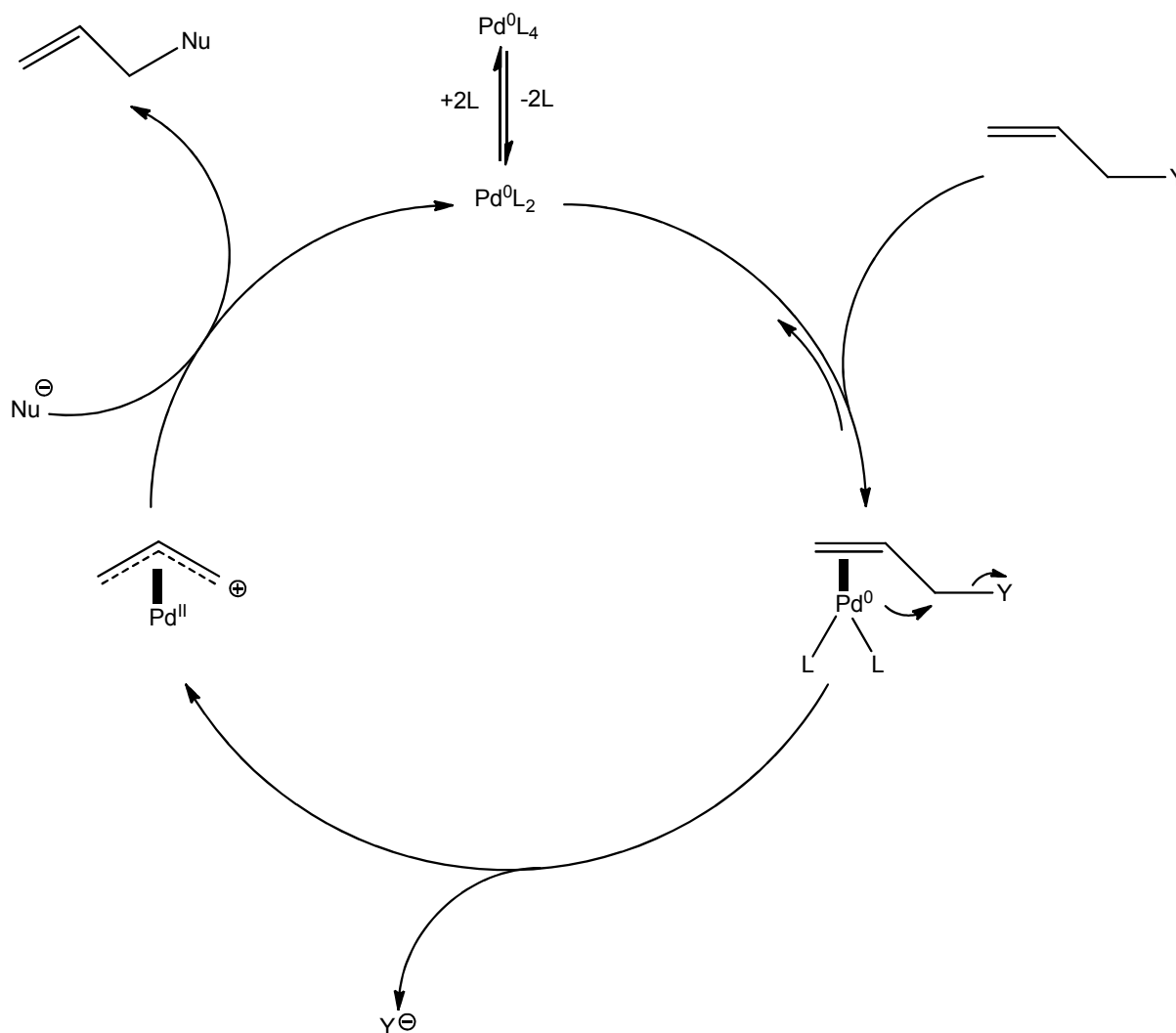
De Allyl en Alloc-groep kunnen selectief verwijderd worden met behulp van een Pd-katalysator en een nucleofiele scavenger. In sommige omstandigheden kan deze scavenger ook Fmoc-ontscherming veroorzaken, maar het is mogelijk om condities te ontwikkelen waarbij dit niet gebeurt, zodat Allyl en Alloc perfect orthogonaal zijn met de Fmoc/tBu-strategie. [38] Dit laat het gebruik van Allyl en Alloc-beschermgroepen toe in een ruime chemische context, waarbij respectievelijk een carbonzuur en een amine beschermd worden. [38, 39, 45-47]

Er bestaan verschillende procedures en reagentia om deze groepen selectief te verwijderen, maar aangezien het zoeken naar de meest ideale procedure niet binnen de doelstelling ligt van deze thesis wordt gebruik gemaakt van een betrouwbare methode, die vaak wordt toegepast in de onderzoeksgroep. [39]



Figuur 3.7 Boven: Allylontscherming, onder: Alloc ontscherming

Algemeen verlopen een Allyl en een Alloc ontcherming zoals voorgesteld in figuur 3.8.

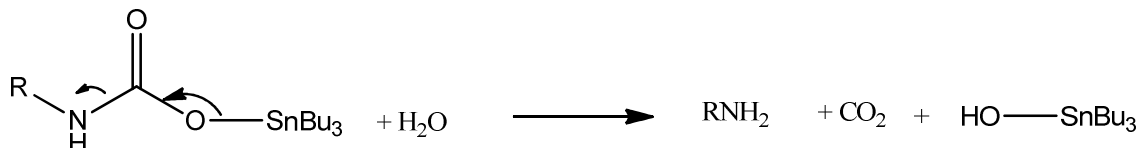


Figuur 3.8 Vermoedelijk mechanisme voor Allyl en Alloc-ontscherming. Overgenomen uit [38]

Als katalysator wordt tetrakis(trifenyfosfine)palladium(0) gebruikt, maar de eigenlijke katalysator is het onverzadigde bis(trifenyfosfine)palladium(0)-complex. De katalytische cyclus omvat twee belangrijke stappen. In de eerste stap, na coördinatie van de dubbele binding, gebeurt een oxidatieve additie waarbij Y wordt uitgestoten als leaving groep. In dit proces wordt een π -allylcomplex gevormd en stijgt de oxidatietoestand van Pd^0 naar Pd^{2+} .

In de tweede stap van de cyclus, een reductieve eliminatie, valt een nucleofiel aan op het π -allylcomplex; hierbij wordt het oorspronkelijke katalytische complex hersteld. Dit nucleofiel wordt ook de scavenger genoemd. Hierbij dient opgemerkt dat in het geval van een Alloc-ontscherming er een amine ontstaat dat eveneens als nucleofiel kan optreden, waarbij een stabiel allylamine wordt gevormd. Om dit te vermijden wordt een overmaat aan scavengers (tributyltinhydride en morfoline) toegevoegd.

Wanneer men gebruikt maakt van Bu_3SnH als scavenger bij de Alloc ontscherming, dan ontstaat in de katalytische cyclus het tributyltincarbamaat. (figuur 3.9) De aanwezigheid van een protondonor is vereist voor de finale afwerking met vorming van het amine.[48] Als protondonor kan H_2O gebruikt worden, aanwezig als vocht in (niet gedroogde) DCM.



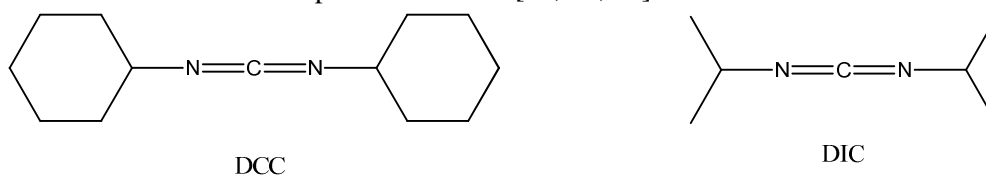
Figuur 3.9 Finale afwerkingsstap met water als protondonor

3.4 Koppelingsmethoden

Om een amidebinding te vormen, wordt de C-terminus omgezet in een meer reactieve groep, zodanig dat de α -aminegroep hier een nucleofiele substitutie op kan uitvoeren. Als activator wordt een koppelingsreagens gebruikt, waardoor het rendement en de reactiesnelheid enorm vergroot worden. Een aantal koppelingsmethoden worden hier besproken.

3.4.1 Carbodiimides

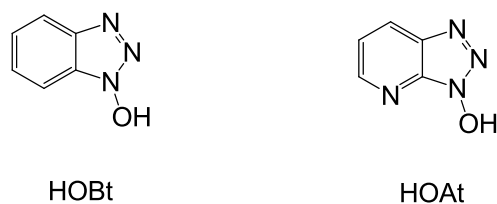
Carbodiimides behoren tot de meest populaire activeringsreagentia. Het meest gekende voorbeeld is DCC. Dit heeft wel als nadeel dat tijdens de activering het onoplosbare dicyclohexylureum wordt gevormd. Daarom wordt bij synthese op vaste drager steeds meer DIC gebruikt, waarvan het ureumnevenproduct beter oplosbaar is in organische solventen. Bij het gebruik van DCC en DIC stelt men wel vaak het voorkomen van epimerisatie vast. [42, 49, 50]



Figuur 3.10 carbodiimides

3.4.2 Actieve esters

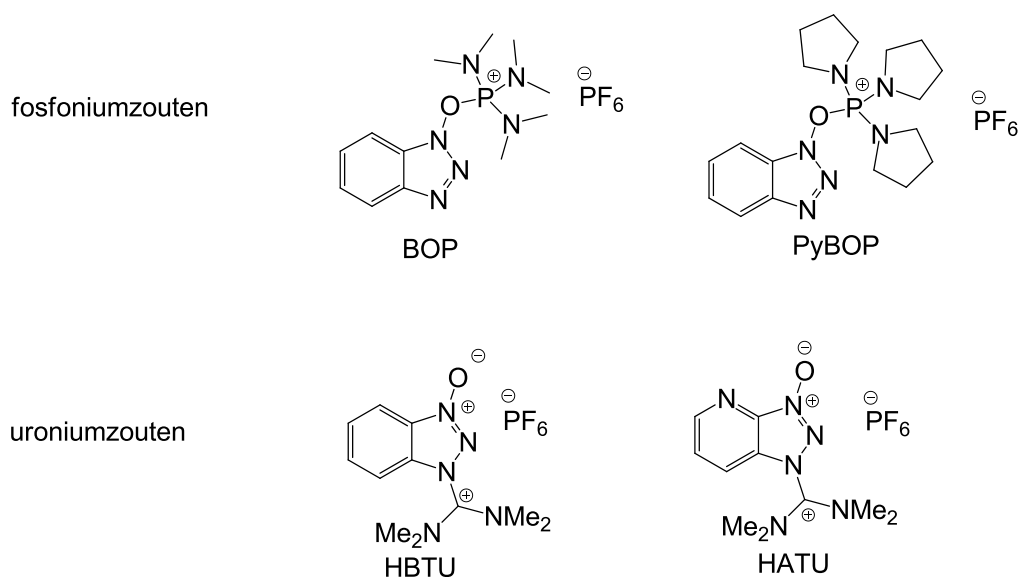
Veel zijreacties die voorkomen bij carbodiimides kunnen vermeden worden door additieven toe te voegen zoals HOBt of HOAt die het carboxylaat omzetten in een actieve ester. Deze koppelingsreagentia versnellen de reactie aanzienlijk en verminderen problemen met epimerisatie. HOAt is iets reactiever dan HOBt. Dit komt doordat de pyridine stikstof van HOAt via waterstofbrug interactie het α -amine helpt om het actieve ester aan te vallen. Men spreekt ook van intramoleculaire assistentie.



HOBt HOAt
Figuur 3.11 Additieve koppelingsreagentia

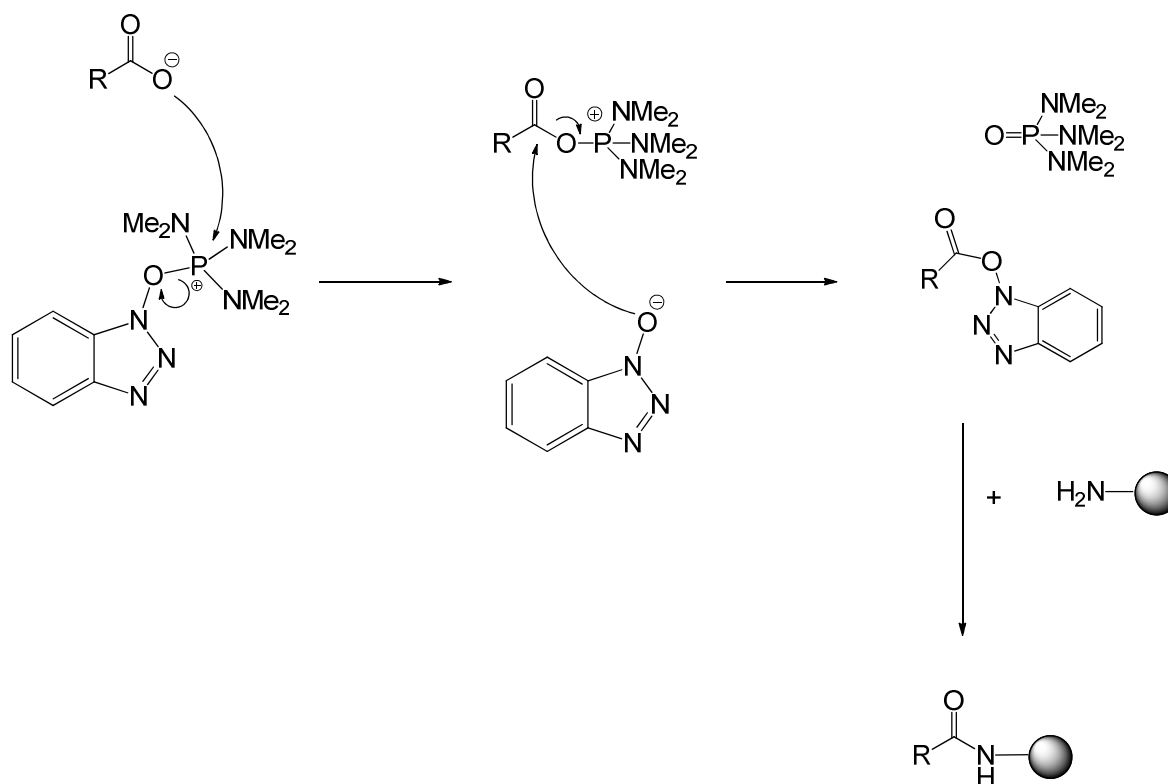
3.4.3 Koppelingsreagentia

Het nadeel van de actieve esters is dat zij een voorafgaande activatie vereisen. Daarom werden nieuwe *in situ* reagentia ontworpen. De meeste ervan zijn gebaseerd op de fosfonium- en uroniumzouten van HOBt en HOAt. Deze geven aanleiding tot erg snelle koppelingen, zelfs met sterisch gehinderde aminozuren.



Figuur 3.12 Representatieve fosfonium en uroniumzouten

Het BOP reagens wordt vervangen door het PyBOP reagens omdat bij BOP het kankerverwekkende hexamethylfosfortriamide wordt gevormd. Een tertiaire base wordt toegevoegd om de carboxylgroep te deprotoneren, waarna het carboxylaat het fosfonium of uroniumzout aanvalt. Zo wordt het reactieve acyloxyfosfoniumzout gevormd en het oxyanion van HOBt. Het oxyanion zal vervolgens aanleiding geven tot de OBt-ester waarop het α -amine aanvalt met vorming van de amidebinding. (figuur 3.13)



Figuur 3.13 Mechanisme van koppeling met BOP [42]

Voor de uroniumzouten (het is eigenlijk juist om ze amidiniumzouten te noemen[42]) geldt een vergelijkbaar reactiemechanisme. De uroniumzouten zijn iets reactiever dan de fosfoniumzouten bij de koppeling van gehinderde aminozuren of cyclisatie van peptiden.[42] Anders dan de fosfoniumderivaten kunnen uroniumzouten aanleiding geven tot zijreacties. Uroniumzouten kunnen immers ook reageren met het α -amine, waardoor een guanidiniumproduct gevormd wordt en de ketenverlenging stopt. Men kan dit vermijden door het te koppelen aminozuur vooraf te activeren en door geen overmaat koppelingsreagens te gebruiken.[51]

3.5 Kleurtesten

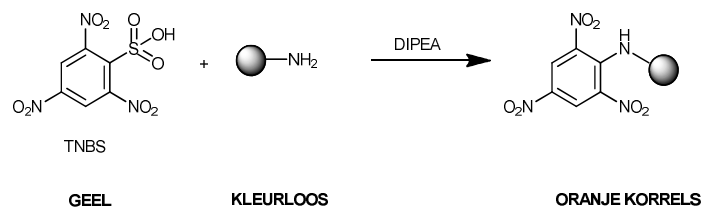
Zoals al eerder vermeld, is het moeilijk om reacties op de vaste drager te volgen. Vooral het opvolgen van de ontscherming en koppeling is zeer belangrijk. Wanneer men reeds een koppeling start als nog niet alle Fmoc-groepen zijn ontschermd, dan krijgt men in een volgende cyclus naast het gewenste peptide ook een deletiepeptide. Dit is een peptide dat één aminozuur mist ten opzichte van het beoogde peptide. Het aflopen van een reactie wordt gekenmerkt door de aan- of afwezigheid van vrije aminefuncties.

In tegenstelling tot reacties in oplossing is het niet mogelijk om vaste fase reacties te volgen met de conventionele technieken zoals TLC, ESI-MS en routine NMR, tenzij een proefafplitsing wordt uitgevoerd op ongeveer 1 mg hars. Daarom werden kleurtesten ontwikkeld die toelaten om de reactie te volgen op slechts enkele korrels. In dit werk wordt gebruik gemaakt van onderstaande kleurtesten.

Deze kleurtesten geven slechts een algemeen idee over de effectiviteit van koppeling en ontschermingsreacties, maar zeggen niets over de zuiverheid of over ongewenste reacties. Om dit te controleren is een proefafplitsing vereist. De meest geschikte analyse die dan uitgevoerd kan worden is LC-MS.

3.5.1 TNBS-test

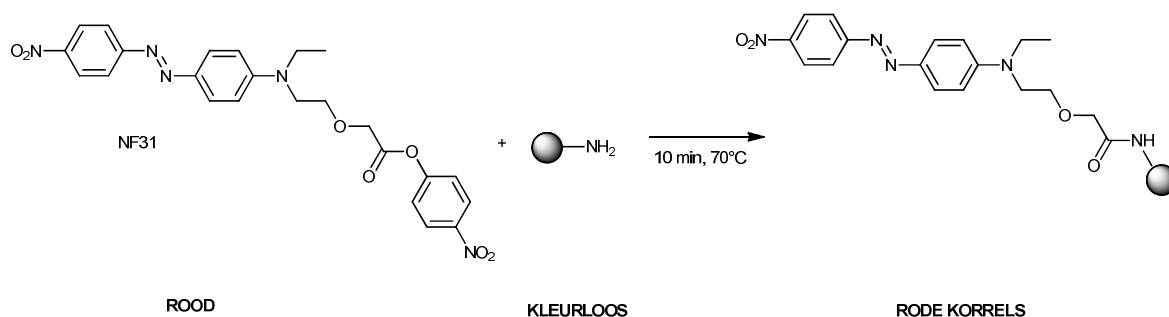
Trinitrobenzeensulfonzuur (TNBS) reageert onmiddellijk met vrije primaire aminefuncties. Wanneer het hars vrije aminefuncties bevat, zullen deze meteen reageren en hierbij zullen de korrels een oranje tot rode kleur krijgen (figuur 3.14). Zijn er geen vrije aminefuncties aanwezig, dan blijven de korrels kleurloos. De test is niet geschikt voor secundaire en sterisch gehinderde amines omdat deze vaak aanleiding geven tot een vals negatief resultaat.[52]



Figuur 3.14 De TNBS-test

3.5.2 NF31-test

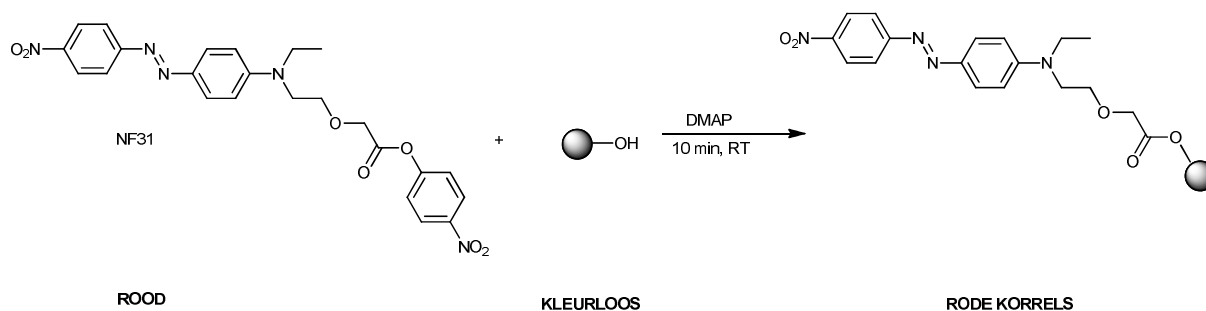
De NF31-test, ontwikkeld in deze onderzoeksgroep, is een meer gevoelige test die ook geschikt is voor de detectie van sterisch gehinderde aminozuren. Deze test is gebaseerd op de reactie tussen vrije aminefuncties op het hars en de para-nitrofenylester van een Disperse Red 1 derivaat. De reactie gaat door bij 70° C. Wanneer de amidebinding gevormd wordt, zullen de korrels rood kleuren. Wanneer geen vrije aminefuncties aanwezig zijn kan de kleurstof niet covalent gebonden worden en blijven de korrels kleurloos. Belangrijk is wel dat de korrels voldoende gewassen worden (om de overmaat aan kleurstof te verwijderen) omdat anders een vals positief resultaat kan ontstaan.[53]



Figuur 3.15 De NF31-test

3.5.3 NF31/DMAP-test

Deze test is een modificatie van de vorige test, ontworpen om vrije alcohol- en thiolgroepen op vaste drager aan te tonen. Voor dit thesisproject is deze kleurtest interessant om de estervorming te kunnen volgen. Vrije alcoholfuncties kunnen met NF31 reageren in de aanwezigheid van DMAP bij kamertemperatuur. Hierdoor kan het alcohol een esterbinding vormen met de rode kleurstof, waardoor de korrels rood kleuren. Korrels zonder vrije alcoholgroep zullen kleurloos blijven. [54]



Figuur 3.16 De NF31/DMAP test

3.6 Toestelspecificaties

ESI-MS spectra werden opgenomen met een LCQ ion trap massaspectrometer, voorzien van een ESI-bron (ThermoFinnigan, San José, Ca,USA) 7.5 µl van het te onderzoeken staal werd geïnjecteerd met een concentratie van ongeveer 1 µg/ml met als eluens H₂O/MeOH in 1/1 verhouding en 0.1% mierenzuur met als stroomsnelheid 0.2 ml/min.

LC-MS data werden opgenomen met een Agilent 1100 Series instrument met een Luna C18(2) kolom (Phenomex, 250*4.6mm, 5 µm, bij 35 °C) en een ESI-detector type VL, met de volgende solventssystemen: 5mM NH₄OAc in H₂O(A) en CH₃CN(B). De kolom wordt twee minuten gespoeld met 100 % A-oplossing, vervolgens wordt een gradiënt gebruikt waarbij men in 15 minuten van 0 (of 75) naar 100% CH₃CN gaat. Tenzij anders vermeld werden alle chromatogrammen gedetecteerd bij 214.20 nm.

De zuiverheid werd bepaald via **RP-HPLC**-analyse, uitgevoerd op een Agilent 1100 toestel met een Phenomex kolom. (250*4.6mm) Luna 5µm C18 100 Å. De kolom werd verwarmd tot 35 °C. Een stroomsnelheid van 1 ml/min werd gebruikt in een gradiënt met de volgende solventssystemen: 0.1 % TFA in H₂O (A) en CH₃CN (B). Voor de analyse werd de kolom tien minuten gespoeld met 100% B gevolgd door 10 minuten 100% A. De analyse werd gestart met 3 minuten 25 % A, waarna men in 15 minuten naar 100 % B gaat. Zodra 100 % B wordt bereikt wordt dit 5 minuten aangehouden. Fracties werden manueel gecollecteerd. Tenzij anders vermeld, werden de getoonde chromatogrammen gedetecteerd bij 214 nm.

Automatische synthese wordt uitgevoerd bij kamertemperatuur met behulp van een robot, uitgerust met een vortex eenheid (Syro II, MultiSyn Tech GmbH). Een Heto Drywinner lyofilisator werd gebruikt in combinatie met een Thermoelectron corporation Savant SPD111V Speedvac concentrator.

Voor intermediaire producten werden **¹H-NMR** en **¹⁹F-NMR** spectra opgenomen in CDCl₃ of in DMSO-d₆ op een Bruker Avance spectrometer uitgerust met een 5mm BBO sonde, die opereert bij 300.13 MHz voor ¹H en bij 282.4 MHz voor ¹⁹F. Om ¹⁹F metingen uit te voeren werd het ¹H detectiekanaal afgestemd op de dichtbijgelegen ¹⁹F frequentie. Alle metingen werden uitgevoerd bij 25°C.

Voor de meting van het eindproduct werd een Bruker Avance II spectrometer aangewend, uitgerust met een 1mm ¹H, ¹³C, ¹⁵N TXI-Z probe die opereert bij 700.13 MHz, 176.05 MHz en 70.94 MHz voor respectievelijk ¹H, ¹³C en ¹⁵N kernen. Spectra werden opgenomen in CD₃CN en CDCl₃ bij 25°C. Acetonitrile-d₃ (99.96%) en CDCl₃ (99.96%) werden aangekocht bij Eurisotop.

3.7 Productspecificaties

Het TentaGel S Ram hars en de gebruikte aminozuren werden aangekocht bij Iris Biotech GmbH. Decaanzuur werd aangekocht bij Sigma-Aldrich. De koppelinsreagentia HOBt en HBTU zijn afkomstig van Iris Biotech GmbH. DIC en HOAt werden aangekocht bij Sigma-Aldrich. HATU werd gekocht bij Merck en DMTMM Cl en DMTMM BF₄ werden gekocht bij Fluka analytical.

NMM, DMAP, MeIm, pyridine, morfoline en NHS werden aangekocht bij Acros Organics. DIPEA, piperidine, Pd⁰(PPh₃)₄ en pentafluorofenyltrifluoroacetaat zijn afkomstig van Sigma-Aldrich. Allylchloroformaat en tributyltinhydride werden gekocht bij Fluka, terwijl TFA en triisopropylsilaan afkomstig zijn van Iris Biotech GmbH.

DMF extra droog en met moleculaire zeven werd aangekocht bij Acros Organics. DMF en NMP werden gekocht bij BioSolve. MeOH, EtOAc en MTBE en DCM werden verkregen bij Sigma-Aldrich. DCM werd gedroogd door destillatie over CaH_2 .

Hoofdstuk 4: Synthese van individuele gemodificeerde bouwstenen

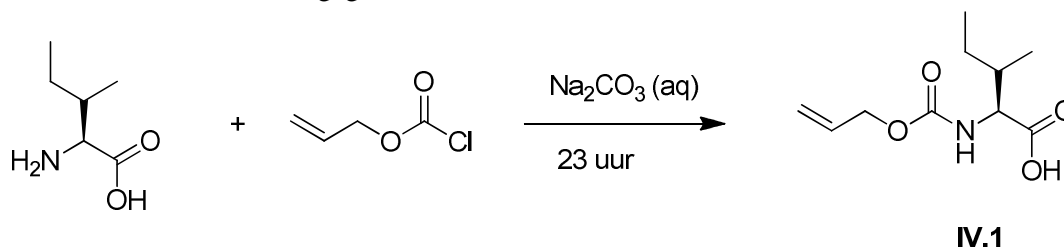
Vooraleer aan de synthese kan begonnen worden, dienen eerst een aantal bouwstenen gesynthetiseerd te worden. Als men de route bekijkt die in deel 2.3 wordt voorgesteld (zie figuur 2.10) dan stelt men vast dat deze het gebruik van een aantal gepreactiveerde bouwstenen impliceert. Deze zijn respectievelijk Fmoc-L-Leu-OPfp, Fmoc-D-Gln(NTrt)-OPfp en decaanzuur-OPfp. Enkel de eerste hiervan is commercieel beschikbaar. Eerdere pogingen van Anna Malinowska om Fmoc-D-Gln(NTrt)-OH te activeren bleken onsuccesvol. [6]

Ook Allyloxycarbonyl beschermd isoleucine (Alloc-Ile) is niet commercieel beschikbaar. Uitgaande van Ile werden door Anna Malinowska een aantal pogingen ondernomen om deze bouwsteen te maken, helaas met een te lage zuiverheid en rendement. [6] Dus ook voor deze bouwsteen dient eerst een efficiënte synthese ontwikkeld te worden.

4.1 Allyloxycarbonyl beschermd isoleucine (Alloc-Ile)

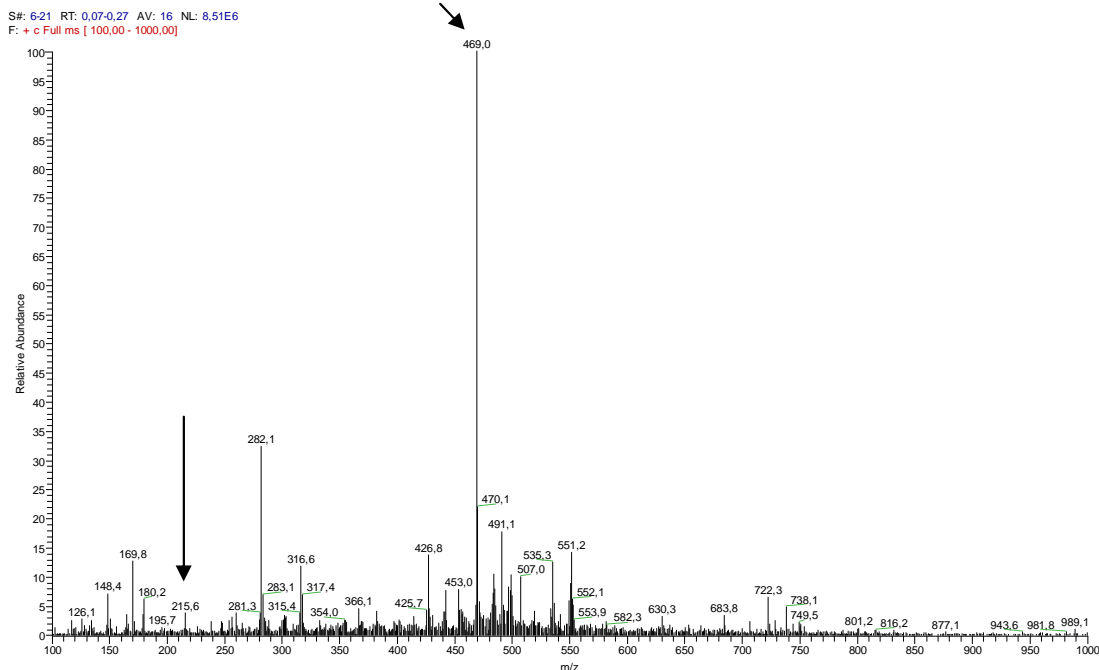
4.1.1 Eerste poging voor synthese van Alloc-Ile

Een eerste poging die ondernomen werd voor de synthese van Alloc-Ile (**IV.1**) was gebaseerd op de Alloc-bescherming van L-Asparaginezuur zoals beschreven door Shibata. [55] De reactietijd (figuur 4.1) bedroeg 23 uur in plaats van de voorgeschreven 12 uur, daar via TLC bleek dat de reactie na 12 uur onvoldoende was doorgegaan



Figuur 4.1 Vorming van Alloc-Ile

Na aanzuring tot pH=1 en afwerking door extractie werd een wit product bekomen dat onderworpen werd aan ESI-MS. Het bekomen massaspectrum (figuur 4.2) bevat een kleine piek bij $m/z = 215.6$ die afkomstig is van $[\text{IV.1}+\text{H}]^+$ en een grote piek bij $m/z = 469.0$

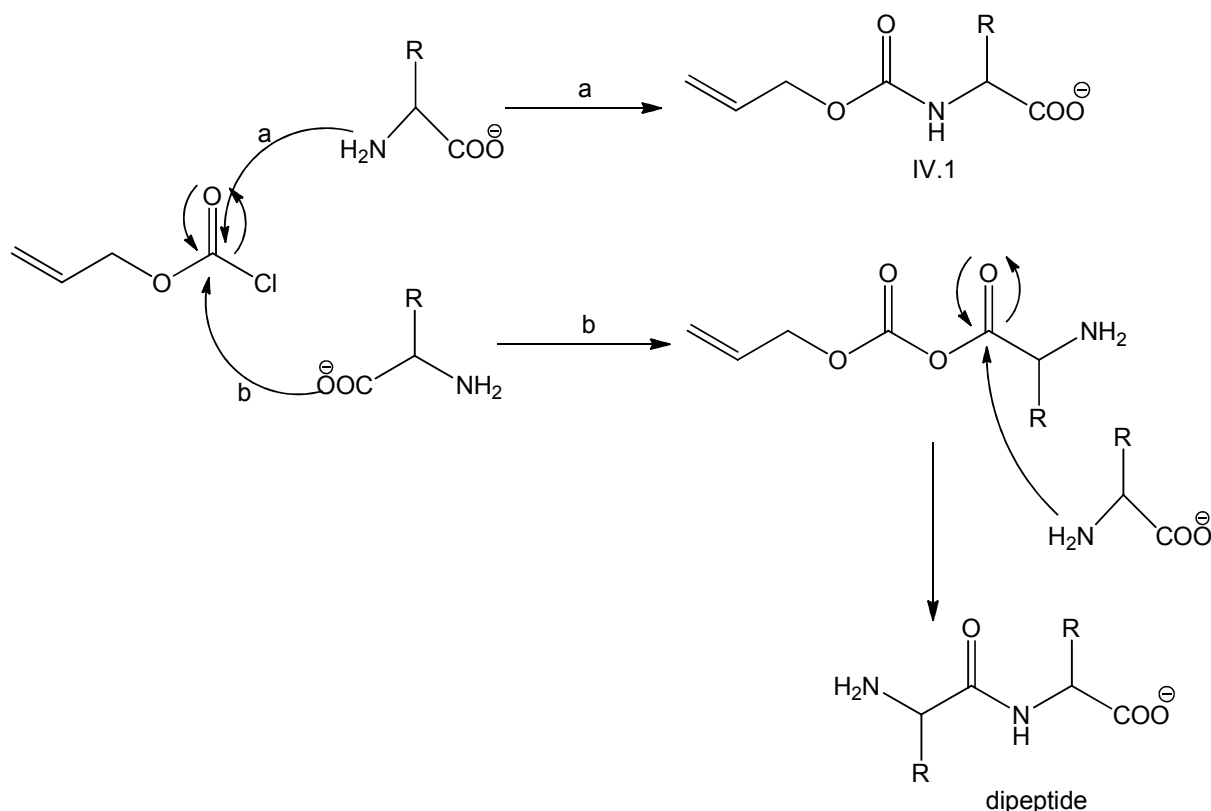


Figuur 4.2 Massaspectrum van IV.1 bekomen met ESI-MS. De piek bij $m/z=169.8$ en 282.1 waren reeds aanwezig in het systeem. De besproken massa's werden met een pijl aangeduid.

Omwille van de correlatie tussen de intensiteit van de piek en de ionisatie-efficiëntie van de molecule mogen we deze data niet gebruiken voor kwantitatieve vergelijkingen. Toch kunnen we vermoeden dat IV.1 slechts als zijproduct werd gevormd. Vermoedelijk behoort de piek bij $m/z=469$ toe aan het tetrapeptide van L-Ile. Deze veronderstelling wordt ondersteund door andere voorbeelden beschreven in de literatuur waarbij tijdens de bescherming van een α -amine via een chloroformaat ook het vrije α -carbonzuur kan interferen in de reactie en bijvoorbeeld kan leiden tot de vorming van dipeptiden.[44, 56] Een voorstelling van het veronderstelde mechanisme van de reactie wordt weergegeven in figuur 4.3.

Naast de gewenste Alloc-bescherming (a) kan ook het dipeptide gevormd worden door de aanval van het carboxylaatanion op de carboxylgroep van het allylchloroformaat (b). Hierbij wordt een gemengd anhydride (en tevens geactiveerd carbonzuur) gevormd waarop een aminozuur kan aanvallen met de vorming van het dipeptide tot gevolg. Dit dipeptide zelf kan verschillende reacties ondergaan: het kan Alloc-beschermd worden maar eveneens reacties met vorming van het tri- of tetrapeptide zijn mogelijk gezien de verlengde reactieduur. Dat enkel het tetrapeptide geïsoleerd werd is mogelijk te wijten aan de aanzuring tot $pH=1$ en de extractie. Deze procedure wordt uitgevoerd om ongereageerd Ile en andere reagentia af te zonderen van het gewenste product. Vermoedelijk laat deze procedure wel toe dat het tetrapeptide mee naar de organische fase gaat.

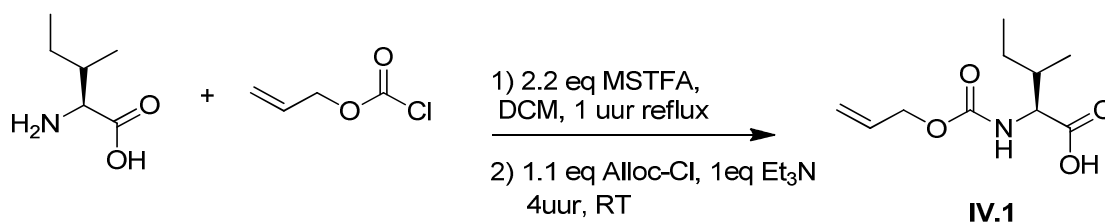
In de geciteerde review worden twee soorten oplossingen voorgesteld: de eerste methode gebruikt een carbonzure beschermgroep die verwijderd wordt bij de aminebescherming. De tweede methode impliceert het gebruik van minder reactieve elektrofielen. Een voorbeeld van de eerste methode is het in situ gebruik van trimethylsilylesters van aminozuren, terwijl het gebruik van N-hydroxysuccinimido-derivaten een voorbeeld is van de tweede methode. [44] Deze methoden worden beiden uitgetest in 4.1.2 en 4.1.3.



Figuur 4.3 Dipeptidevorming bij Alloc-bescherming van een aminozuur. Gebaseerd op [56]

4.1.2 Tweede poging voor synthese van Alloc-Ile

In de tweede poging werd het carbonzuur tijdelijk beschermd als een trimethylsilylester, waarna het α -amine wordt beschermd met de Alloc-groep. (figuur 4.4) [57] De carbonzure beschermgroep wordt daarna verwijderd met MeOH.

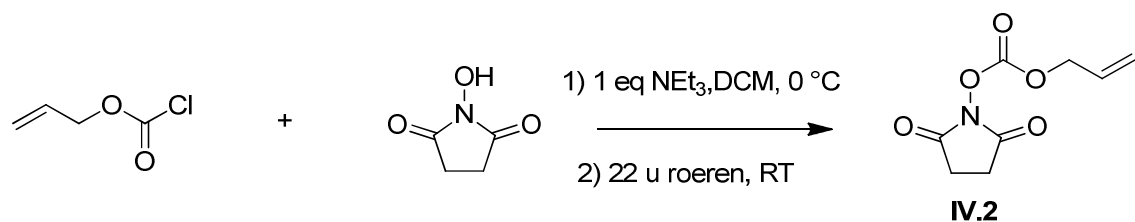


Figuur 4.4 Vorming van Alloc-Ile

Er werd geen eindproduct bekomen. Alle fracties opgevangen met kolomchromatografie werden onderzocht, maar geen van allen bevatte IV.1. Er werd vastgesteld dat Ile nauwelijks oplost in DCM, wat ook de vermoedelijke reden is voor het uitblijven van succes. Overigens werd er geen organische solvent gevonden waarin Ile goed oplost. Er werd daarom ook niet verder geïnvesteerd in deze route.

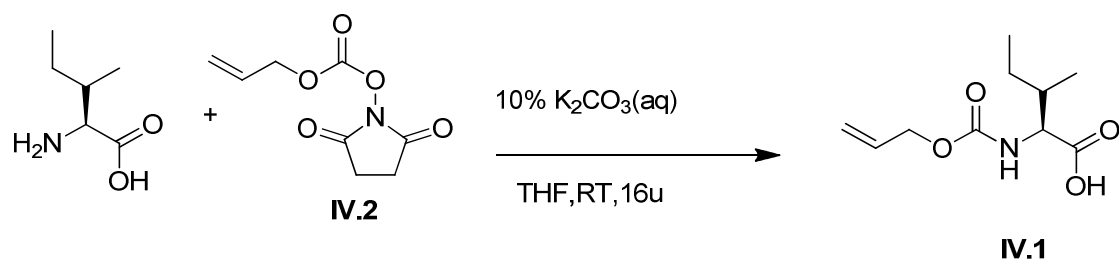
4.1.3 Derde poging voor synthese van Alloc-Ile

Een procedure voor de vorming van Alloc-Ile via allyloxycarbonyloxysuccinimide (Alloc-OSu) wordt in de literatuur beschreven. [25] Voor zover bekend is dit de enige methode die specifiek de vorming van IV.1 beschrijft. Deze methode vereist echter wel de synthese van Alloc-OSu. Daartoe werd een synthese uitgevoerd, weergegeven in figuur 4.5, die gebaseerd is op de synthese van benzyl-2-dioxopyrrolidin-1-yl carbonaat. [58]



Figuur 4.5 Synthese van Alloc-OSu

Na kolomchromatografie werd Alloc-OSu met een rendement van 58% bekomen. Hierna werd de voorgeschreven procedure gevolgd voor de vorming van Alloc-Ile. (figuur 4.6) Na zuivering met kolomchromatografie werd **IV.1** bekomen als een viskeuze olie met een rendement van 77.5%.



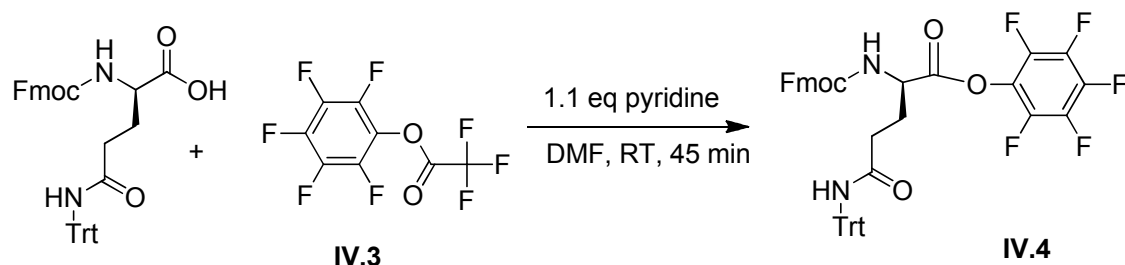
Figuur 4.6 Vorming Alloc-Ile via Alloc-OSu

Onderzoek met NMR-bevestigt dat het om Alloc-Ile gaat. Het 1D-¹H spectrum vertoont bij 2.7 ppm de karakteristieke resonantie afkomstig van de CH₂ groepen van N-hydroxysuccinimide.

4.2. Fmoc-D-Gln(NTrt)-OPfp

In de literatuur worden twee methoden beschreven voor het bereiden van pentafluorofenylesters. De eerste werd beschreven door Kisfaludy *et al*, en maakt gebruik van pentafluorofenol en het koppelingsreagens DCC. [59] Na de synthese is een herkristallisatie nodig. Een recentere methode werd ontwikkeld door Green en Berman en maakt gebruik van pentafluorofenyltrifluoroactaat (**IV.3**) [60] Er wordt gekozen voor deze laatste methode omdat deze een beter rendement heeft, maar vooral omdat de methode sneller en bovendien eenvoudiger is daar er geen herkristallisatiestap vereist is.

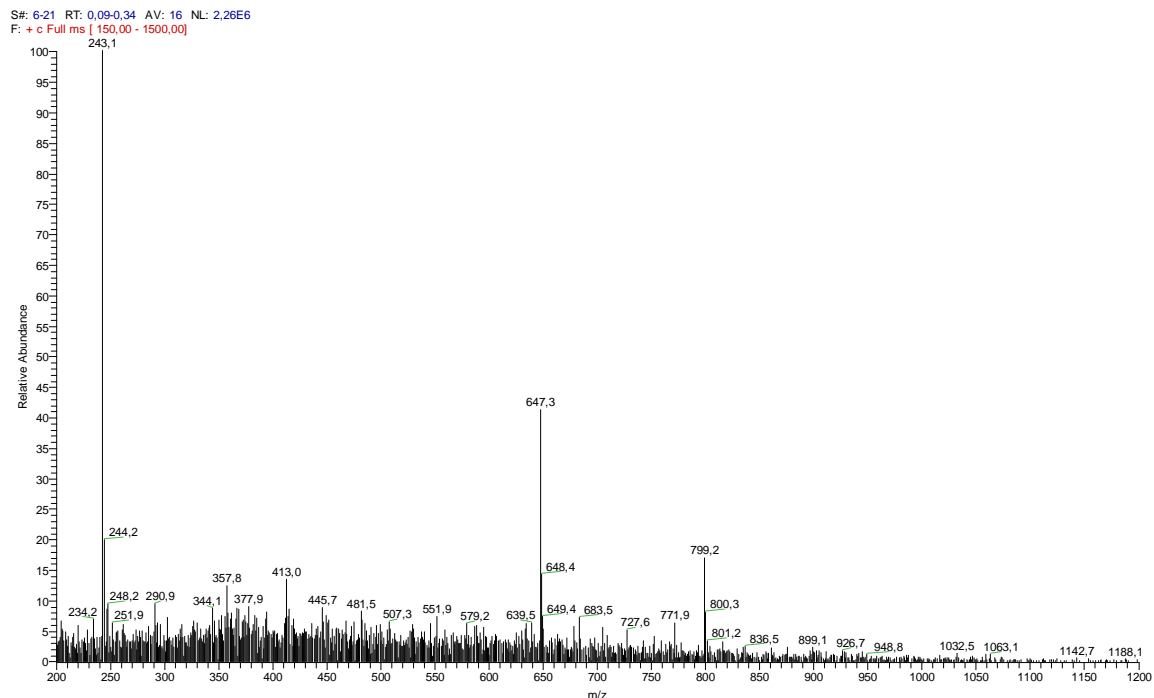
Met het aangekochte **IV.3** werd vervolgens getracht **IV.4** te maken vertrekkende van Fmoc-D-Gln(NTrt)-OH. (figuur 4.7) Deze procedure maakt gebruik van een base gekatalyseerde verestering van **IV.3**.



Figuur 4.7 Bereiding van Fmoc-D-Gln(NTrt)-OPfp

Bij dit product was de karakterisatie wat meer omslachtig. Na oplossen van een staal in MeOH werd een ESI-MS analyse uitgevoerd. In het massaspectrum (figuur 4.8) ziet men een opmerkelijk resultaat. Er zijn drie intense pieken zichtbaar. De eerste piek met m/z=243 komt overeen met het Trityl-kation.

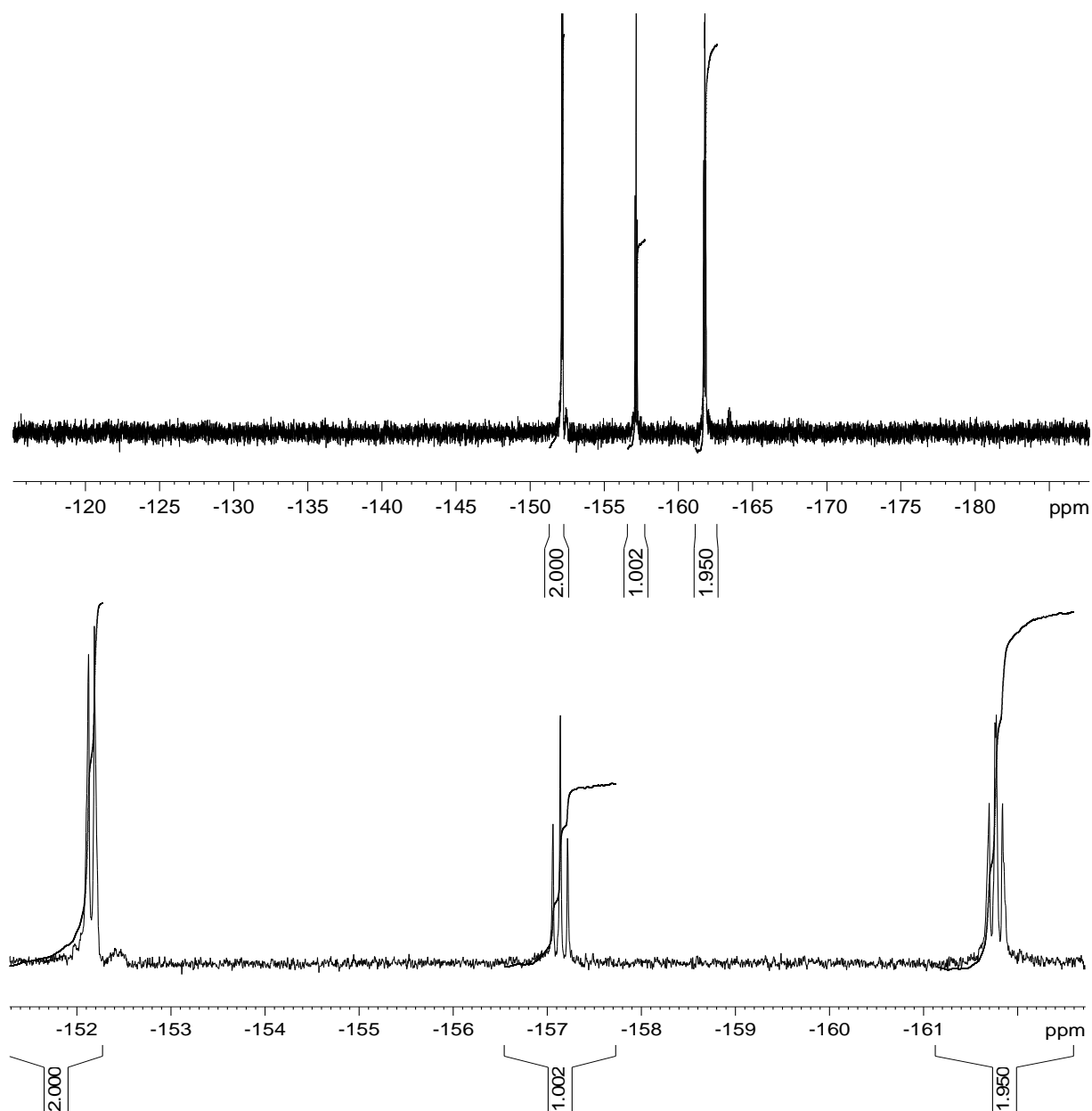
Deze groep splitst zich af in zuur milieu en ioniseert extreem goed. De piek met $m/z = 799.2$ stemt overeen met $[\text{IV.4}+\text{Na}]^+$. Wat men daarnaast ook vaststelt is een piek bij $m/z=647.3$ die meer dan dubbel zo groot is dan het geactiveerde glutamine. Deze piek is afkomstig van het methylester van **IV.4** gevormd door reactie van **IV.4** met het solvent. Dit laatste is een onrechtstreeks bewijs voor de aanwezigheid van het gewenste product.



Figuur 4.8 Massaspectrum van **IV.4** (opgelost in MeOH) bekomen met ESI-MS.

Omdat met elke techniek gebaseerd op massaspectrometrie men het Trt-ion steeds als grootste signaal zal zien, werd besloten om het resultaat te onderzoeken via ^{19}F -NMR. Is **IV.4** gevormd dan verwacht men drie ^{19}F signalen (ortho, meta en para). Indien nog **IV.3** aanwezig is, verkrijgt men een extra signaal afkomstig van de CF_3 groep. Andere nevenproducten die ^{19}F bevatten zouden ook waarneembaar moeten zijn. Het $1\text{D-}^{19}\text{F}$ NMR-spectrum wordt getoond in figuur 4.9. Men stelt vast dat men enkel **IV.4** heeft en men herkent van links naar rechts de ortho, para en meta ^{19}F -resonanties.

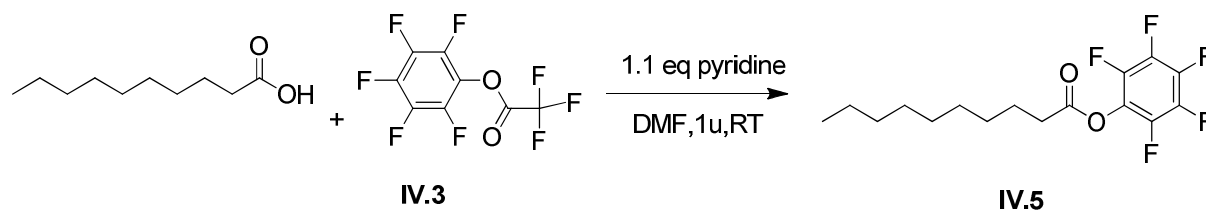
IV.4 werd bekomen met een rendement van 79.3 %.



Figuur 4.9 1D-¹⁹F NMR-spectrum van IV.4 in CDCl₃. Boven: full range spectrum. Onder: detail van de 3 signalen tussen -150 en -165 ppm

4.3 DZ-OPfp

De laatste bouwsteen die niet commercieel beschikbaar is, is de pentafluorofenylester van decaanzuur IV.5 (figuur 4.10) Dezelfde procedure wordt gebruikt als beschreven in 4.2.



Figuur 4.10 Activatie van decaanzuur

In dit geval werd er wel een zuivering via kolomchromatografie uitgevoerd, omdat het aangekochte decaanzuur slechts 98% zuiver was. Na deze zuivering wordt IV.5 bekomen als een lichtgele olie met een rendement van 79.8%.

Hoofdstuk 5: Testsynthese op kleine schaal

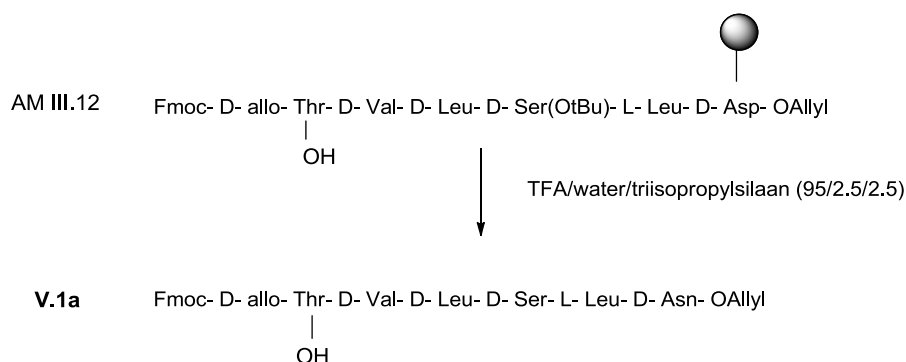
In deze masterscriptie werd er voor gekozen van start te gaan met 25 mg van het hars **AM III.12** dat door Anna Malinowska reeds vroeger werd bekomen.[6] Alle aminozuren tot en met het Thr3 residu (het vertakkingspunt) werden door haar reeds succesvol manueel gekoppeld.



Figuur 5.1 Beginproduct synthese

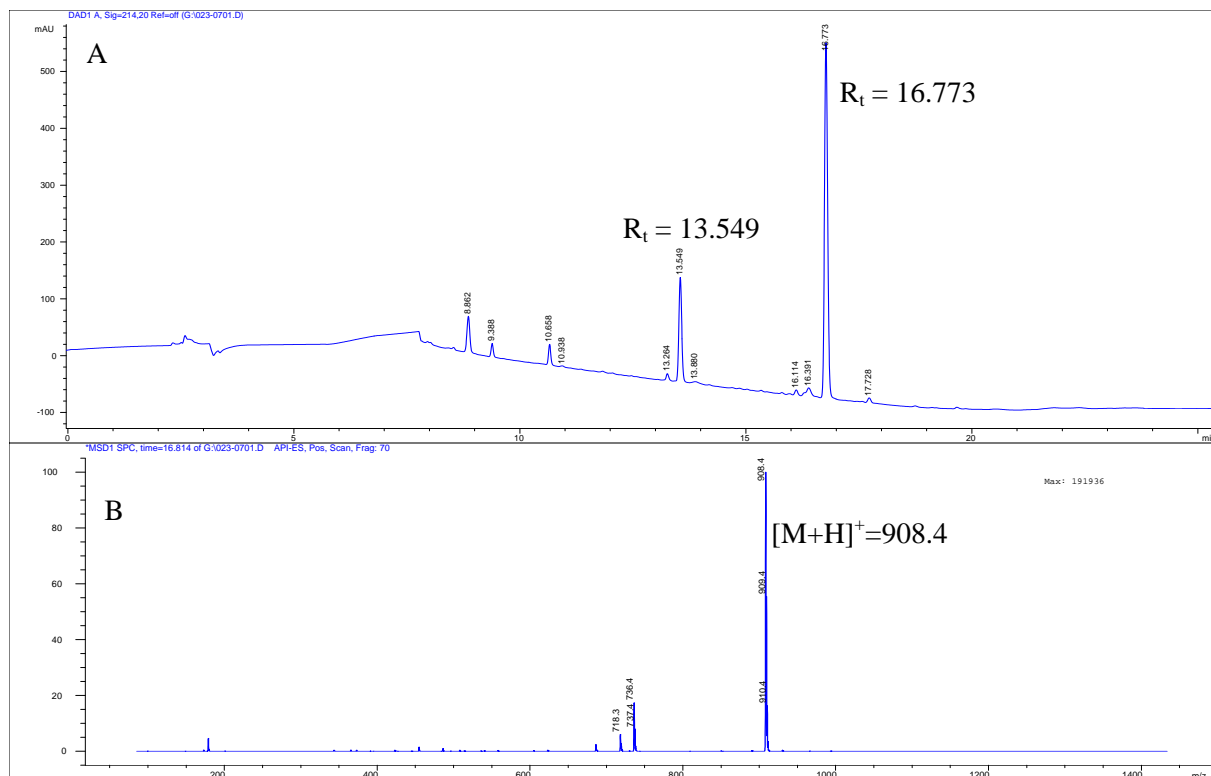
5.1 Controle van het startmateriaal

Vooraleer van start te gaan, werd het startmateriaal gecontroleerd. Daartoe werd een staal van het hars aan een zure afsplitsing onderworpen. (figuur 5.2) Het ontstane **V.1a** werd vervolgens onderzocht met LC-MS.



Figuur 5.2 Proefafplitsing van AM III.12

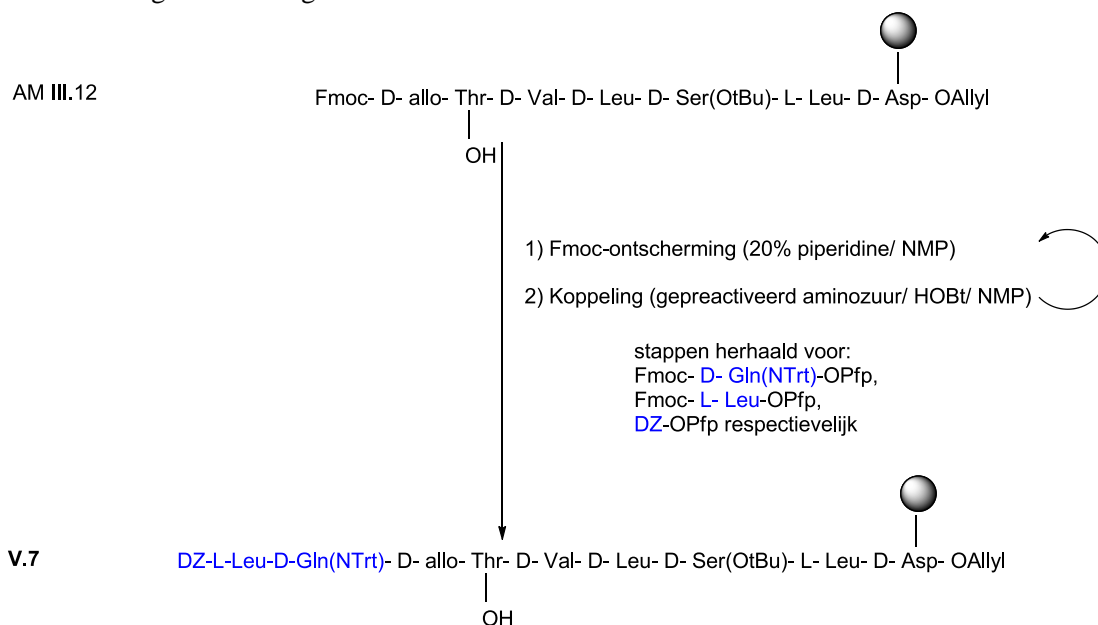
Het chromatogram ($\lambda=214.20$ nm) en massaspectrum van **V.1a** worden getoond in figuur 5.3. Bij $R_t=16.773$ min ziet men een signaal dat in massaspectrometrie correspondeert met $m/z = 908.4$, wat overeenkomt met $[\mathbf{V.1a}+H]^+$ en bevestigt dat het materiaal nog niet gedegraded is. Daarnaast zijn er in het chromatogram een aantal kleine onzuiverheden op te merken. De piek bij $R_t=13.395$ is afkomstig van een niet geïdentificeerde onzuiverheid die niet ioniseert. De zuiverheid is echter meer dan voldoende om synthese uitgaande van dit hars voort te zetten.



Figuur 5.3 Chromatogram (A) en massaspectrum (B) van V.1a. Gradiënt 0-100% CH_3CN op Luna C18(2) kolom

5.2 Koppeling van de geactiveerde bouwstenen

Na Fmoc-ontscherming verkrijgt men het vrije α -amine van D-allo-Thr. Ook het alcohol van de zijketen is onbeschermd. Men heeft dus twee functionele groepen die vatbaar zijn voor koppeling met het volgende aminozuur. Zoals in hoofdstuk 2 uitgelegd, kan men door gebruik van de geactiveerde bouwstenen selectief koppelen op het amine. De alcoholgroep kan dus onbeschermd blijven waardoor in de volgende stap de esterbinding meteen gevormd kan worden. De route voor de koppeling van de Pfp-esters wordt getoond in figuur 5.4.



Figuur 5.4 Koppeling geactiveerde aminozuren. Een blauwe kleur duidt het gedeelte aan dat effectief wordt ingebouwd.

Opeenvolgende koppelingen van de pentafluorofenylesters van Fmoc-D-Gln(NTrt), Fmoc-L-Leu en van decaanzuur (DZ) zullen uitgevoerd worden om het materiaal te bekomen nodig voor het vormen van de esterbinding tussen D-allo-Thr(OH) en Alloc-L-Ile

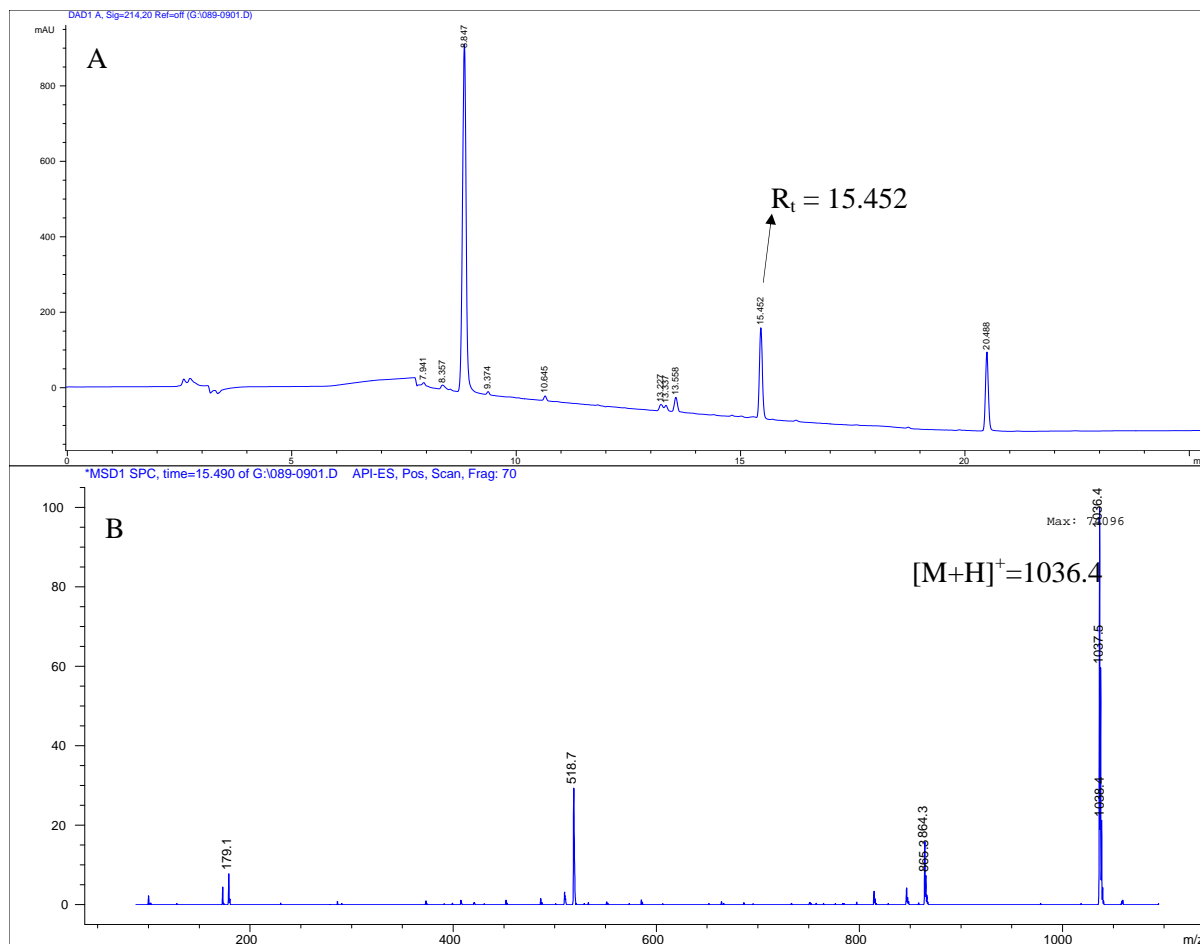
5.2.1 Ontscherming van Fmoc-D-allo-Thr en koppeling Fmoc-D-Gln(NTrt)-OPfp

De ontscherming van AM III.12 (figuur 5.5) wordt gecontroleerd met de TNBS-kleurtest. De geobserveerde oranje korrels wijzen op een succesvolle ontscherming. Hierna wordt Fmoc-D-Gln(NTrt)-OPfp gekoppeld. De amidegroep in het glutamine is beschermd door middel van een tritylgroep. De TNBS-test en de NF31-test zijn beiden negatief (kleurloos) wat erop wijst dat de koppeling volledig doorgaat. De NF31/DMAP-test toont lichtrode korrels. Dit zou op gedeeltelijke koppeling op de vrije OH kunnen wijzen. Enkel een proefafsplitsing kan uitsluitsel brengen of Gln al dan niet op de juiste plaats is ingebouwd.



Figuur 5.5 Koppeling van Fmoc-D-Gln(NTrt)-OPfp en proefafsplitsing

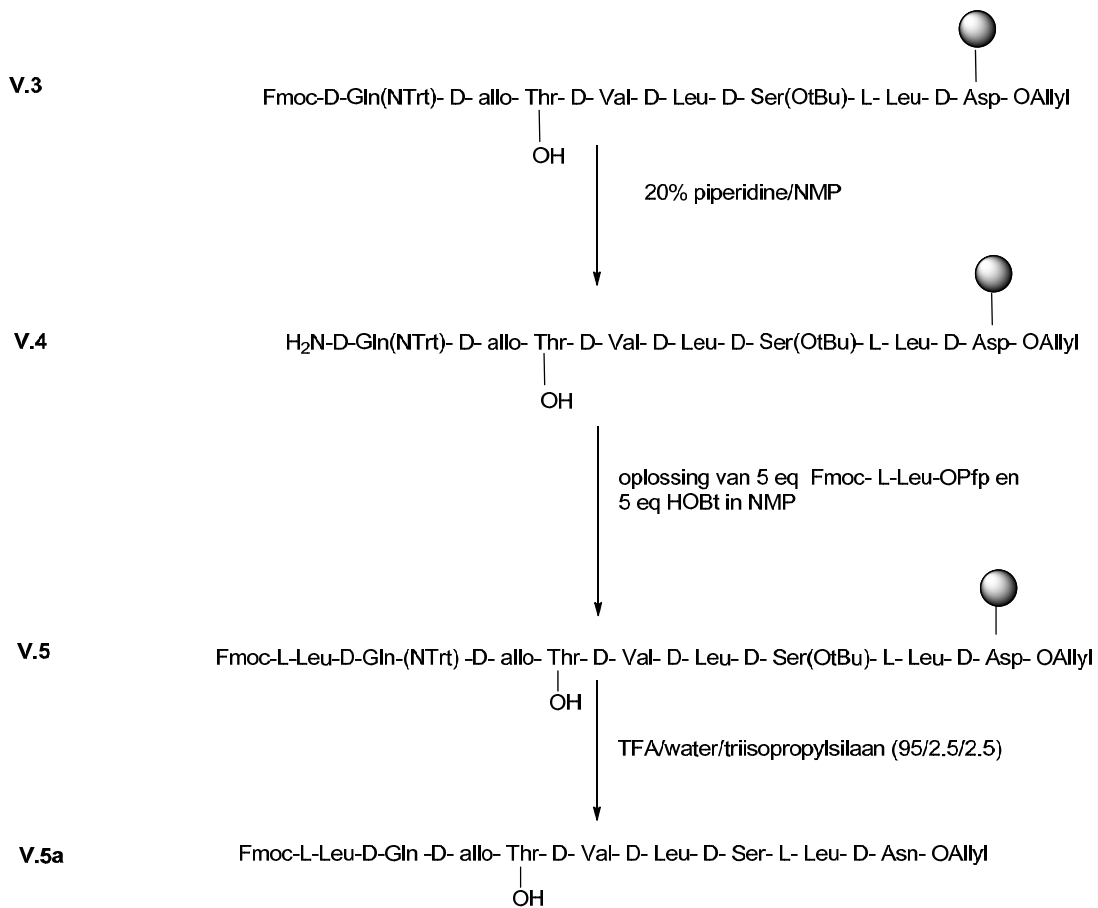
Op dit afgesplitste product werd een LC-MS analyse uitgevoerd. Het chromatogram ($\lambda=214.20$ nm) en massaspectrum van **V.3a** worden getoond in figuur 5.6. De piek bij $R_t=15.452$ minuten is afkomstig van een product met massa 1036.4. Dit komt overeen met $[\mathbf{V.3a}+\text{H}]^+$. Gecombineerd met de kleurtesten kan men besluiten dat **V.3** gevormd werd. Het dubbelzinnige resultaat van de NF31/DMAP-kleurtest is vermoedelijk te wijten aan sterische hinder rond de alcoholgroep. Niet alleen betreft het een secundair alcohol, daarnaast wordt de zijketen van het naburige aminozuur beschermd door de volumineuze Trt-groep, wat efficiënte reactie van de kleurstof met de vrije OH zou kunnen belemmeren en de slechts lichtrode kleur zou verklaren.



Figuur 5.6 Chromatogram (A) en massaspectrum (B) van V.3a. Gradiënt 0-100% CH₃CN op Luna C18(2) kolom. De piek bij $R_t=8.847$ is afkomstig van het solvent NMP.

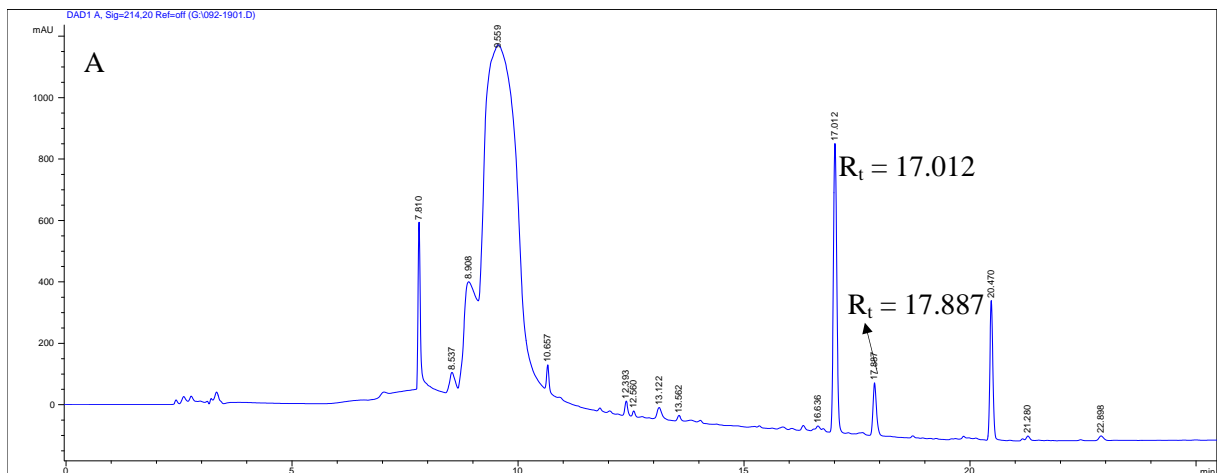
5.2.2 Ontscherming van Fmoc-D-Gln(NTrt) en koppeling Fmoc-L-Leu-OPfp

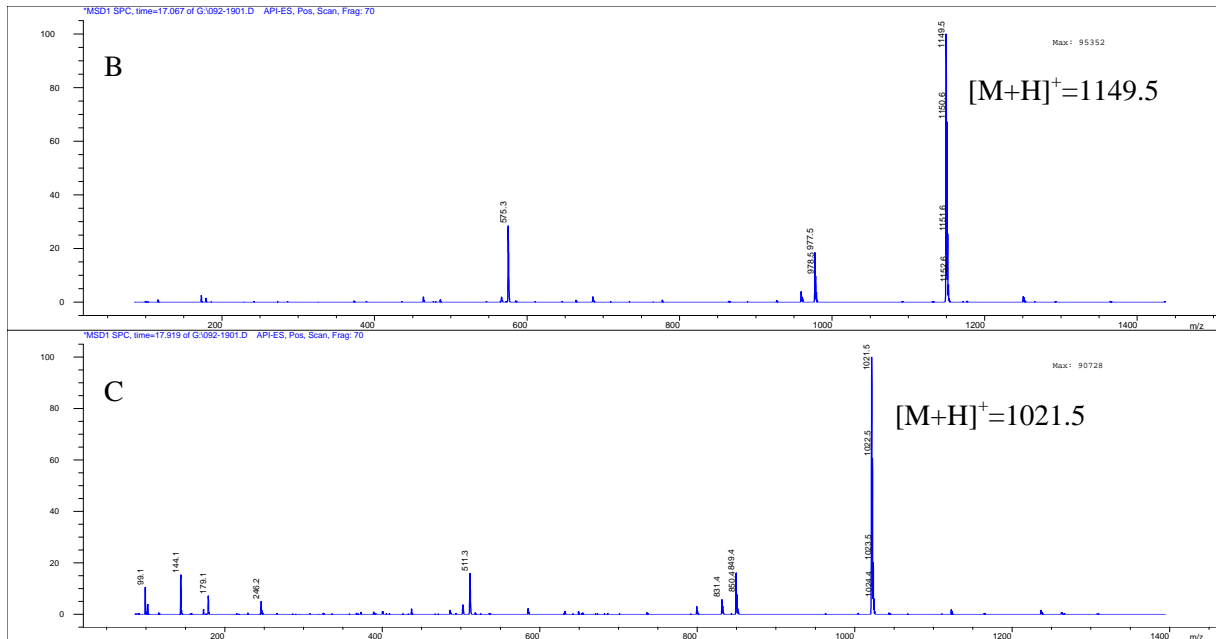
Dezelfde werkwijze wordt herhaald. TNBS-kleurtest toonde aan dat de Fmoc-ontscherming succesvol was (oranje kleur van de korrels). Vervolgens wordt Fmoc-L-Leu-OPfp gekoppeld. De TNBS en NF31-test waren negatief. Dit duidt op een succesvolle koppeling. De NF31/DMAP toonde andermaal lichtrode beads. Ter controle wordt wederom een deel van het peptide afgesplitst om aan verder onderzoek te onderwerpen. (figuur 5.7)



Figuur 5.7 Koppeling van Fmoc-L-Leu-OPfp en afsplitsing

Het bekomen product na zure afsplitsing wordt onderworpen aan LC-MS analyse. (figuur 5.8) In het chromatogram ziet men een piek bij $R_t=17.012$ die afkomstig is van een product met $m/z = 1149.5$. Dit stemt overeen met $[V.5a+H]^+$. Minder abundant maar toch herkenbaar ziet men bij $R_t=17.887$ een piek corresponderend met $m/z = 1021.5$. Deze piek is afkomstig van een deletiepeptide. De massa stemt overeen met een peptide waarin de Gln-bouwsteen ontbreekt. Dit nevenproduct is dus naast **V.5** ook aanwezig op het hars.

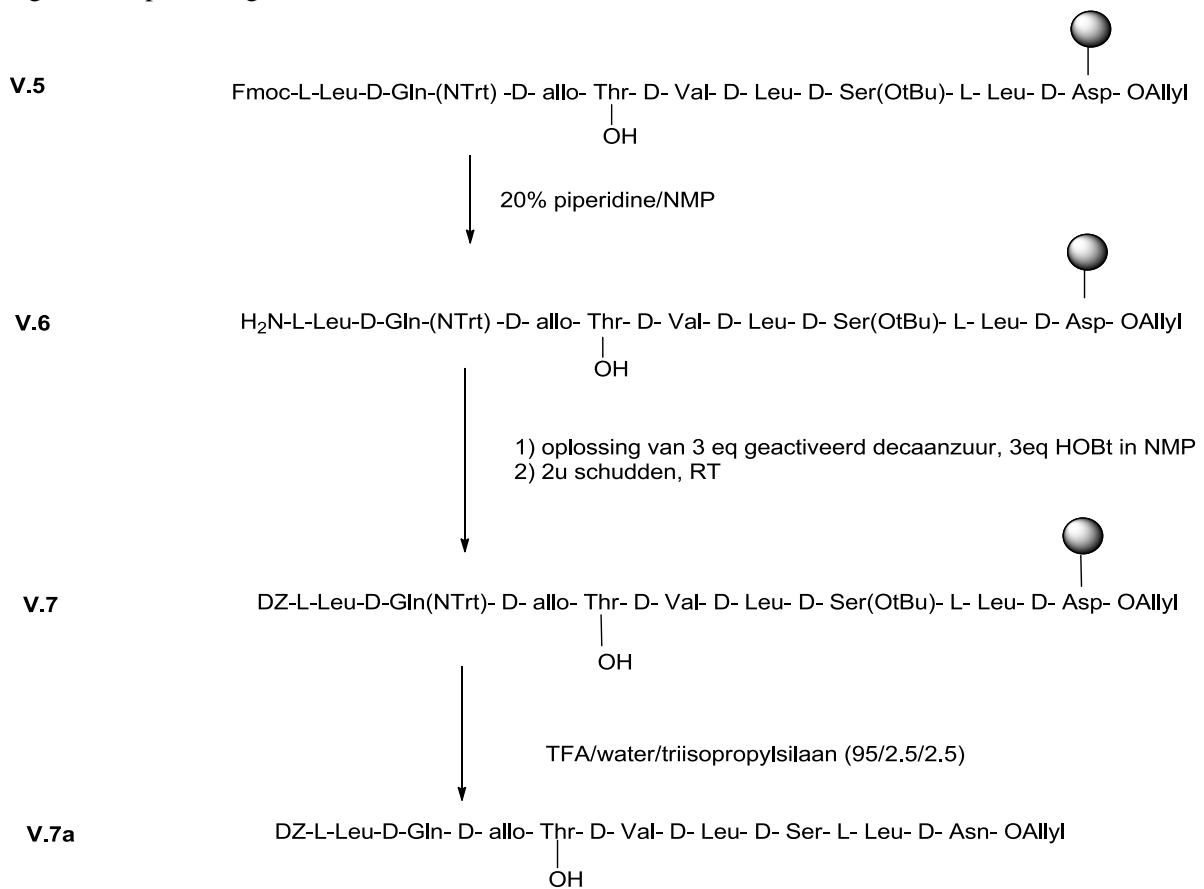




Figuur 5.8 Chromatogram (A) en massaspectrum (B) van **V.5a** ; Massaspectrum deletiepeptide (C) Gradient 0-100% CH₃CN op Luna C18(2) kolom

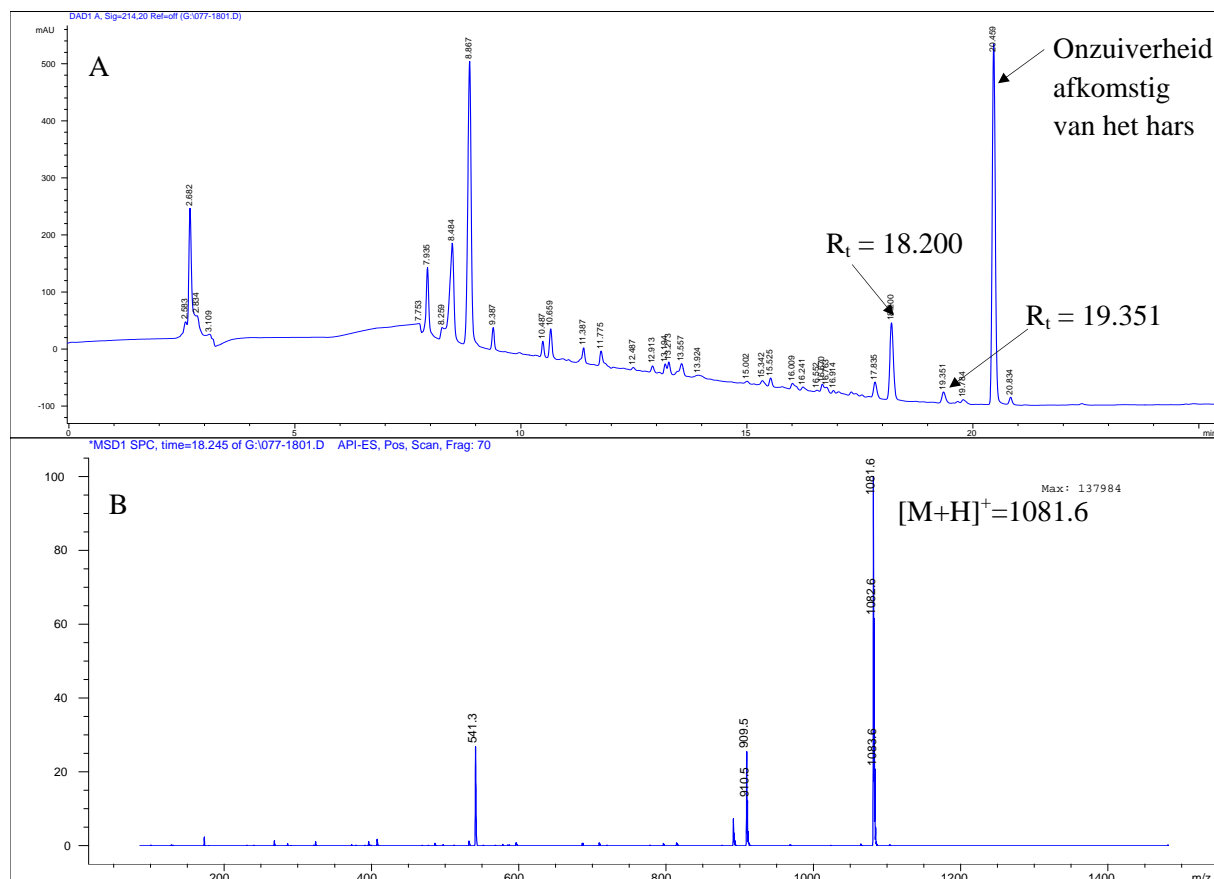
5.2.3 Ontscherming van Fmoc-L-Leu en koppeling DZ-OPfp

De oranje kleur van de korrels in de TNBS-test na piperidinebehandeling van hars **V.5**, wijst op een succesvolle ontscherming van Fmoc-L-Leu. Vervolgens wordt de vetzure staart ingevoerd via de Pfp-ester van DZ. Na koppeling werd de TNBS-test uitgevoerd die negatief was. Een proefafsplitsing werd uitgevoerd op **V.7** (figuur 5.9)



Figuur 5.9 Koppeling DZ-OPfp en afsplitsing

Het bekomen product werd onderzocht met LC-MS. (figuur 5.10) In het chromatogram ziet men een piek bij $R_t = 18.2$ minuten. Deze is afkomstig van een product met $m/z = 1081.6$, wat overeenkomt met $[V.7a+H]^+$. Het eerder beschreven deletiepeptide (zonder Gln) is ook zichtbaar bij $R_t = 19.3$ minuten. De intensiteit van alle peptide signalen in het chromatogram lijkt sterk vermindert te zijn ten opzichte van vroeger. De verklaring hiervoor is dat de sterk UV-actieve geconjugeerde Fmoc-groep zich niet langer aan de N-terminus bevindt. Men kan concluderen dat ook DZ op de juiste plaats is ingebouwd.



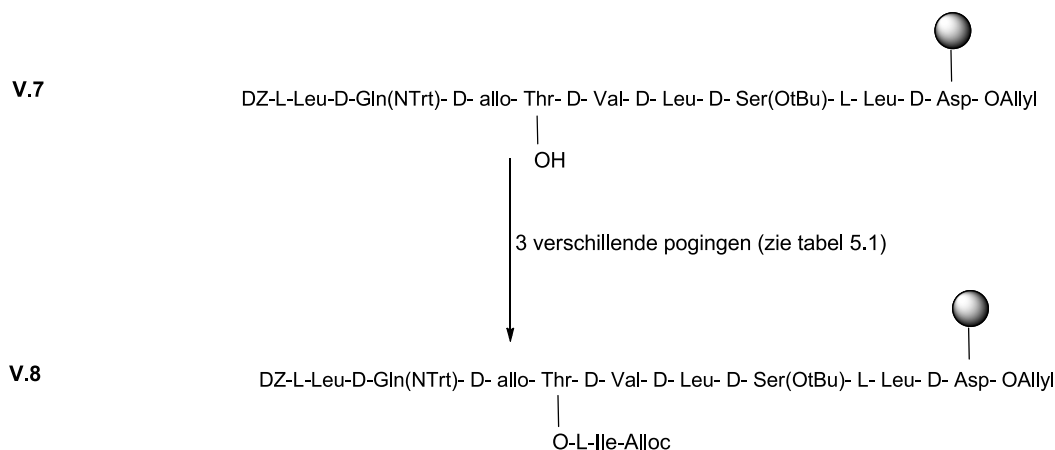
Figuur 5.10 Chromatogram (A) en massaspectrum (B) van V.7a. Gradiënt 75-100% CH_3CN op C18(2) kolom

5.3 Koppeling van Alloc-Ile

Hars V.7 bevat op de alcoholgroep na geen enkele vrije functionele groep. Daarom kan nu de esterbinding ingevoerd worden. Uit de NF31/DMAP-tests beschreven in 5.2 is het intussen duidelijk dat er vrij veel sterische hinder aanwezig is rond deze functionele groep.

5.3.1 Testpogingen voor koppeling van Alloc-Ile

Drie pogingen werden ondernomen om Alloc-Ile te koppelen. (figuur 5.11) Aangezien het beginproduct V.7 niet of nauwelijks is weggereageerd bij deze pogingen, werden deze telkens uitgevoerd op dezelfde reactor. Een overzicht van de drie pogingen wordt gegeven in tabel 5.1

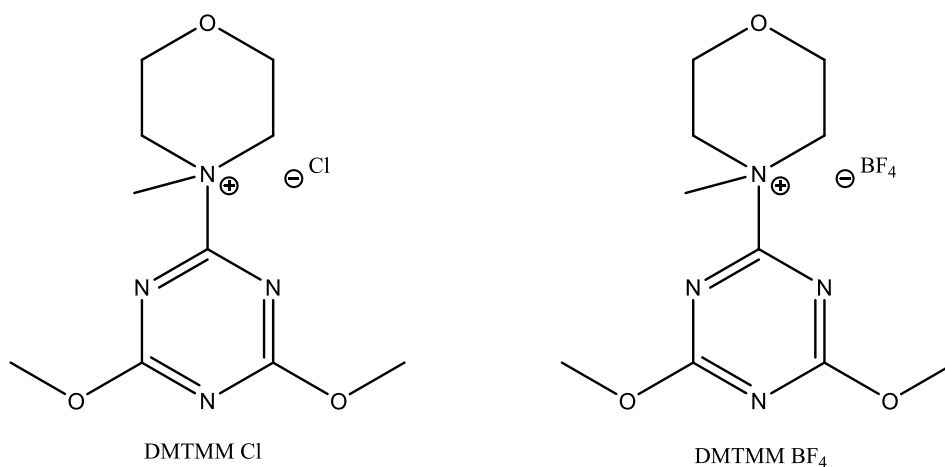


Figuur 5.11 Koppeling van Alloc-Ile

	Conditie	Resultaat (op basis van LC-MS na proefafsplitsing)
1 ^e poging	7 eq Alloc-Ile, 7eq DIC, 0.7 eq DMAP in droge DCM 3 uur schudden, RT	Minimale hoeveelheid V.8 gevormd
2 ^e poging	5 eq Alloc-Ile, 5eq DMTMM Cl, 5eq NMM in droge DMF 19 uur schudden, RT	Geen reactie
3 ^e poging	10 eq Alloc-Ile, 10 eq DMTMM BF ₄ , 10 eq NMM in droge DMF 1 week schudden, RT	Geen reactie

Tabel 5.1 Overzicht pogingen voor koppeling Alloc-Ile

In een eerste poging wordt gebruik gemaakt van van DIC/DMAP. Deze werkwijze staat bekend als de meest efficiënte om een esterbinding te maken.[27] Aangezien deze methode na drie uur reactie nauwelijks resultaat gaf, werd gezocht naar andere methoden. Eerst werd gezocht in de klasse van de triazine gebaseerde koppelingsreagentia. DMTMM Cl [61, 62] en DMTMM BF₄ (zie figuur 5.12) [63] worden beschouwd als een nieuwe generatie van deze klasse en zijn ontworpen volgens het concept van de 'superactieve esters'. Ze worden in de literatuur beschreven als efficiënte koppelingsreagens zowel voor de vorming van amide als esterbindingen op vaste drager. De laatste zou zelfs een beter koppelingsreagentia zijn voor cyclisatie van peptiden dan de traditionele uroniumzouten.[63] Hoe dan ook, zelfs na 1 week reactie werd er geen estervorming vastgesteld.(tabel 5.1)



Figuur 5.12 Triazine gebaseerde koppelingsreagentia

Na pogingen met drie krachtige koppelingsreagentia zonder noemenswaardig resultaat leek de synthese vast te komen zitten. De vermoedelijke oorzaak voor het falen van de reagentia is de

moeilijke bereikbaarheid van de alcoholgroep. Na grondige studie van de LC-MS resultaten van de eerste drie pogingen wordt echter een nieuwe poging ondernomen.

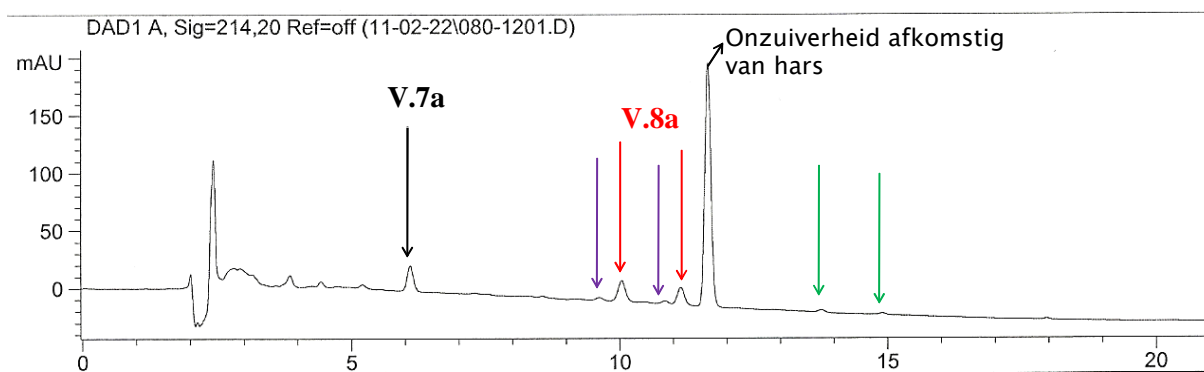
5.3.2 Succesvolle koppeling van Alloc-Ile

Uit grondige analyse bleek dat in de eerste poging toch een minieme hoeveelheid product werd gevormd. Aangezien het beginproduct **V.7** ook nog steeds aanwezig was, loonde het de moeite om deze reactie eens te herhalen met een verlengde reactietijd: 24 uur in plaats van 3 uur. Een proefafsplitsing werd uitgevoerd (figuur 5.13) en het bekomen product werd onderworpen aan LC-MS-analyse.



Figuur 5.13 Proefafsplitsing van **V.8**

Een opmerkelijk chromatogram werd bekomen. (figuur 5.14 en tabel 5.2). Deze keer bleek iets meer dan de helft van het beginproduct weggereageerd te zijn. Wat echter opvalt is dat er twee pieken worden waargenomen met een massa overeenkomstig met $[\mathbf{V.8a}+\mathbf{H}]^+$. Ook voor het eerder besproken deletiepeptide zonder Gln vindt men twee minieme pieken terug in het chromatogram. Voor een tweede deletiepeptide ziet men hetzelfde. Er is daarentegen slechts één piek die overeenkomt met het beginproduct. Dit alles wijst erop dat epimerisatie is opgetreden, met vorming van twee diastereomeren. Dit is inderdaad een gekende zijreactie die in deze omstandigheden kan optreden.[27, 50]

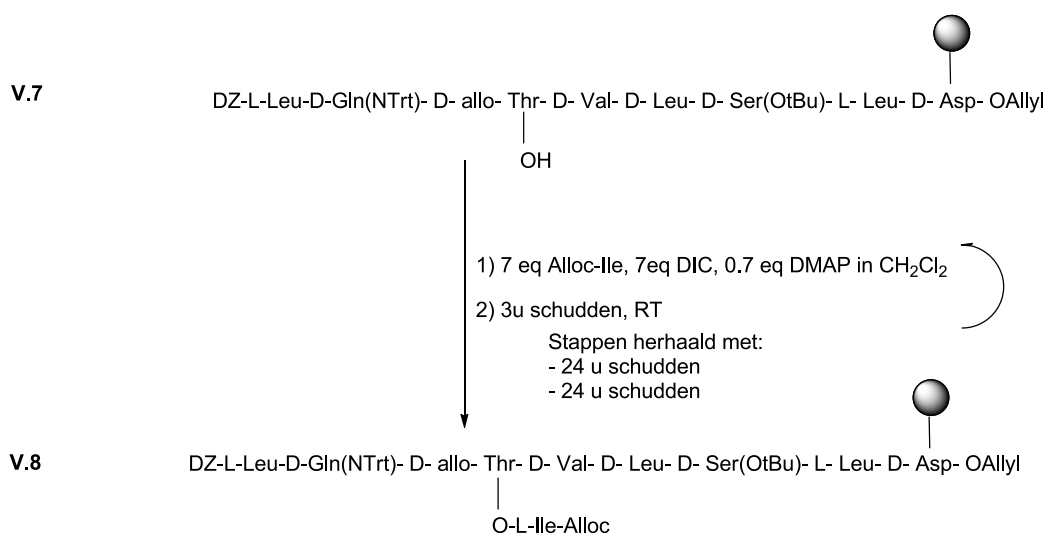


Figuur 5.14 Chromatogram van **V.8** De piek bij $R_t=11.6$ ioniseert niet en is vermoedelijk afkomstig van het hars. De paarse en groene pijlen duiden respectievelijk de Leu en Gln- deletiepeptiden aan. Gradiënt 75-100% CH_3CN op Luna C18(2) kolom

R _t (min)	massa	interpretatie
6.119	1082	Startproduct V.7a
9.6	1037	Deletiepeptide(-Leu)
10.0	1278	Gewenste product V.8a1
10.8	1037	Deletiepeptide(-Leu)
11.1	1278	Gewenste product V.8a2
13,7	1150	Deletiepeptide(-Gln)
14,9	1150	Deletiepeptide(-Gln)

Tabel 5.2 Overzicht van de verschillende producten aanwezig in het chromatogram

Hoe dan ook, het blijkt dus zeker mogelijk om een esterbinding te vormen, weliswaar met vorming van diastereomeren. Tussen de elutietijd van de twee diastereomeren is meer dan een minuut verschil dus kan men ze beiden perfect scheiden. Er is nog vrij veel beginproduct aanwezig dus vooraleer over te gaan naar de volgende stap wordt de reactie herhaald om zoveel mogelijk **V.8** te krijgen. (figuur 5.15)



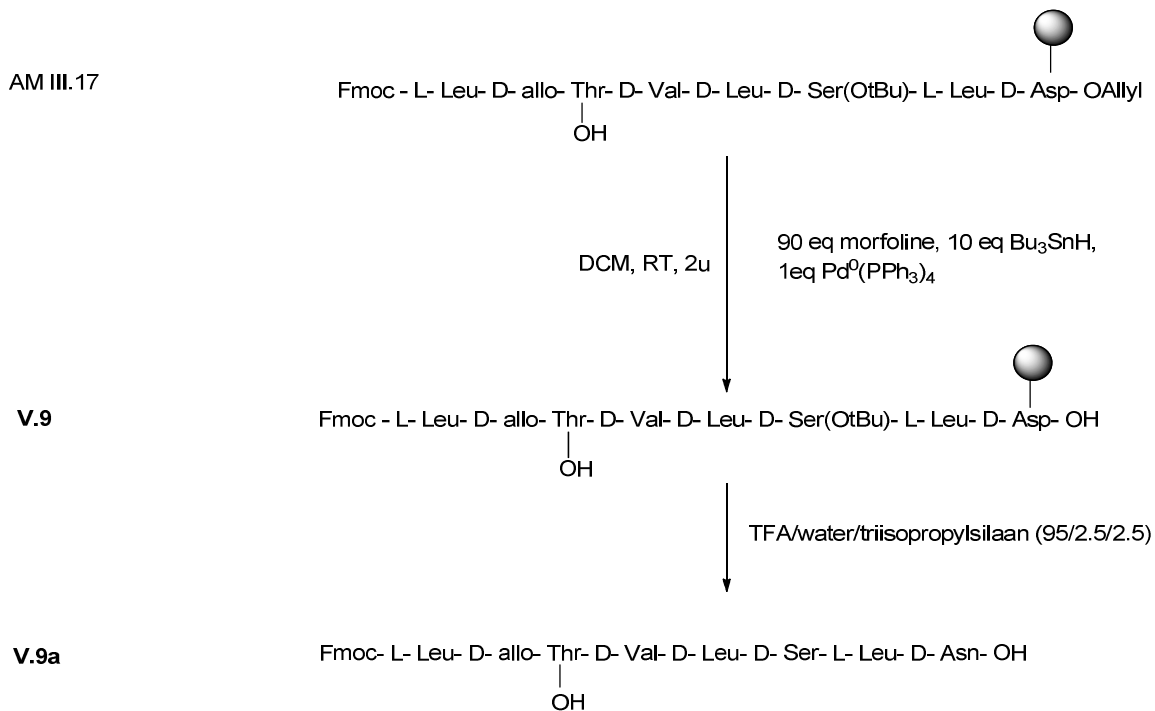
Figuur 5.15 Condities voor de kwantitatieve koppeling van Alloc-Ile

5.4 Allyl- en Alloc-ontscherming

5.4.1 Uittesten van de Allyl-ontscherming

Aangezien op dit punt slechts een zeer beperkte hoeveelheid hars overbleef, kon de batch niet worden opgedeeld in twee helften om zo op één deel de verdere synthesecondities uit te testen. Wel was er 10 mg beschikbaar van een gelijkaardig Allyl-beschermd product, bereid door Anna Malinowska: **AM III.17**. Hierop werd een Allyl-ontscherming uitgetoet. [39] (figuur 5.16)

Een proefafplitsing werd uitgevoerd en het bekomen product werd onderworpen aan LC-MS analyse. De resultaten zijn weergegeven in tabel 5.3. Men vindt geen enkele spoor terug van Allyl-beschermd peptide. Daarnaast stelt men vast dat er ook nog een Fmoc-ontscherming is opgetreden. Dit hoeft niet te verbazen aangezien morfoline nauwelijks verschilt van piperidine waarmee normaal Fmoc-ontscherming gebeurt. In het uiteindelijk benodigde peptide **V.8** is geen Fmoc-groep aanwezig dus stelt dit zeker geen probleem.



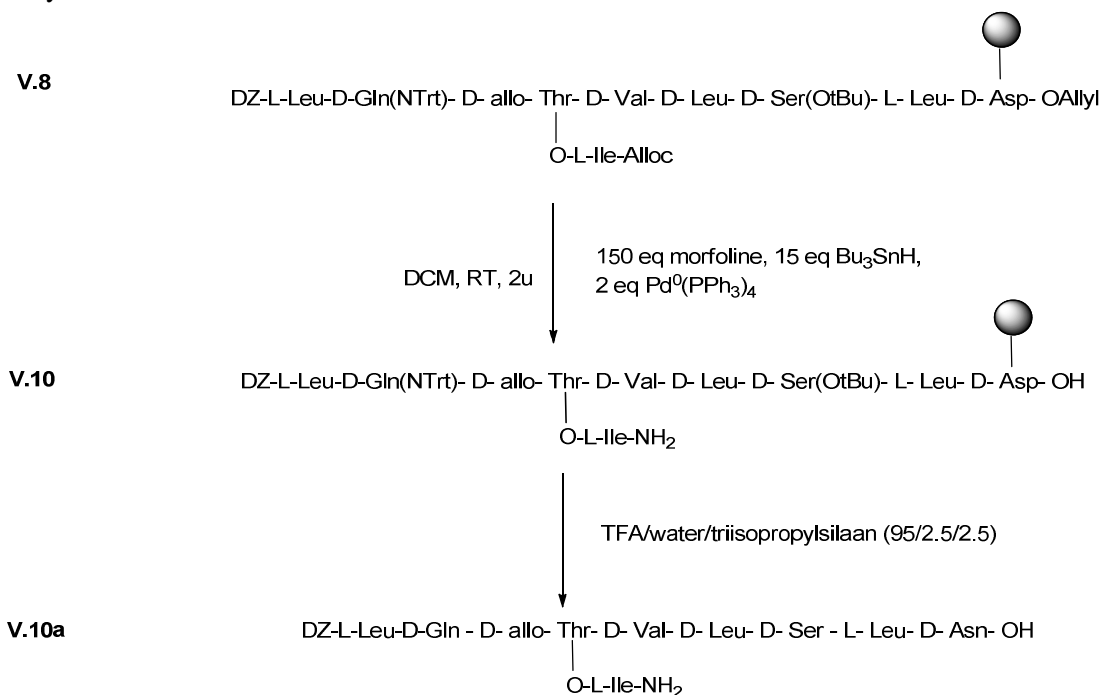
Figuur 5.16 Allyl-ontscherming van AM III.17 en proefafsplitsing

R _t	massa	interpretatie
11.475	759.4	[V.9a-Fmoc+H] ⁺
14.626	981.4	[V.9a+ H] ⁺

Tabel 5.3 Overzicht van het LC-MS resultaat van product V.9a

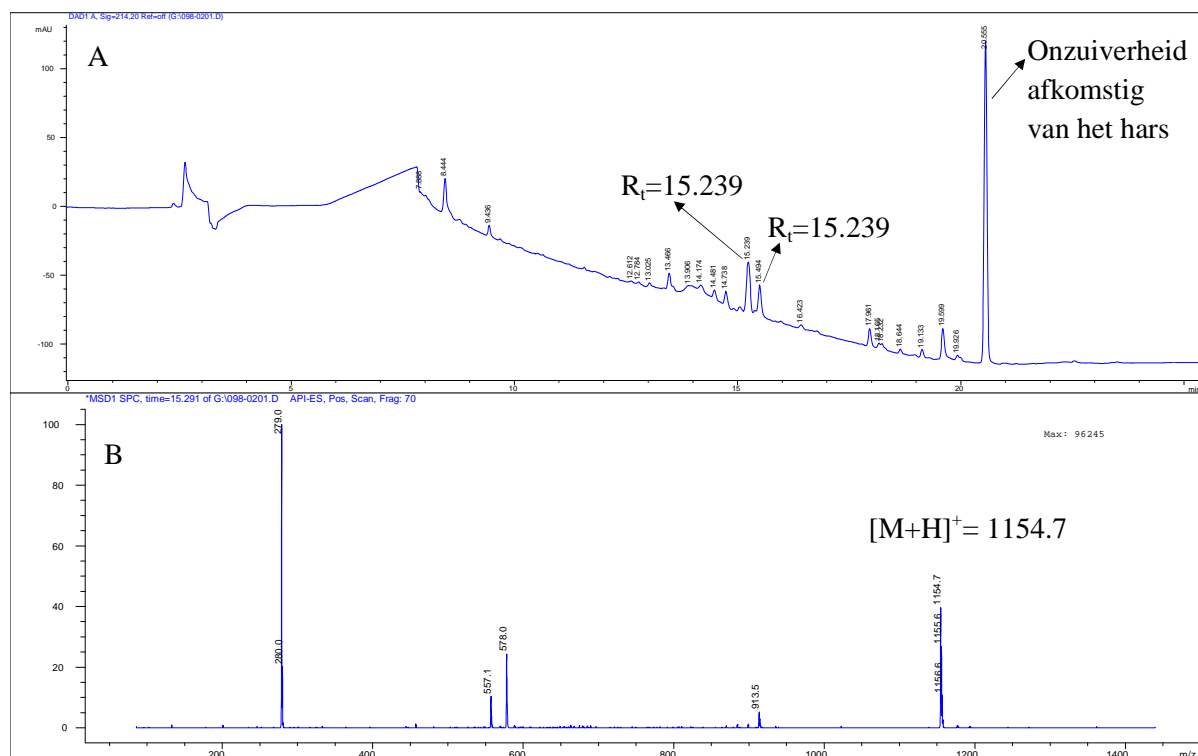
5.4.2 Allyl en Alloc-ontscherming van V.8

Allyl- en Alloc-ontscherming werden toegepast op V.8, volgens lichtjes aangepaste condities dan degene die frequent in de onderzoeksgroep [39] worden toegepast. (figuur 5.17) Het resultaat wordt gecontroleerd door een deel van het peptide af te splitsen van de vaste drager en te onderwerpen aan een analyse met LC-MS.



Figuur 5.17 Allyl- en Alloc-ontscherming van V.8

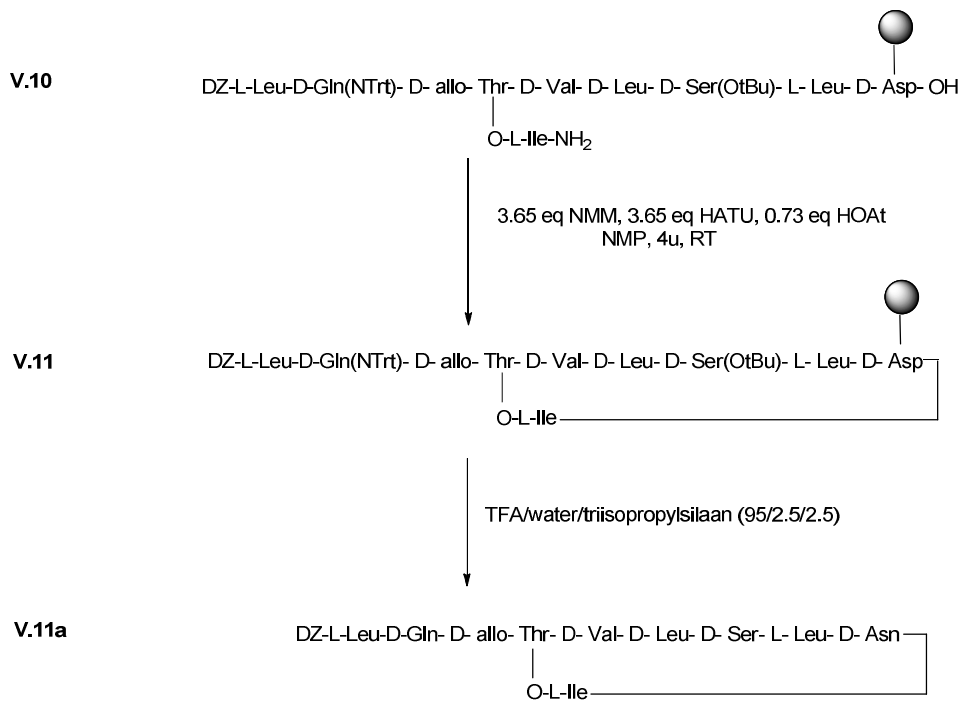
Het chromatogram ($\lambda=214.20$ nm) en massaspectrum van **V.10a** wordt getoond in figuur 5.18. De pieken bij $R_t=15.239$ en 15.494 minuten zijn afkomstig van een product met massa 1154.7. Dit komt overeen met de twee diastereomeren $[\mathbf{V.10a+H}]^+$. Overigens valt het hierbij op dat de intensiteit van de pieken vrij laag is door de afwezigheid van UV-actieve groepen. Men kan concluderen dat de Allyl en Alloc-beschermgroepen succesvol verwijderd zijn.



Figuur 5.18 Chromatogram (A) en massaspectrum (B) van **V.10a** $m/z=279$ was afkomstig van een contaminatie in het systeem. Gradiënt 0-100% CH_3CN op Luna C18(2) kolom

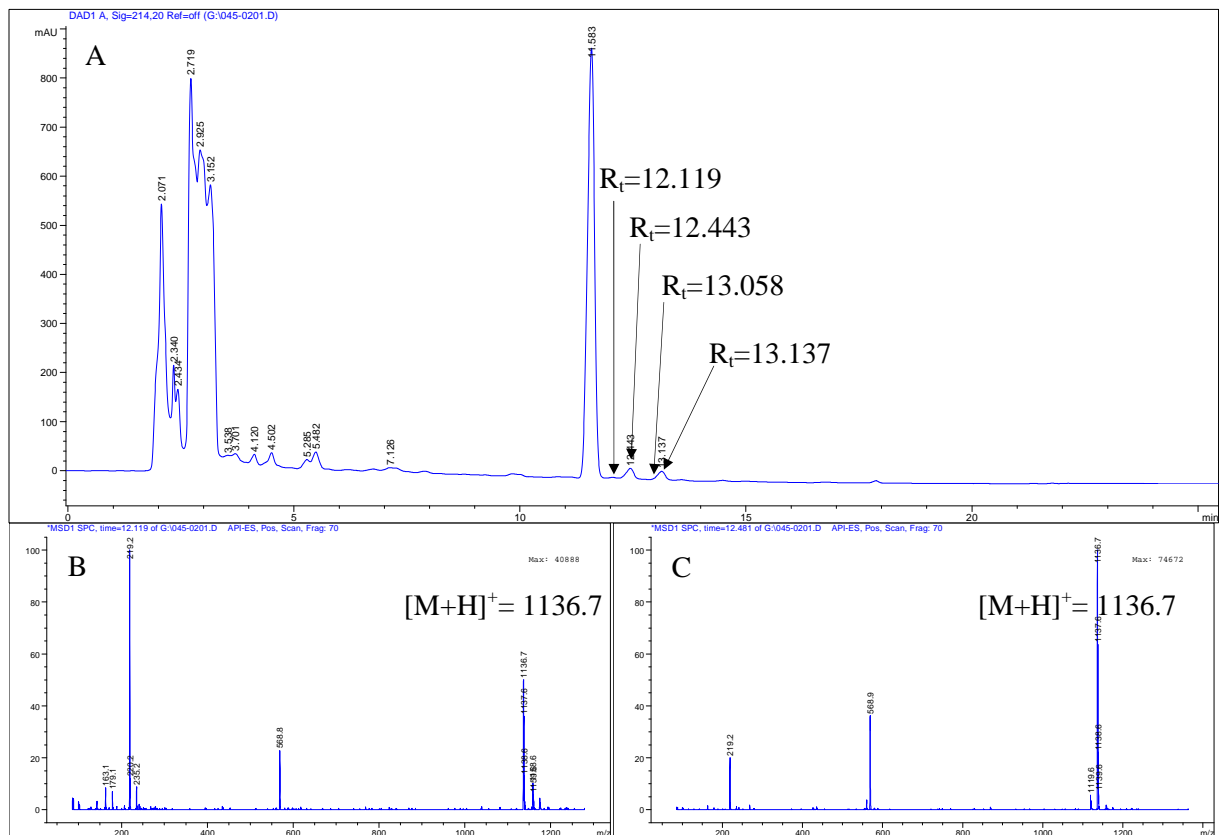
5.5 Cyclisatie

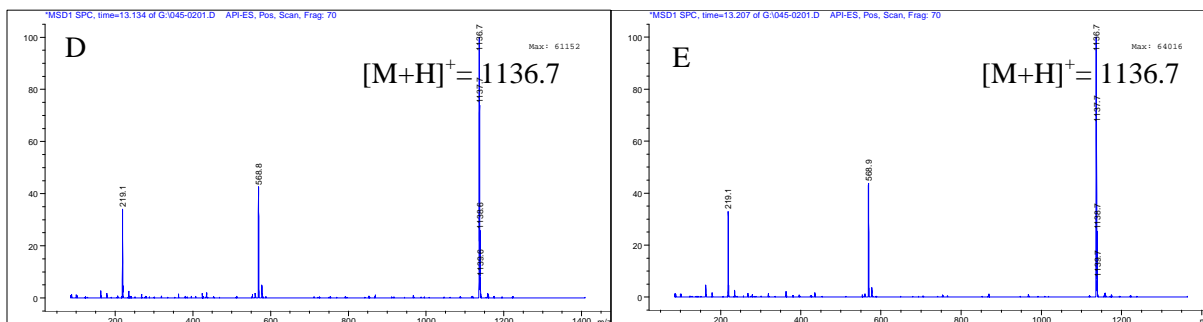
De cyclisatie werd uitgevoerd met als koppelingscocktail een mengsel van NMM, HATU en HOAt. Hoewel gebruik van HATU bij *head-to-tail* cyclisaties soms kan leiden tot de vorming van guanidiniumnevenproducten [51], werden deze condities succesvol aangewend bij de synthese van Halicylindramide A. [32] Er werd dan ook geopteerd om deze condities op **V.10** uit te proberen. (figuur 5.19)



Figuur 5.19 Cyclisatie van V.11 met HATU/HOAt/NMM

Om het resultaat te controleren wordt een proefafsplitsing uitgevoerd op een deel van het hars. Het bekomen product werd vervolgens onderworpen aan LC-MS analyse. (figuur 5.20)



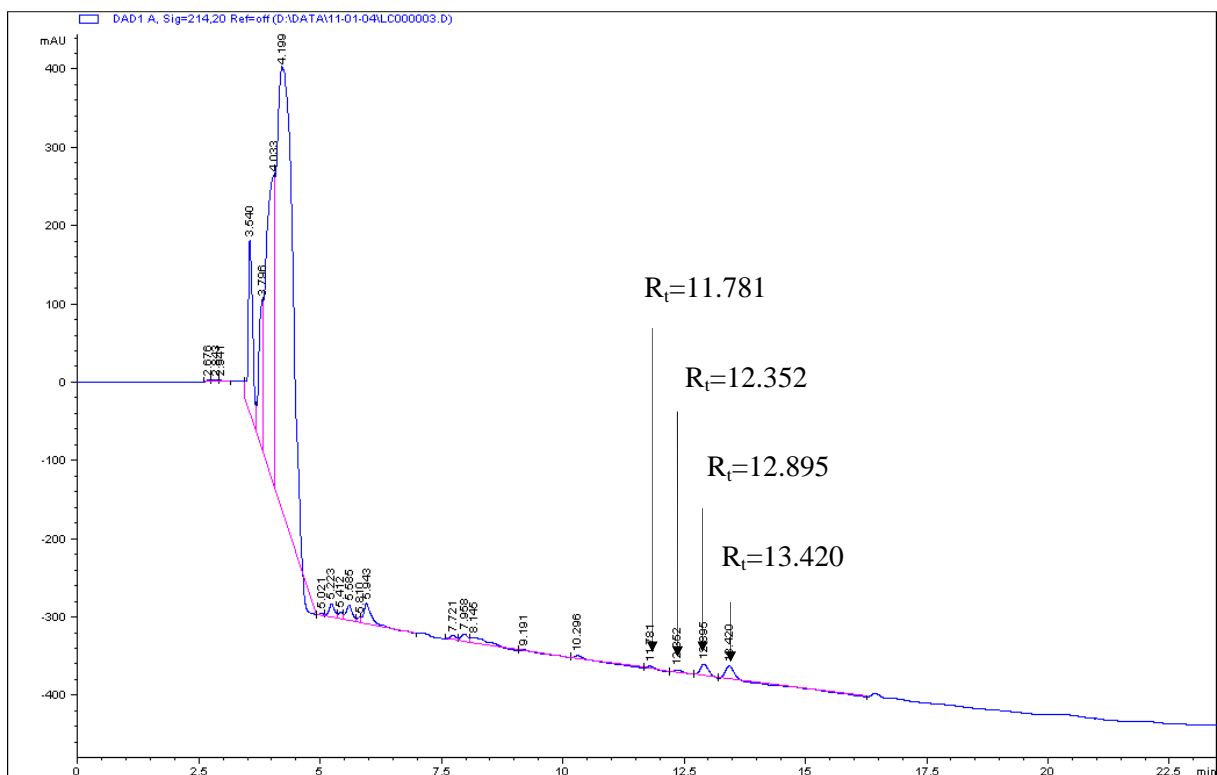


Figuur 5.20 Chromatogram (A) en massaspectra (B-E) van V.11a en zijn diastereomeren. De piek bij $R_t=11.583$ is vermoedelijk afkomstig van het hars. Gradiënt 75-100% CH_3CN op Luna C18(2) kolom

Het chromatogram ($\lambda=214.20$ nm) vertoont naast de grote piek bij $R_t=11.583$ min, die vermoedelijk afkomstig is van het hars, 4 pieken die afkomstig zijn van een product met massa 1136.7 wat overeenstemt met $[\text{V.11a}+\text{H}]^+$. Vermoedelijk heeft er een tweede gedeeltelijke epimerisatie plaatsgegrepen tijdens de activatie van Asn-OH in de cyclisatiestap, wat samen met de reeds eerder opgemerkte epimerisatie ter hoogte van het Ile residu leidt tot een totaal van vier diastereomeren.

5.6 Afsplitsing en zuivering

Na bevestiging dat de massa van het gecycliseerde product aanwezig is, wordt al het peptide verankerd op de vaste drager V.11, afgesplitst. Er zal ook een eerste opzuivering worden doorgevoerd met behulp van koude methyl-*tert*-butylether (MTBE) om onzuiverheden en beschermgroepen te verwijderen. Vertrekkende van een tiental mg hars werd na zuivering 1.3 mg ruw peptide bekomen. Dit bestaat op dit stadium wel nog uit een mengsel van de 4 diastereomeren en mogelijk andere zijproducten. Met behulp van HPLC worden de fracties bij $R_t=11.781$, 12.352, 12.895 en 13.420 minuten manueel gecollecteerd. (figuur 5.21)



Figuur 5.21 Chromatogram van V.11, gradiënt 75-100% CH_3CN op Luna C18(2) kolom

De vier afzonderlijk fracties werden ingedampt, maar bij elk van de vier was de weegfout groter dan de massa van het geïsoleerde product zelf. Elk van de vier fracties werd onderworpen aan een nieuwe LC-MS analyse om de zuiverheid te controleren. Op restsporen van solventen na, werd voor fractie 2,3 en 4 de aanwezigheid van één product met de juiste massa vastgesteld. Voor de eerste fractie zag men geen signaal van product vermoedelijk omdat de concentratie te laag is. Het overschot van de LC-MS stalen werd gerecupereerd en fractie 3 en 4 werden bestudeerd met NMR. Vermits de hoeveelheid zeer klein is, wordt hiervoor de 1mm-probe aangewend.

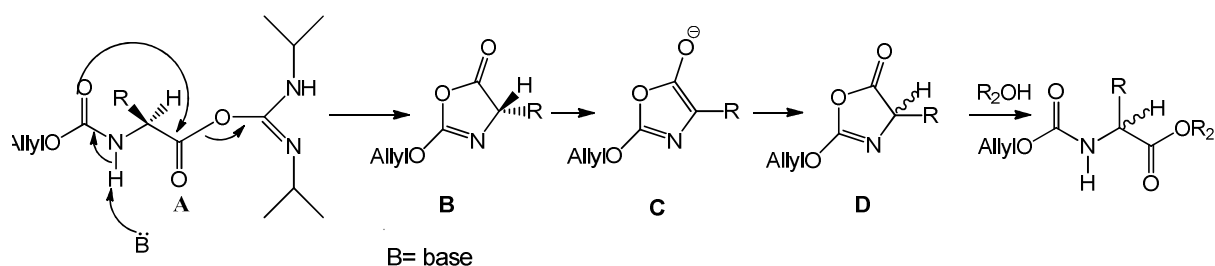
5.7 Conclusies

Geheel onverwacht was het mogelijk om op slechts 25 mg hars (**AM III.12**) de volledige syntheseroute uit te testen en bovendien nog voldoende product over te houden voor een eerste onderzoek met NMR. Weliswaar was de hoeveelheid product te klein om een volwaardige toekenning te doen, maar toch kon men een aantal karakteristieke CLP resonanties herkennen. Wel van belang zijn de onzuiverheden die duidelijk gekarakteriseerd konden worden: resonanties afkomstig van MeOH, NMP en DMF werden duidelijk teruggevonden. De aanwezigheid van deze producten kunnen vermeden worden door het invoeren van een lyofilisatiestap.

Een tweede vaststelling is dat de NF31/DMAP-kleurtest in deze context niet nuttig is en dat deze daarom beter wordt weggelaten. De vermoedelijke oorzaak is dat het secundaire alcohol door sterische hinder niet reactief genoeg is. De TNBS en NF31- test is wel nuttig gebleken om de Fmoc-ontscherming te kunnen aantonen. Vermits beiden in deze syntheseroute eenzelfde resultaat leveren zal naar de toekomst toe enkel de snellere TNBS-test gebruikt worden.

Herhaling op grotere schaal is hoe dan ook vereist om het mogelijke zelfassociatiegedrag in apolaire solventen te onderzoeken met NMR. Daarom zal de synthese herhaald worden (hoofdstuk 7) en hierbij zal de focus liggen op het vermijden van volgende twee knelpunten.

Het eerste knelpunt is de vorming van de esterbinding. In dit hoofdstuk werd vastgesteld dat het secundaire alcohol van Thr niet erg reactief is. Hiermee samenhangend kan men ook het dubieuze resultaat van de NF31/DMAP-test aanhalen. Met behulp van het koppelingsreagens DIC en een katalytische hoeveelheid (0.7 eq) DMAP lukt het toch om een esterbinding te vormen.[64] Men stelt vast dat er dan wel epimerisatie optreedt. Deze epimerisatie verloopt waarschijnlijk via het 5(4H)-oxazolon intermediair **B**. (figuur 5.22) [42, 49]



Figuur 5.22 Mechanisme voor epimerisatie tijdens koppeling van Alloc-Ile. Gebaseerd op [42]

Zeker bij het gebruik van carbodiimides zoals DIC is deze nevenreactie te verwachten. Het 5(4H)-oxazolon wordt gevormd door een intramoleculaire cyclisatie van het zeer reactieve O-acylisourea **A**. Het alcohol van Thr kan op dit oxazolon aanvallen met vorming van de esterbinding zonder epimerisatie. Er kan echter ook een abstractie van het α -proton gebeuren door een base. Hierbij ontstaat het door resonantie gestabiliseerd anion **C**. Protonatie kan aan beide zijden van de molecule

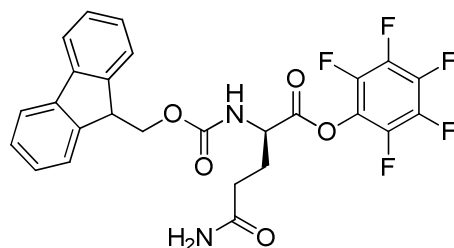
gebeuren waardoor een racemisch oxazonon **D** wordt gevormd, welke na opening het racemisch aminozuur of het peptide **V.8** oplevert.

De kans op epimerisatie van een Alloc-beschermd aminozuur is normaal vrij klein, tenzij onder specifiek omstandigheden waarbij men bijvoorbeeld werkt met vrij veel DMAP als katalysator of in een situatie met een langdurige behandeling in basisch milieu. [42] Anderzijds is een minimale aanwezigheid van DMAP wel vereist als katalysator. [27]

Het tweede knelpunt is nauw gerelateerd aan het eerste en omvat de epimerisatie tijdens de laatste stap. Na de cyclisatiestap heeft men plots 4 diastereomeren. Epimerisatie lijkt wel minder plaats te grijpen dan bij de estervorming. Het mechanisme verloopt waarschijnlijk ook via het oxazonon intermediair.

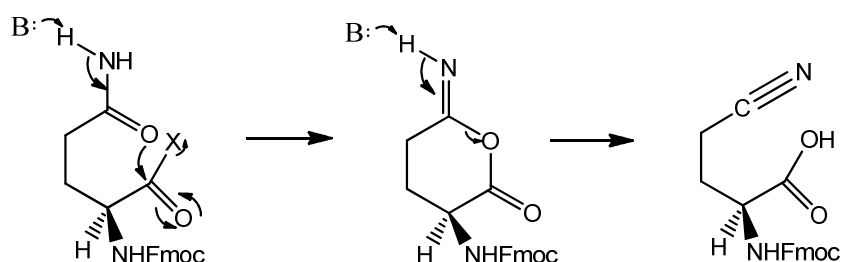
Hoofdstuk 6: Synthese van een alternatieve bouwsteen

In hoofdstuk 5 werd beschreven dat de estervorming moeilijk verloopt en dat de oorzaak hiervan vermoedelijk ligt aan de sterische hinder rond het threonine alcohol. Niet alleen is het een secundair alcohol, het is bovendien ook nog eens gelegen naast een glutamine waarvan het amide in de zijketen beschermd is met een volumineuze Trt-groep. Een mogelijke oplossing is om een glutamine in te voeren zonder zijketen bescherming, maar wel nog steeds als een Pfp-ester. De beoogde bouwsteen is molecule **VI.1**. (figuur 6.1)



Figuur 6.1 Alternatieve bouwsteen VI.1

De belangrijkste zijreactie die kan optreden bij afwezigheid van zijketen bescherming is de dehydratatie van de carboxamide zijketen tijdens de koppeling van aminozuren. (figuur 6.2) In de literatuur wordt vermeld dat “de kans op dehydratatie geminimaliseerd wordt, wanneer men de aminozuren koppelt met behulp van gepreactiveerde esters.” [41]

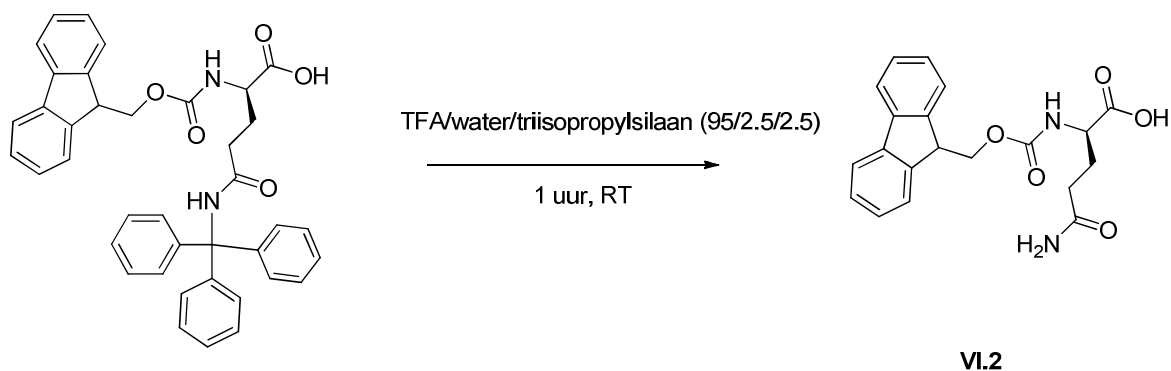


Figuur 6.2 Dehydratatie van Gln. Overgenomen uit [42]

Aangezien een gepreactiveerd aminozuur vrij reactief is moet men hier rekening mee houden voor de volgorde van de synthese van **VI.1**. Vertrekkende van Fmoc-D-Gln(NTrt)-OH zal men dus eerst een Trityl ontscherming uitvoeren en pas daarna de activatie van de bouwsteen.

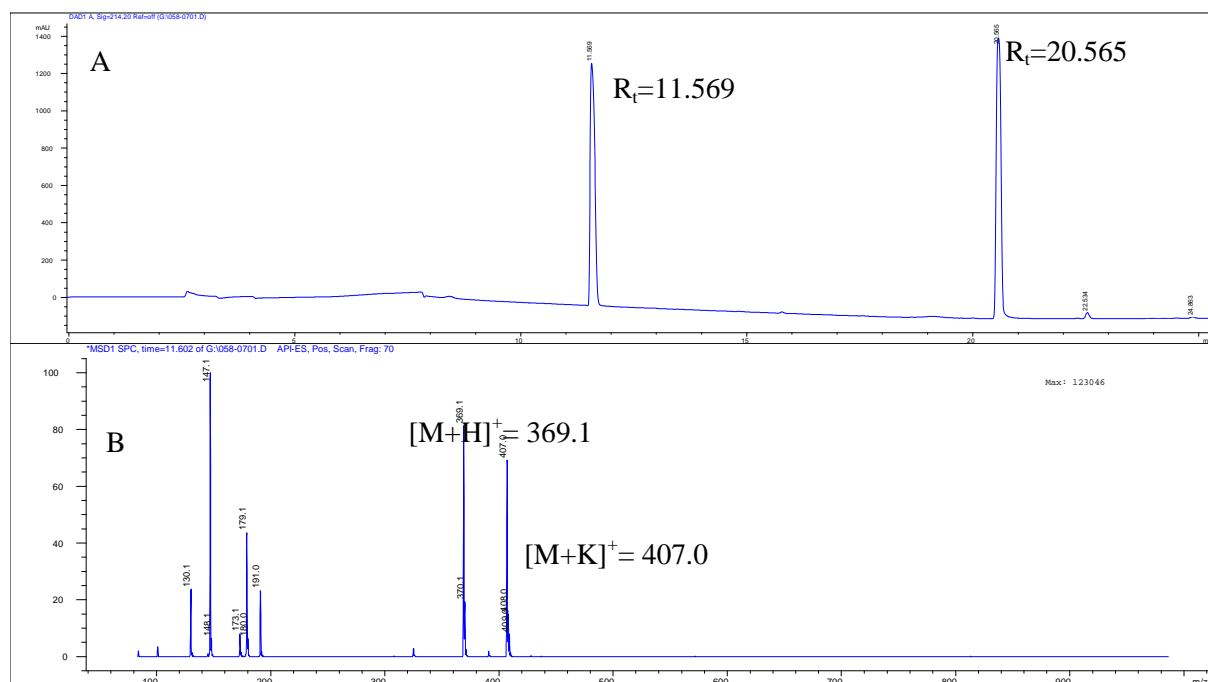
6.1 Trt-ontscherming van Fmoc-D-Gln(NTrt)-OH

Commercieel beschikbaar Fmoc-D-Gln(NTrt)-OH wordt in eerste instantie zijketen ontschermd. De zure ontscherming vindt plaats zoals voorgesteld in figuur 6.3.[65] Het ontstaan van een oranje kleur in de oplossing wijst op de aanwezigheid van het Trityl-kation. **VI.2** werd verkregen met een rendement van 89.2 %.



Figuur 6.3 Trt-ontscherming

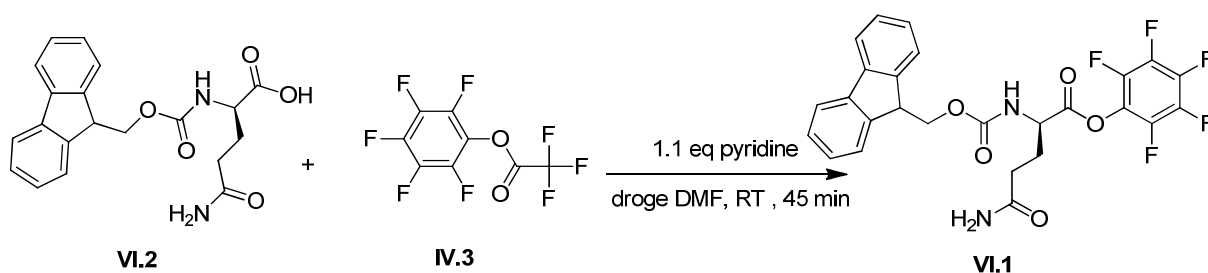
Aangezien **VI.2** geen geactiveerde groep bevat, kan men de zuiverheid van het product nu wel onderzoeken via LC-MS analyse. Het chromatogram ($\lambda=214.20$ nm) vertoont een grote piek bij $R_t=11.569$ min waarvan men in het massaspectrum twee massa's ziet bij $m/z=369.1$ en $m/z=407.0$. Deze corresponderen met respectievelijk $[\text{VI.2}+\text{H}]^+$ en $[\text{VI.2}+\text{K}]^+$. (figuur 6.4) Die piek bij $R_t=20.565$ kon niet geïdentificeerd worden en is mogelijk afkomstig van een contaminatie.



Figuur 6.4 Chromatogram (A) en massaspectrum (B) van **VI.1**, gradiënt 0-100% CH_3CN op Luna C18(2) kolom

6.2 Activatie van Fmoc-D-Gln-OH

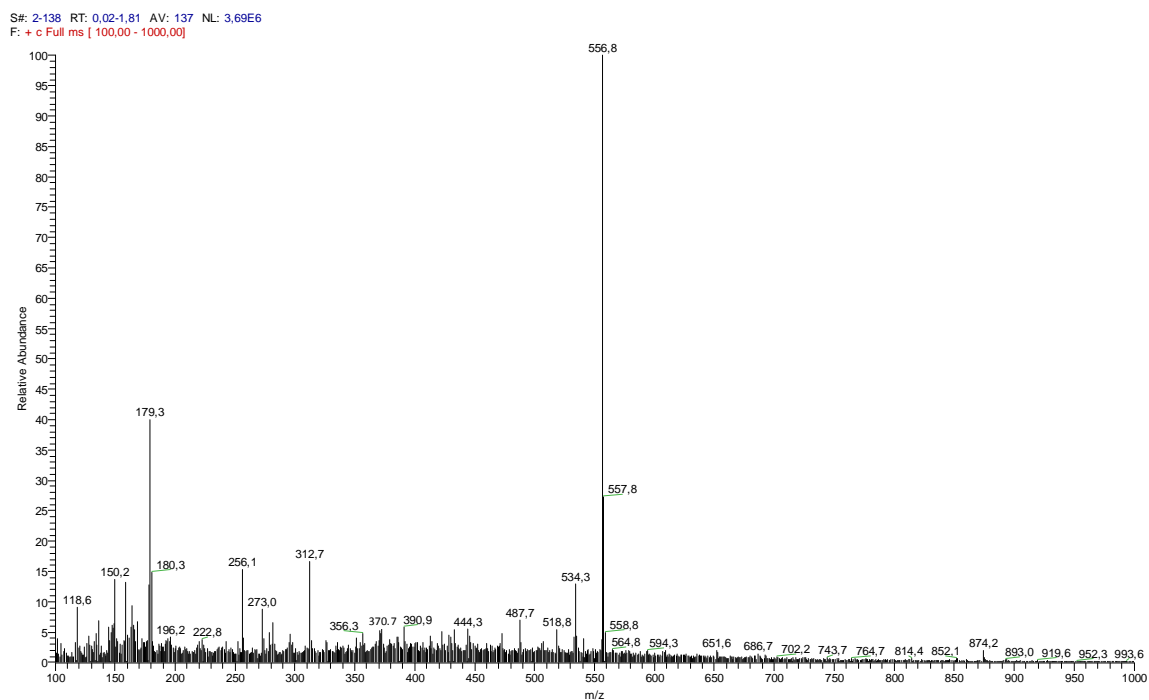
Vervolgens kan men overgaan tot de activatie van de bouwsteen. Hiervoor worden identiek dezelfde condities gebruikt als bij de vorming van de Pfp-esters in hoofdstuk 5. (figuur 6.5) [60]



Figuur 6.5 Activatie van Fmoc-D-Gln-OH

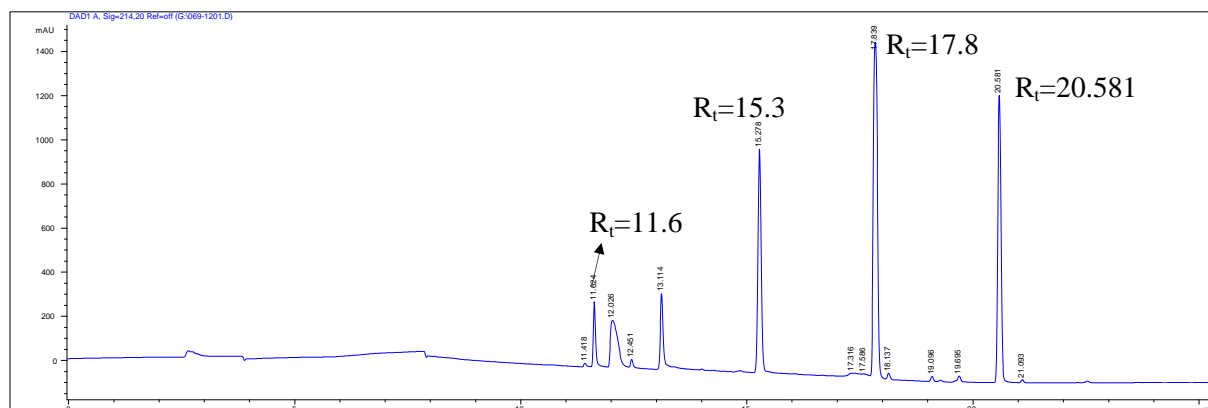
Het bekomen product werd op verschillende wijzen onderzocht waaronder met o.a. ^{19}F -NMR. In het 1D ^{19}F -spectrum zijn naast de resonanties van het product ook nog extra niet-identificeerbare signalen aanwezig.

In het massaspectrum na ESI-MS analyse, zien we 4 belangrijke pieken. De grootste piek met $m/z=556.8$ correspondeert met $[\text{VI.1}+\text{Na}]^+$. Ook de piek met $m/z=534.3$ correspondeert met dit product $[\text{VI.1}+\text{H}]^+$. Daarnaast vindt men sporen terug van het beginproduct en een cyclisch zijproduct.



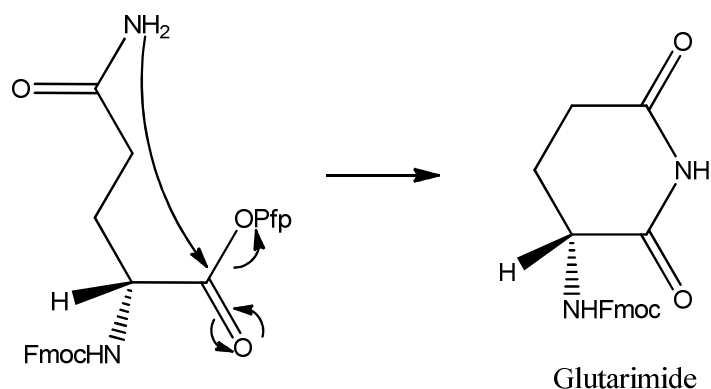
Figuur 6.6 Massaspectrum van VI.1 (in CH_3CN) bekomen met ESI-MS. De massa $m/z=179.3$ was aanwezig als contaminatie in het systeem

De LC-MS resultaten leren ons vrijwel hetzelfde. (figuur 6.7) De piek met $R_t=17.8$ minuten heeft een massa van $m/z=535$ wat correspondeert met $[\text{VI.1}+\text{H}]^+$. De piek die elueert bij met $R_t=11.6$ minuten heeft een massa van $m/z=369.1$ wat overeenkomt met $[\text{VI.2}+\text{H}]^+$. Dit is een restant ongereageerd beginproduct, hoewel het ook niet uit te sluiten valt dat deze terug ontstaan is uit VI.2. De piek bij $R_t=15.3$ minuten is afkomstig van een molecule met $m/z=351.1$ Dit stemt overeen met de massa van een cyclisch zijproduct, namelijk het glutarimide. Die piek bij $R_t=20.581$ kon niet geïdentificeerd worden en is mogelijk afkomstig van een contaminatie.



Figuur 6.7 Chromatogram van VI.1, gradient 0-100% CH_3CN op Luna C18(2) kolom

De zijreactie waarbij het glutarimide gevormd wordt - wanneer de zijketen onbeschermd is - is beschreven. [42] Het mechanisme voor de vorming van dit zijproduct wordt getoond in figuur 6.8.



Figuur 6.8 Vorming van cyclisch zijproduct

Product **VI.1** is in grote mate gevormd, maar de aanwezigheid van het cyclisch zijproduct toont aan dat deze bouwsteen vrij gevoelig is voor nevenreacties. Hierdoor lijkt het niet opportuun om na te gaan of de estervorming vlotter verloopt indien men deze minder volumineuze bouwsteen incorporeert. Om die reden werd beslist de koppeling op de Thr-OH, hoewel traag indien het beschermde Gln(Trt) aanwezig is als nabuur, niet verder te onderzoeken met dit duidelijk niet stabiele analoog.

Hoofdstuk 7: Opschaling en optimalisatie

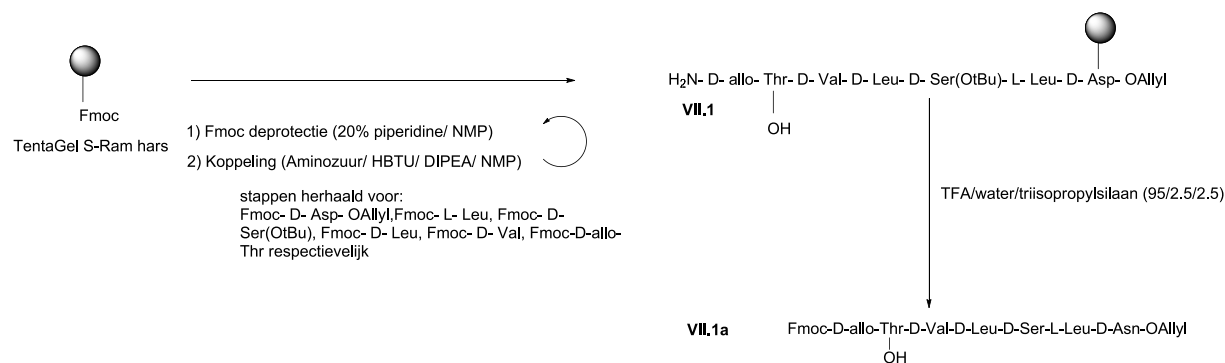
In dit hoofdstuk wordt de opschaling en optimalisatie van de route besproken. Aangezien veel punten van de synthese identiek zijn als voorheen, zullen reacties waar aan de condities niets werd gewijzigd, niet zo uitvoerig worden besproken als in hoofdstuk 5. Stap voor stap informatie kan men wel nog steeds terugvinden in hoofdstuk 9.

Deze maal wordt de synthese volledig uitgevoerd, startende van de koppeling van de eerste bouwsteen. Ook wordt nu op grotere schaal gewerkt. Voor de koppeling van de eerste zes aminozuren wordt op 150 mg hars gewerkt en de vervolgsynthese wordt voortgezet op 120 mg hars. Hierbij zal ook nagegaan worden of gedeeltelijke automatisatie mogelijk is.

Daarnaast zullen een aantal pogingen ondernomen worden om de vorming van de esterbinding te optimaliseren. Hoofdstuk vijf leerde dat enerzijds een minimale hoeveelheid DMAP vereist is als katalysator, maar anderzijds dat hoe meer DMAP wordt toegevoegd, hoe groter de kans is op epimerisatie. Daarom zal gezocht worden naar een evenwicht tussen deze twee processen, waarbij men tracht epimerisatie zoveel mogelijk te vermijden. Ook zullen hierbij nieuwe koppelingsreagentia uitgetest worden.

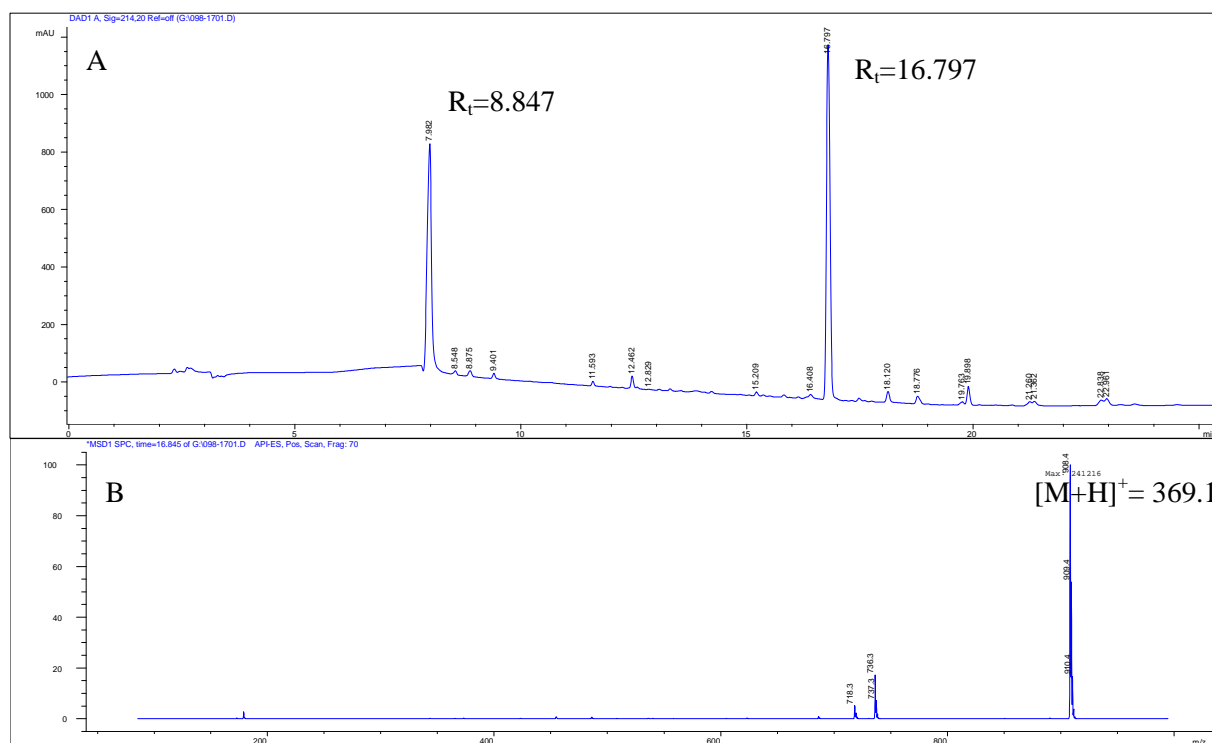
7.1 Geautomatiseerde koppeling van de eerste 6 aminozuren

Om te beginnen worden de eerste 6 aminozuren gekoppeld met behulp van de automatische syntheserobot tot het hexapeptide **VII.1**. (figuur 7.1). Hierbij wordt vertrokken van het Fmoc-beschermde TentaGel S Ram hars. Na Fmoc-ontscherming wordt aan het vrije α -amine het volgende Fmoc-beschermde aminozuur gekoppeld. Deze procedure wordt herhaald tot en met Fmoc-D-allo-Thr dat ingebouwd wordt met onbeschermde zijketen. Als koppelingsreagens wordt gebruik gemaakt van HBTU.



Figuur 7.1 Automatische synthese van **VII.1**

Hierna wordt een proefafsplitsing uitgevoerd om te controleren of het hexapeptide wel degelijk correct is gevormd. Het bekomen product wordt onderzocht met LC-MS. Figuur 7.2 toont het chromatogram ($\lambda=214.20$ nm) en massaspectrum van **VII.1a**. Buiten de solventpiek bij $R_t=8.847$ min wordt slechts één intens signaal waargenomen bij $R_t=16.797$ min. Deze is afkomstig van een product met $m/z=908.40$. Dit komt overeen met $[\mathbf{VII.1a}+H]^+$.



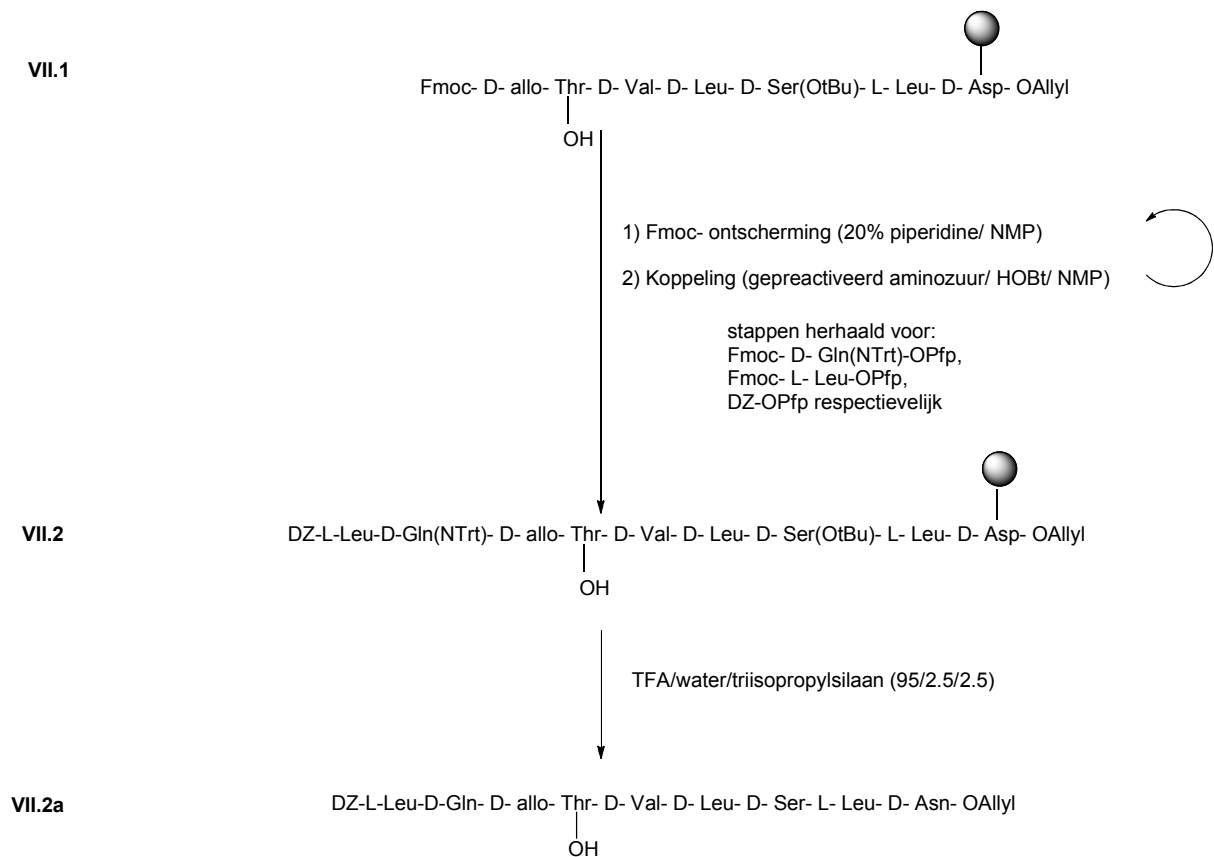
Figuur 7.2 Chromatogram (A) en massaspectrum (B) van VII.1a. Gradiënt 0-100% CH_3CN op Luna C18(2) kolom

Er zijn geen noemenswaardige signalen van zijproducten of deletiepeptiden. Het is dus zeker mogelijk om althans dit deel van de synthese te automatiseren. Voor de volgende stappen is dit vermoedelijk minder vanzelfsprekend omdat zowel de aard als de efficiëntie van de reacties verschillen.

7.2 Koppeling van de gepreactiveerde bouwstenen

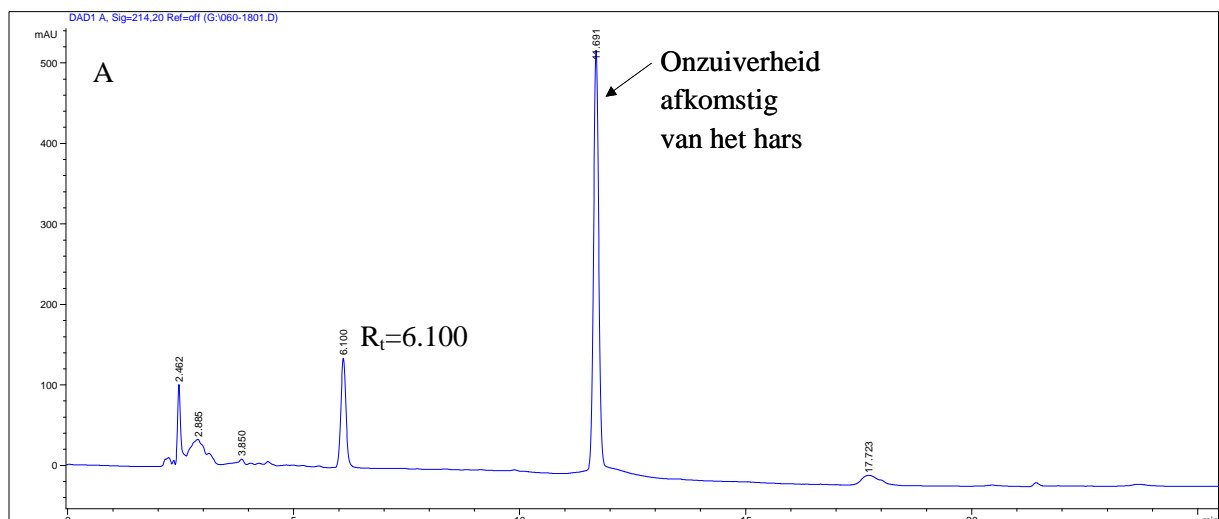
Nadat het laatste aminozuur – D-allo-Thr(OH) – werd ingebouwd met onbeschermde zijketen, worden de volgende bouwstenen manueel gekoppeld onder de vorm van hun Pfp-ester. De werkwijze wordt voorgesteld in figuur 7.3

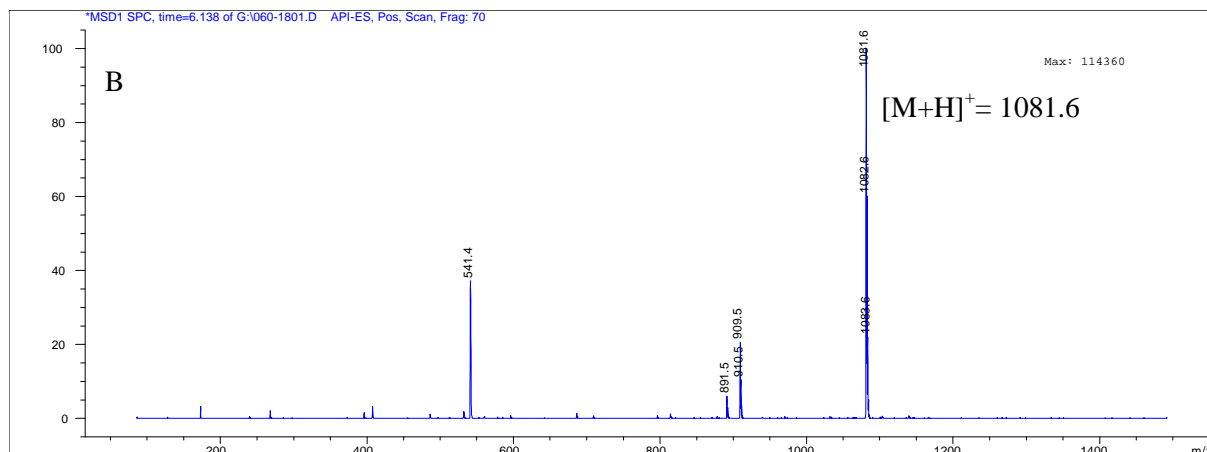
Na elke koppeling van een bouwsteen werd de reactie gecontroleerd met behulp van LC-MS. Deze wezen steeds op succesvolle koppeling. Ook op het finale **VII.2** werd een afsplitsing op kleine schaal uitgevoerd.



Figuur 7.3 Koppeling via gepreactiveerde bouwstenen en proefafsplitsing

Het bekomen lipopeptide **VII.2a** werd onderzocht met LC-MS. (figuur 7.4). De piek bij $R_t=6.100$ min correspondeert met een massa $m/z=1081.6$. Dit is afkomstig van $[\mathbf{VII.2a}+H]^+$. Er is geen spoor van (noemenswaardige) nevenproducten.





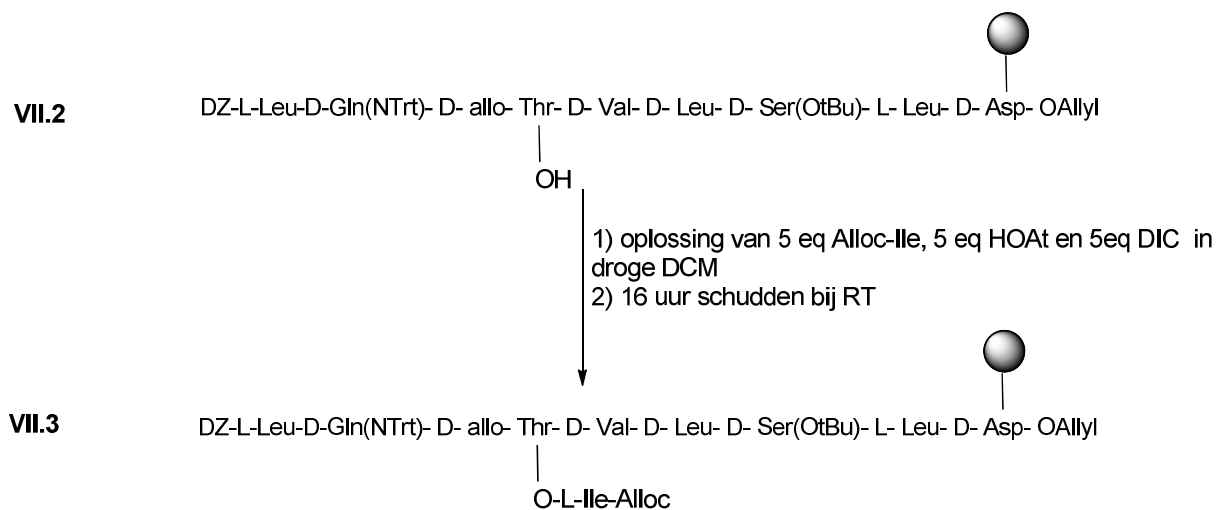
Figuur 7.4 Chromatogram (A) en massaspectrum (B) van VII.2a De piek bij $R_t=11.691$ min. is vermoedelijk afkomstig van het hars. Gradiënt 75-100% CH_3CN op Luna C18(2) kolom

7.3 Testkoppeling van Alloc-Ile: poging tot optimalisatie

Het laatste aminozuur dat gekoppeld dient te worden is Alloc-Ile via de vorming van een esterbinding. Deze reactie ging eerder niet zo vlot door (zie 5.3), daarom wordt drie keer 10 mg van het hars **VII.7** afgezonderd om hierop testreacties uit te voeren, met als doel geoptimaliseerde koppelingscondities te vinden.

7.3.1 Eerste poging voor koppeling van Alloc-Ile

Bij een eerste poging die ondernomen werd gewerkt in totale afwezigheid van DMAP. Er wordt wel 1-hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt) als additief toegevoegd. Het experiment dat werd opgezet, wordt getoond in figuur 7.5.

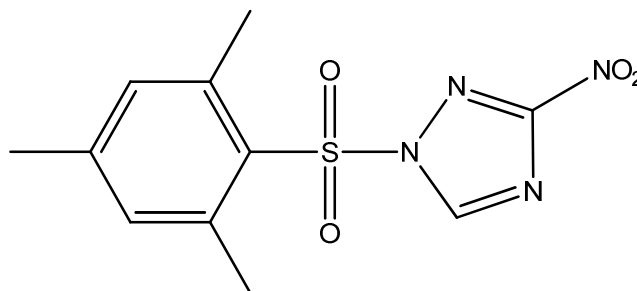


Figuur 7.5 Koppeling van Alloc-Ile

Na proefafplitsing en analyse met LC-MS zag men enkel een piek afkomstig van het beginproduct (**VII.2**). In de massaspectra was zelfs bij geen enkele retentietijd ook maar een spoor te bekennen van het gekoppelde Alloc-Ile. Dit duidt erop dat de aanwezigheid van een reactieve katalysator (zoals DMAP) vereist is.

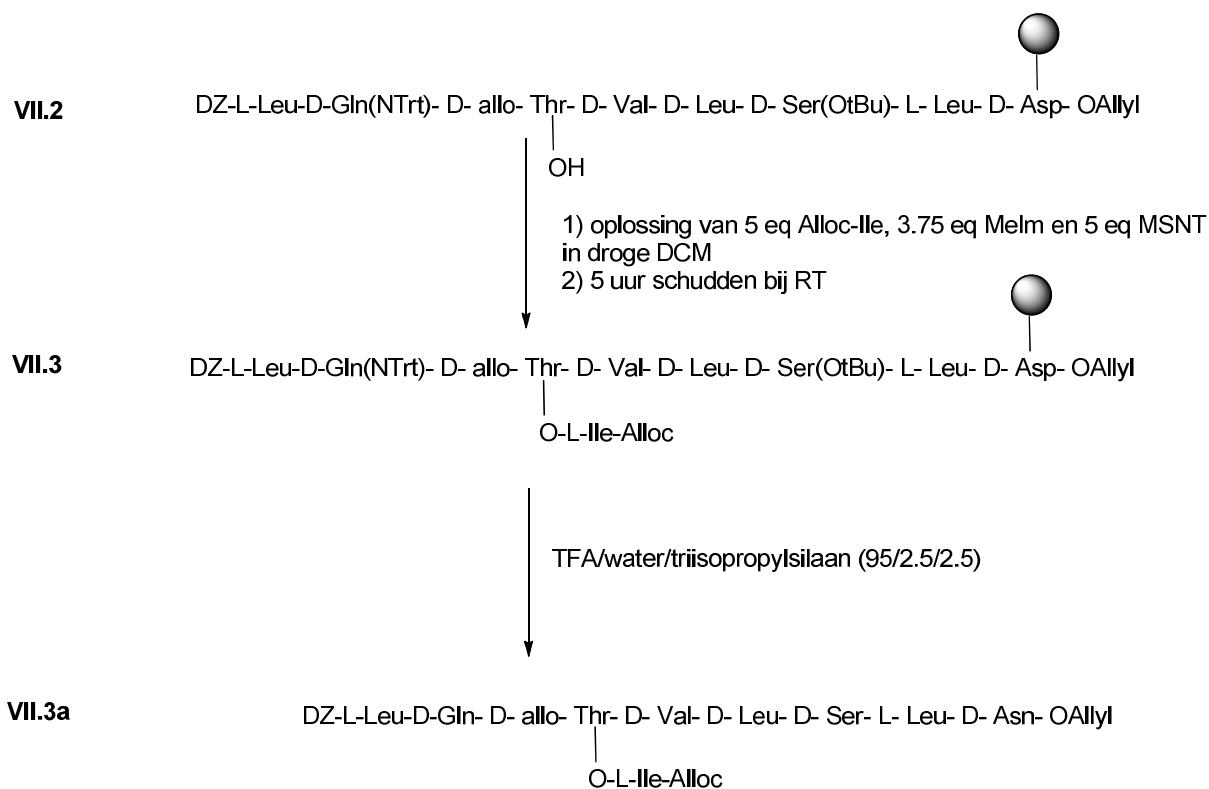
7.3.2 Tweede poging voor koppeling van Alloc-Ile

In een tweede poging wordt het over een andere boeg gegooid, en wordt er gebruik gemaakt van een totaal andere koppelingsreagens: 1-(mesityleen-2-sulfonyl)-3-nitro-1,2,4-triazool (MSNT). (figuur 7.6) In combinatie met 1-methylimidazool (MeIm) wordt dit meer en meer gebruikt voor veresteringsreacties op vaste fase. Het wordt ook gebruikt voor de koppeling van het eerste aminozuur op het Wang hars. Het is zelfs de voorkeursmethode wanneer men werkt met epimerisatie-gevoelige aminozuren. [41, 66]



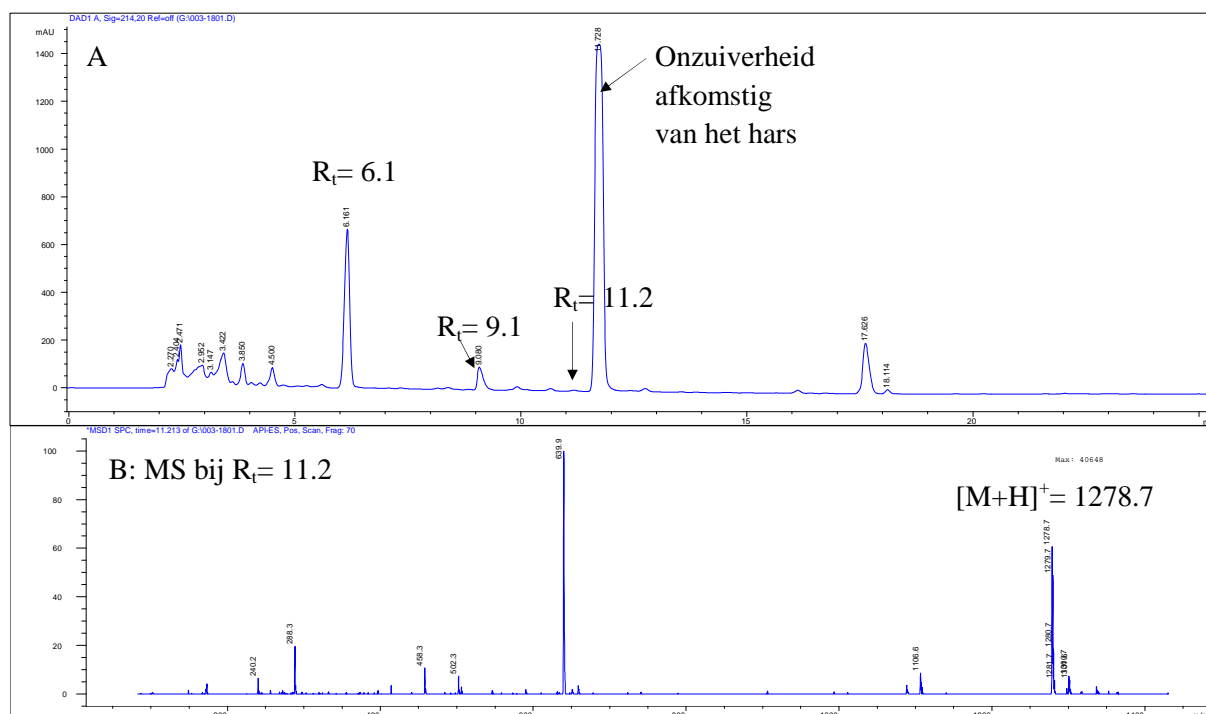
Figuur 7.6 MSNT

De gebruikte condities worden weergegeven in figuur 7.7. Er werd hier ook geëxperimenteerd met de reactietijd maar dit bleek amper verschil uit te maken, omdat eveneens nauwelijks koppeling doorging. Na afsplitsing van een deel van het hars werd het bekomen peptide onderzocht met LC-MS.



Figuur 7.7 Koppeling van Alloc-Ile en afsplitsing

In het bekomen chromatogram ($\lambda=214.20$ nm) is de piek bij $R_t=6.1$ min afkomstig van het beginproduct **VII.2** (figuur 7.8). De piek bij $R_t=9.1$ min ioniseert niet op de massadetector en is vermoedelijk afkomstig van een onzuiverheid. Amper zichtbaar maar toch aanwezig vinden we ook de massa terug van **VII.3a** bij $R_t=11.2$ min. Als men dit vergelijkt met het resultaat beschreven in hoofdstuk vijf, dan komt dit overeen met het diastereomeer met de traagste elutietijd.

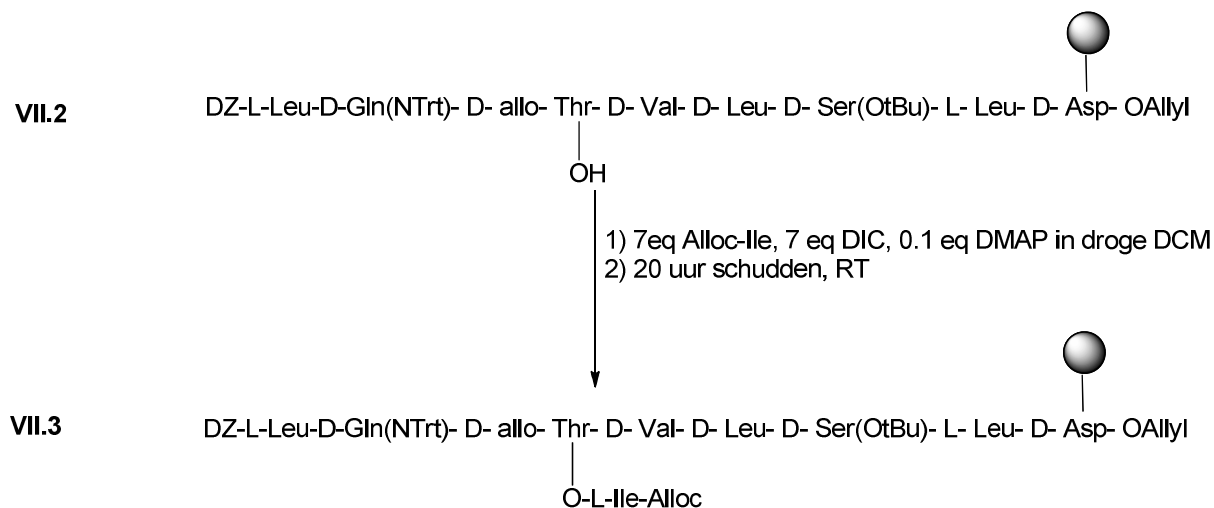


Figuur 7.8 Chromatogram (A) en massaspectrum (B) van VII.3a Gradiënt 75-100% CH₃CN op Luna C18(2) kolom

Niettegenstaande het lage rendement van deze reactie, geeft dit resultaat toch belangrijke informatie. Aangezien MSNT wordt gebruikt om epimerisatie te vermijden, kan men veronderstellen dat de zichtbare massa behoort tot het diastereomeer waarvan de stereochemie niet is veranderd.

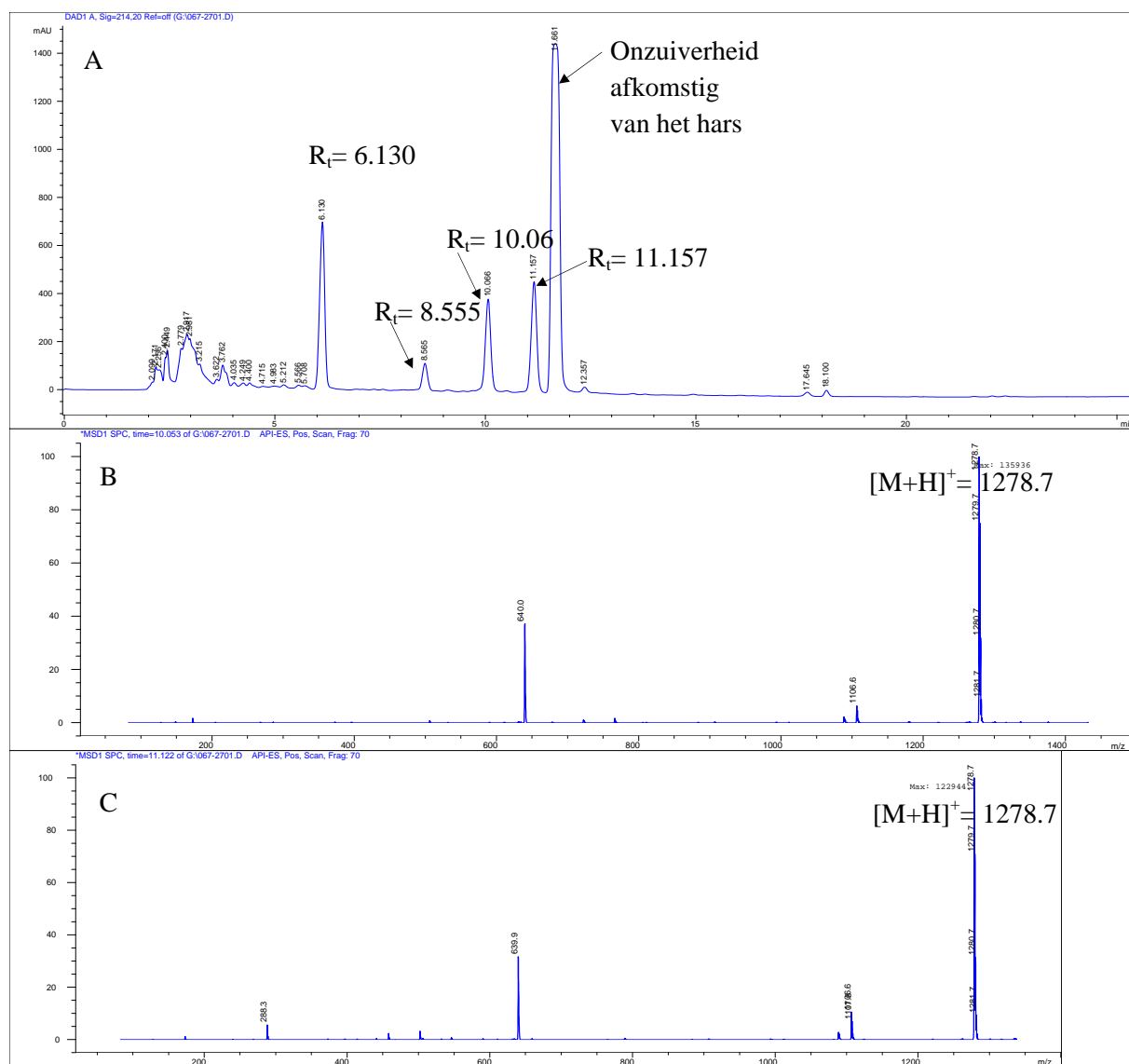
7.3.3 Derde poging voor koppeling van Alloc-Ile

Als derde poging wordt teruggegrepen naar de methode beschreven in hoofdstuk 5. Deze keer wordt er maar 0.1 equivalent DMAP toegevoegd. (figuur 7.9)



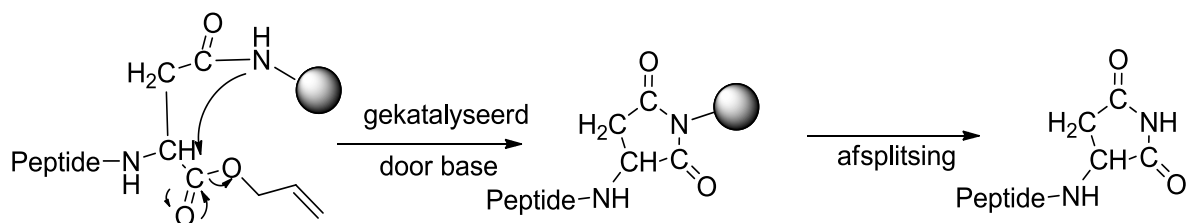
Figuur 7.9 Koppeling van Alloc-Ile

Het chromatogram, bekomen na een proefafsplitsing, wordt getoond in figuur 7.10. Wat opvalt is dat een groot deel van het beginproduct ($R_t=6.130$ min) is weggereageerd, maar dat opnieuw de twee diastereomeren ($R_t= 10.066$ en 11.2 min) zijn gevormd. Vermoedelijk speelt de omgevingstemperatuur in het labo een rol, die in deze situatie heeft geleid tot gedeeltelijke verdamping van DCM. Hierdoor is de concentratie van DMAP sterk toegenomen, waardoor mogelijk zowel de reactiesnelheid als de mate van epimerisatie vergroot worden.



Figuur 7.10 Chromatogram (A) en massaspectrum (B-C) van VII.3a. Gradiënt 75-100% CH₃CN op Luna C18(2) kolom

Daarnaast is er ook nog een piek aanwezig bij $R_t = 8.604$ min met $m/z = 1221.60$. Dit product wordt eveneens tijdens deze reactie gevormd. De massa stemt overeen met een aspartimidevorm van VII.3. (figuur 7.11) De vorming van dit soort verbindingen wordt door basen gekatalyseerd. [67]



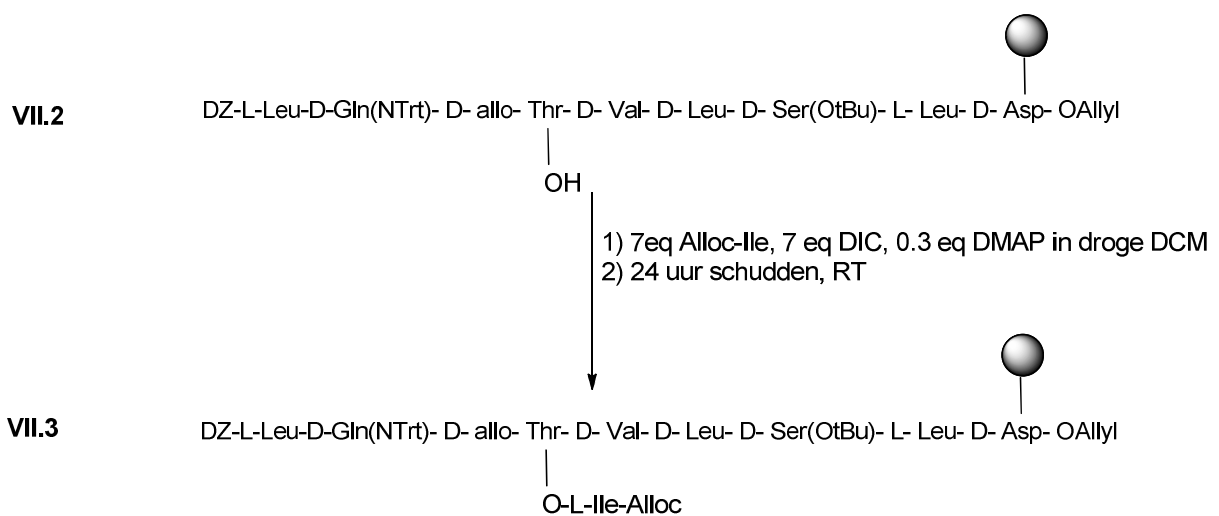
Figuur 7.11 Mechanisme voor de vorming van een aspartimide zijproduct

Tot dusver blijkt dat van de uitgeteste condities enkel DIC/DMAP werkt. Aangezien DCM verdampt tijdens de heel lange reactietijden, is het erg moeilijk om de concentratie van DMAP te controleren. Er wordt besloten om verder te werken met deze condities: deze leiden weliswaar tot epimerisatie, maar afgaande op het chromatogram zijn beide epimeren eenvoudig van elkaar te scheiden.

7.4 Koppeling van Alloc-Ile: geoptimaliseerde condities

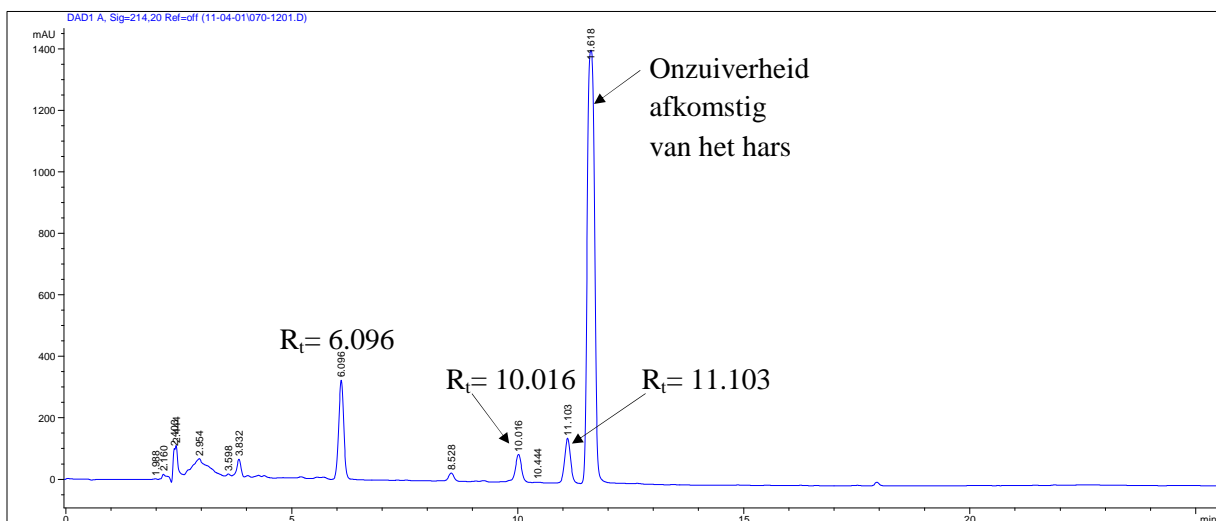
Op de overige 80 mg hars werd de DIC/DMAP werkwijze initieel herhaald. Tijdens het uitvoeren van deze reactie, werden in de literatuur toch nog koppelingscondities gevonden die de moeite waard waren om uit te testen. Omdat na de eerste reactie met DIC/DMAP er nog overvloedig beginproduct aanwezig was, werden deze nieuwe koppelingscondities alsnog uitgevoerd op dezelfde reactor. Deze bleken uiteindelijk erg goed en met een superieure selectiviteit te werken, maar aangezien op dezelfde reactor dus eerst al de klassieke DIC/DMAP condities werden uitprobeerde, waren de twee diastereomeren al in grote mate aanwezig. Toch is er een groot verschil te zien tussen de klassieke en de geoptimaliseerde condities.

Eerst werden tweemaal de klassieke condities uitgevoerd zoals weergegeven in figuur 7.12 met 0.3 equivalenten DMAP. Daarnaast werd ook DCM toegevoegd tijdens de reactie om de concentratie van het reagens constant te houden. Deze koppeling met 0.3 equivalenten DMAP werd twee keer herhaald.



Figuur 7.12 Koppeling van Alloc-Ile volgens de klassieke condities

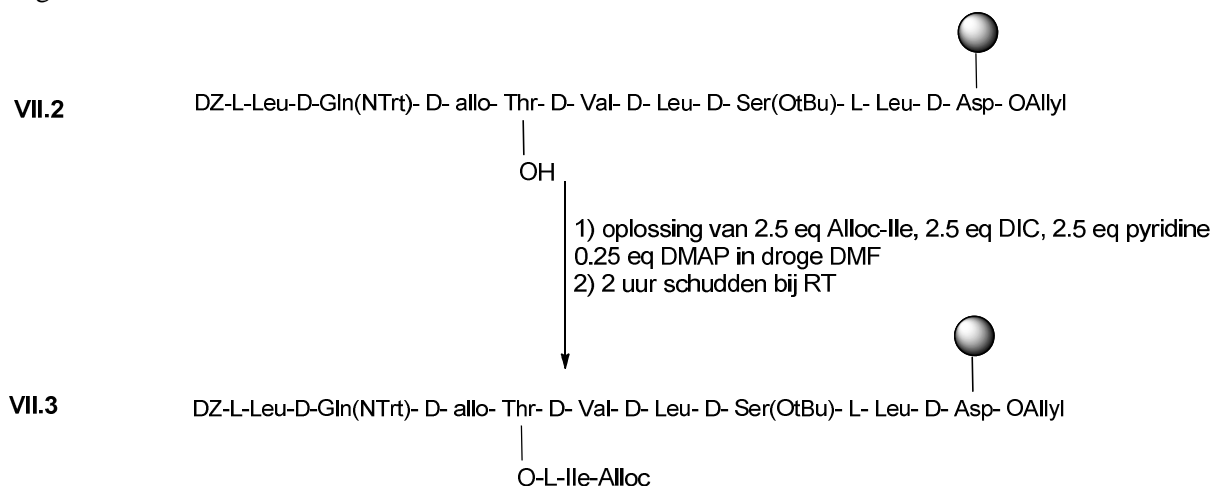
Na proefafsplitsing en analyse met LC-MS ziet het bekomen chromatogram ($\lambda=214.20$) er als volgt uit:



Figuur 7.13 Chromatogram na herhaalde koppeling onder klassieke condities. De piek bij $R_t=11.618$ min is vermoedelijke afkomstig van het hars. Gradiënt 75-100% CH_3CN op Luna C18(2) kolom

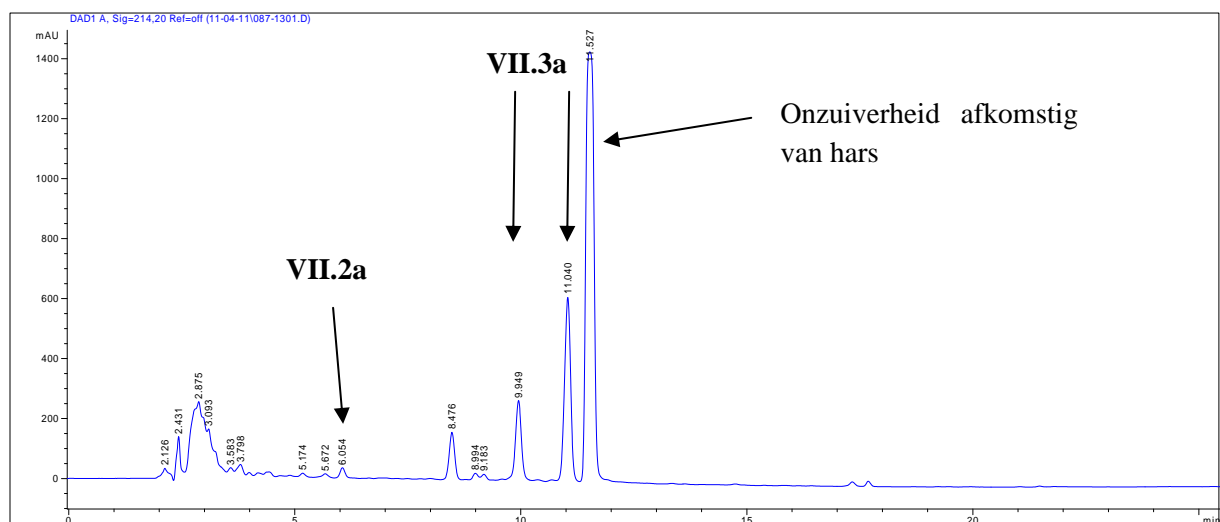
Men ziet dat de diastereomeren ($R_t=10.016$ min en 11.103 min) min of meer in zelfde mate aanwezig zijn. Maar er is vooral nog heel veel beginproduct ($R_t=6.096$ min) aanwezig. Het vermoedelijke aspartimideproduct is eveneens in beperkte mate aanwezig. ($R_t=8.528$ min)

De reactie wordt vanaf nu herhaald met de nieuwe condities, maar nog steeds op hetzelfde hars. Hierbij wordt gewerkt met 2.5 equivalenten Alloc-Ile, 2.5 equivalenten DIC, 2.5 equivalenten pyridine en ook nog 0.25 equivalenten DMAP in droge DMF. [68] Het gebruik van het minder basische pyridine heeft als voordeel dat minder epimerisatie optreedt en men meer katalysator kan gebruiken. Deze nieuwe condities maken gebruik van DMF als solvent, dat veel minder vluchtig is, wat toelaat het proces beter te controleren. Deze reactiecondities, getoond in figuur 7.14, worden 5 keer uitgevoerd.



Figuur 7.14 Koppeling van Alloc-Ile met de geoptimaliseerde condities

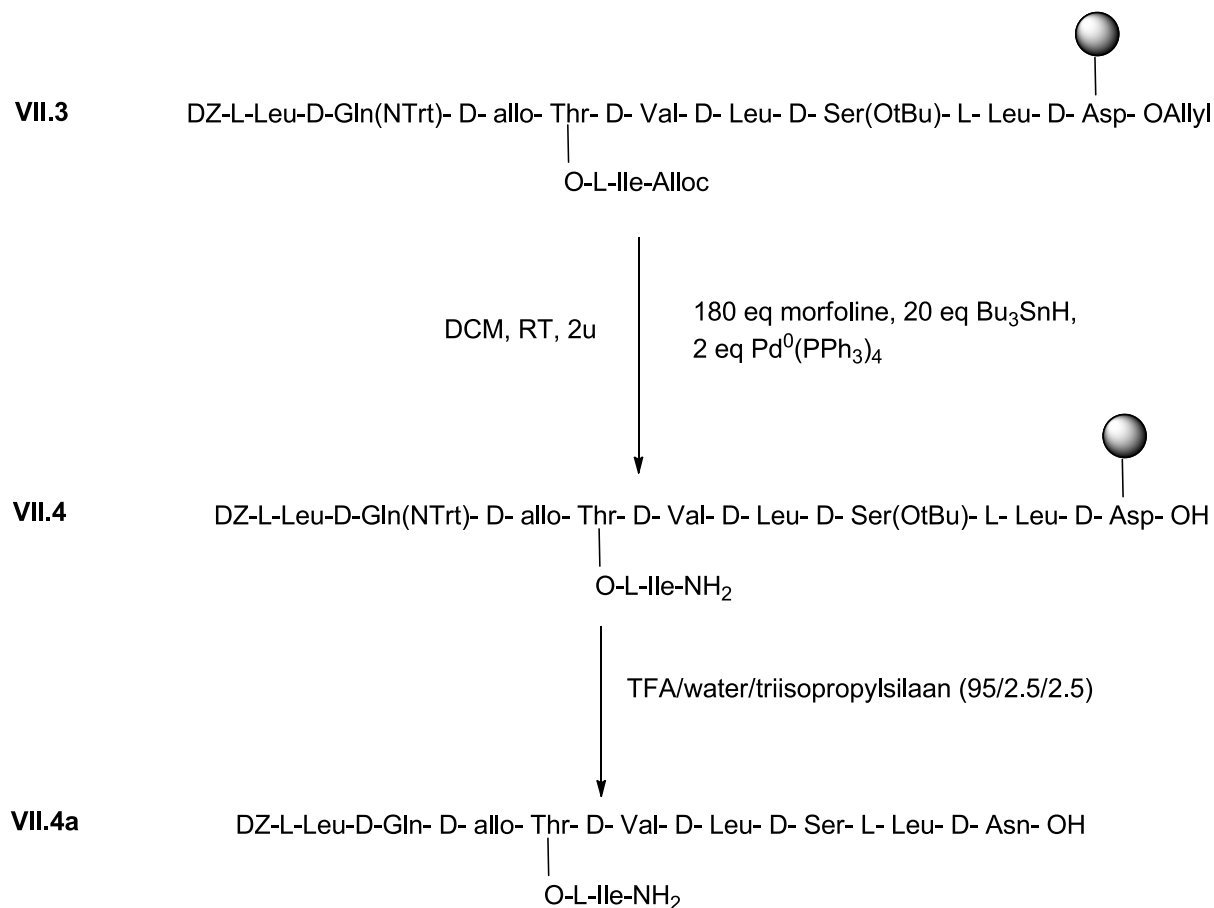
Na afsplitsing op kleine schaal en analyse met LC-MS bekomt men het chromatogram getoond in figuur 7.15. Wat meteen opvalt, is dat de intensiteit van het laatste diastereomeer ($R_t=11.040$ min) toegenomen is in vergelijking met het eerste diastereomeer ($R_t= 9.949$ min). De aanwezigheid van het eerste diastereomeer is bovendien grotendeels te verklaren door het gebruik van de klassieke condities. Dat het tweede diastereomeer een grotere intensiteit heeft, is ook in overeenstemming met het resultaat van de koppeling met MSNT: ook daar werd enkel het tweede diastereomeer gevormd. Er is nu ook voldoende **VII.3** aanwezig om de volgende stap uit te voeren. Het product bij $R_t= 8.5$ min is vermoedelijk afkomstig van een aspartimide zijproduct. De grootste piek ($R_t=11.527$ min) in het chromatogram is vermoedelijk afkomstig van een nevenproduct afkomstig van het hars.



Figuur 7.15 LC-MS chromatogram van VII.3a. Gradiënt 75-100% CH₃CN op Luna C18(2) kolom.

7.5 Allyl en Alloc-ontscherming

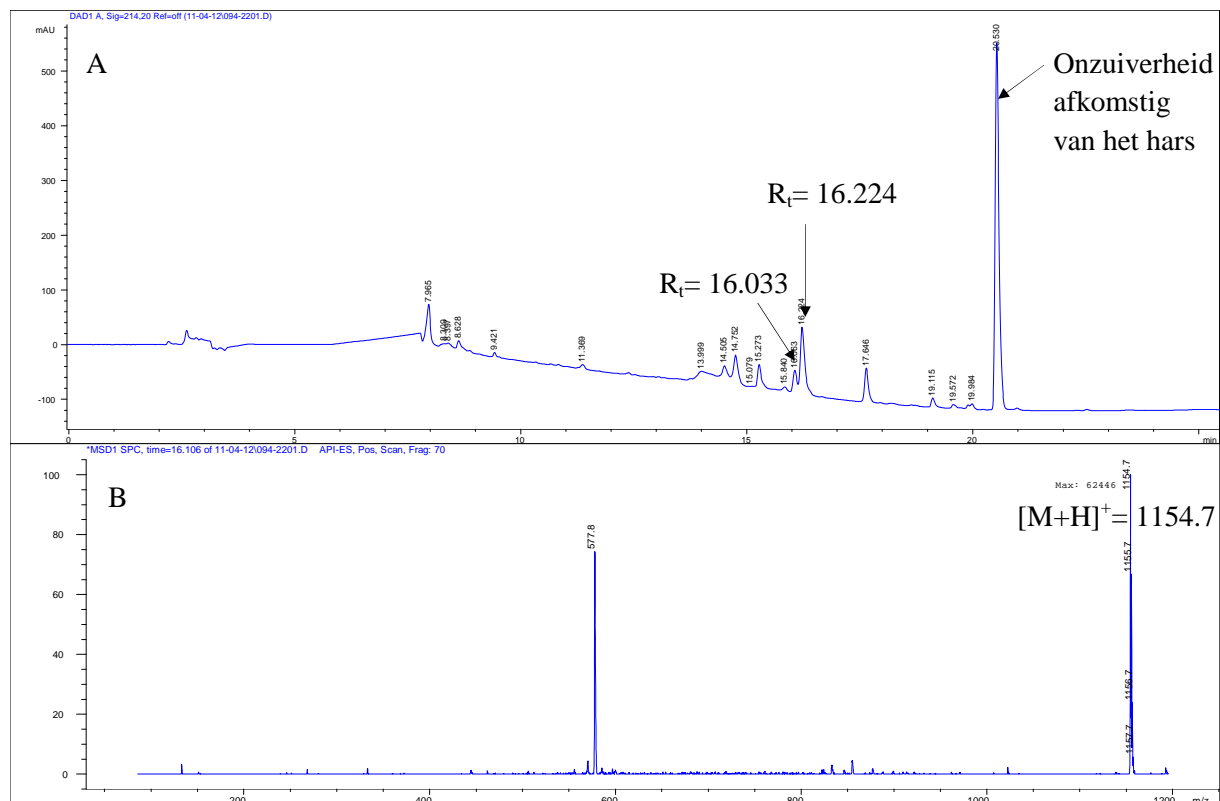
In de volgende stap wordt een Allyl en Alloc-ontscherming uitgevoerd volgens de eerder gebruikte methode. [39] (figuur 7.16) Een deel van het bekomen product wordt afgesplitst van de vaste drager en onderzocht met LC-MS.



Figuur 7.16 Allyl en Alloc-ontscherming van VII.3 en afsplitsing

Het bekomen chromatogram ($\lambda=214.20$ nm) wordt getoond in figuur 7.17. De massa van de pieken bij $R_t=16.033$ min en 16.224 min komt overeen met [VII.4a+H]⁺. De twee diastereomeren elueren nu korter na elkaar omwille van een gewijzigde gradiënt in de samenstelling van de mobiele fase. Van het

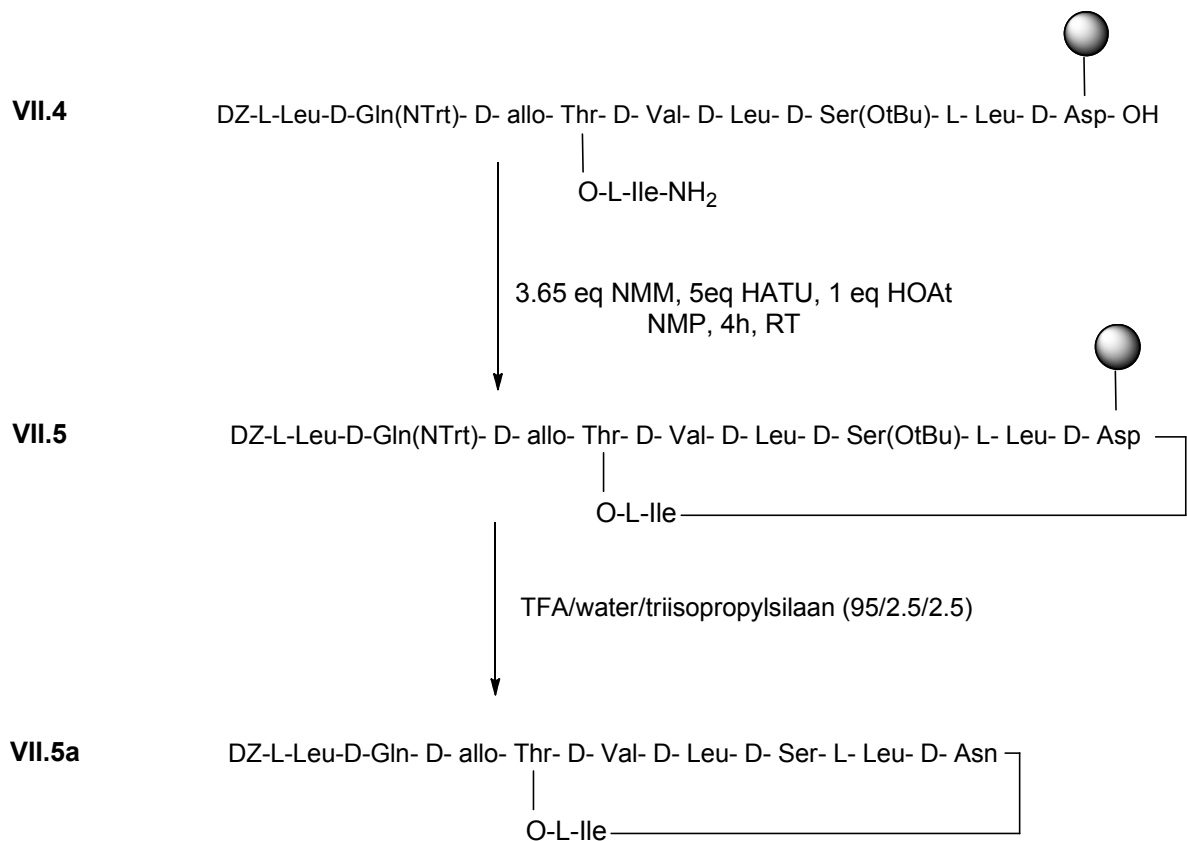
beginproduct vindt men geen spoor meer terug, dit duidt op een succesvolle Allyl- en Alloc-ontscherming. Het nevenproduct (aspartimide) lijkt ook verdwenen te zijn, wat mogelijk te verklaren valt door het gebruik van een andere gradiënt tijdens de LC-MS analyse.



Figuur 7.17 Chromatogram (A) en massaspectrum (B) van VII.4a. Gradiënt 0-100% CH₃CN op Luna C18(2) kolom

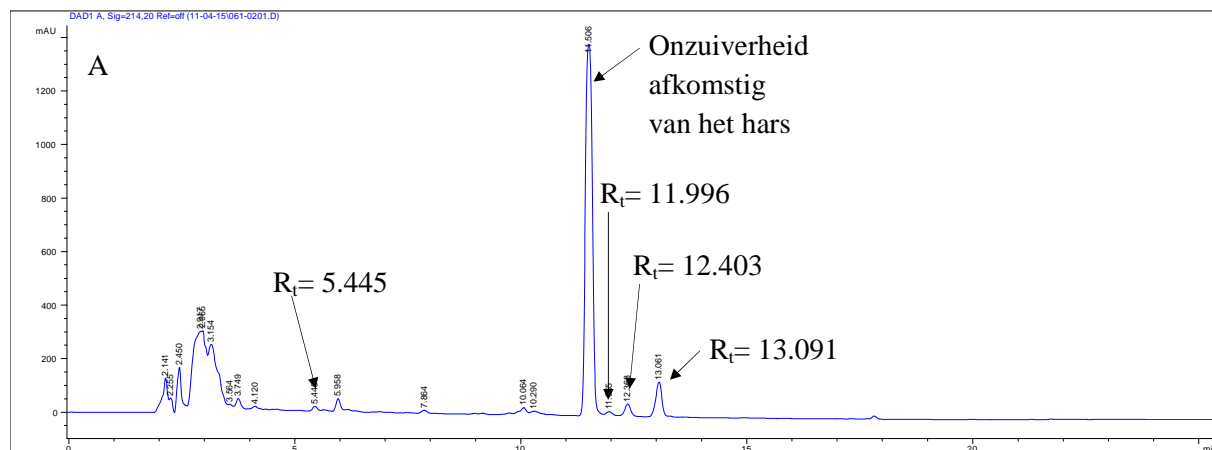
7.6 Sluiting en afsplitsing

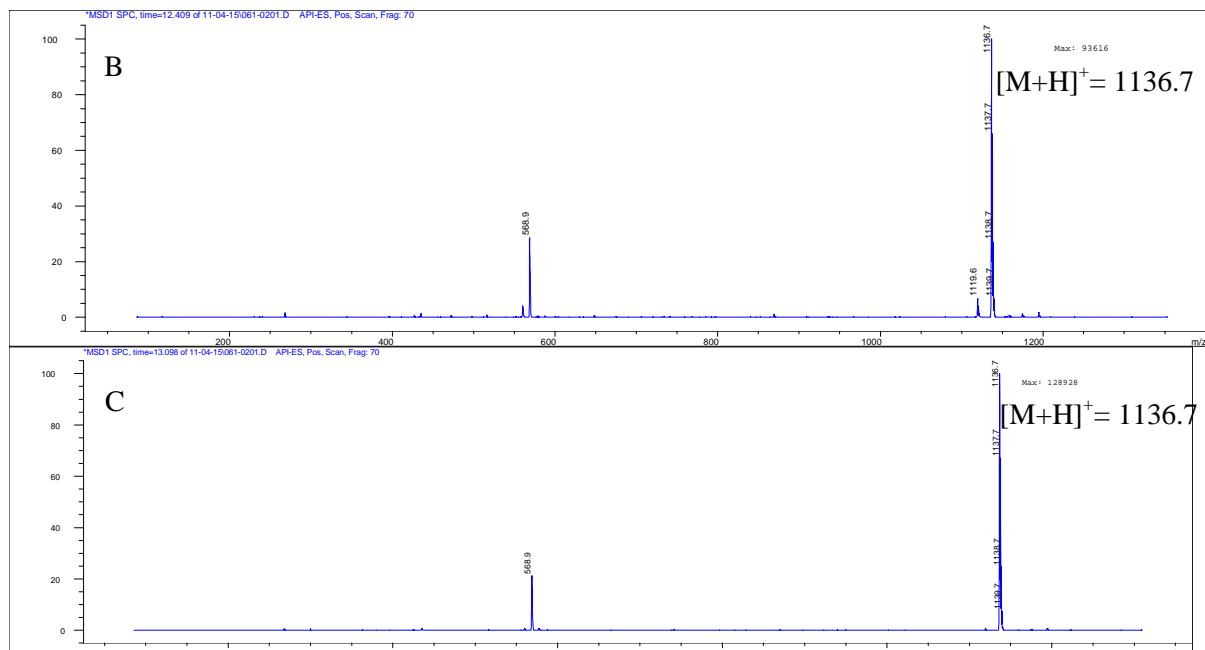
Tot slot wordt de kop-staart sluiting uitgevoerd met behulp van HATU/HOAt/NMM. [32] Om epimerisatie te vermijden, wordt het aantal equivalenten base beperkt gehouden. Er wordt gebruik gemaakt van 5 eq HATU, 1 eq HOAt en 3.65 eq NMM. De reactiecondities worden getoond in figuur 7.18.



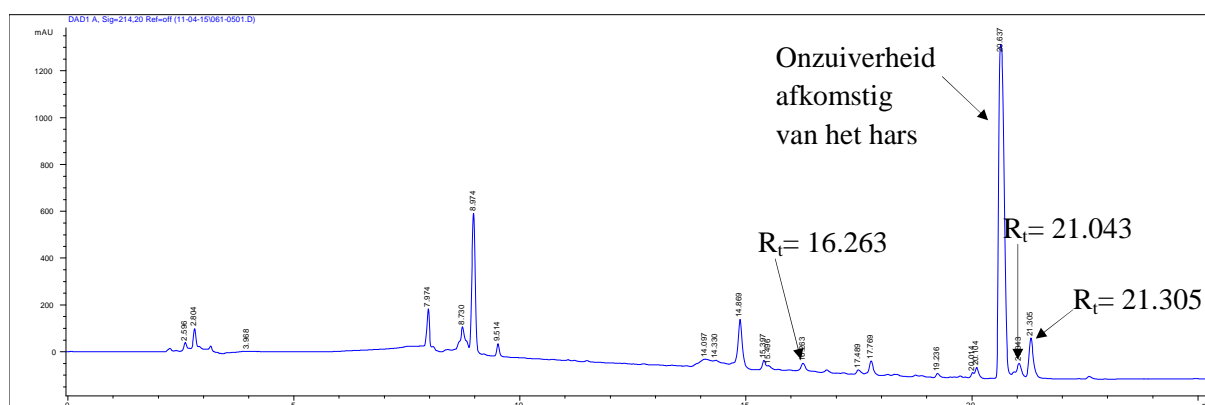
Figuur 7.18 Cyclisatie van VII.4 en proefafsplitsing

Vervolgens wordt een proefafsplitsing uitgevoerd op **VII.5**. Het bekomen product wordt onderzocht met LC-MS. Het chromatogram ($\lambda=214.20$ nm) met gradiënt van 75 naar 100% CH₃CN en bijhorende massaspectra worden getoond in figuur 7.19. Men herkent drie pieken bij $R_t=11.996$ min, 12.403 min en 13.091 min die corresponderen met $m/z=1136.7$. Niet zichtbaar in het chromatogram, maar wel in de massaspectra is de aanwezigheid van een vierde diastereomeer. De massa van het beginproduct kan men bij deze gradiënt niet terugvinden in de massaspectra. In het chromatogram met gradiënt van 0 naar 100% CH₃CN echter kan men zowel begin- als eindproducten herkennen. (figuur 7.20) De piek bij $R_t=16.263$ min wordt veroorzaakt door een minieme hoeveelheid beginproduct. De pieken bij $R_t=21.043$ min en 21.305 min ioniseren weliswaar niet, maar door vergelijking met het vorige chromatogram uit figuur 7.19 kan men ze toewijzen aan **VII.5a**.





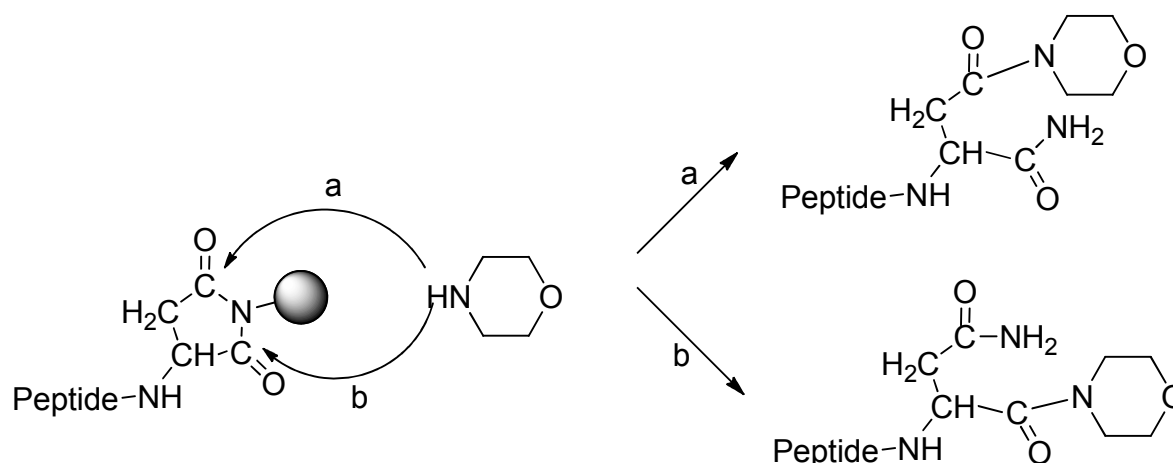
Figuur 7.19 Chromatogram (A) en massaspectrum (B en C) van VII.5a. Gradiënt 75-100% CH_3CN op Luna C18(2) kolom. De piek bij $R_t=5.445$ is een nevenproduct dat vermoedelijk morfoline bevat.



Figuur 7.20 Chromatogram van VII.5a. met gradiënt 0-100% CH_3CN op Luna C18(2) kolom

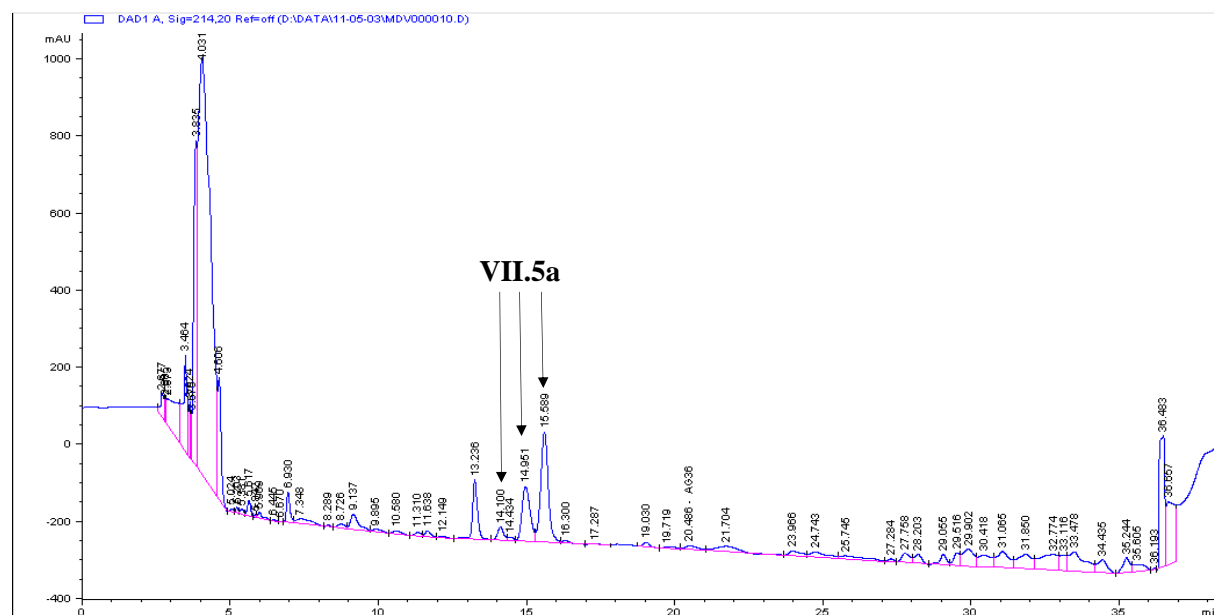
Men kan dus concluderen dat ringsluiting kwantitatief is doorgegaan. In beperkte mate treedt er epimerisatie op aan het α -proton van Asn, dit stelt men vast omdat men van twee naar vier diastereomeren gaat. De geringe intensiteit van de extra signalen duidt er echter op dat epimerisatie gedurende de ringsluiting minimaal is.

Na allyl en alloc-ontscherming vond men niet direct een spoor van het aspartimide, wat mogelijk te verklaren valt door het gebruik van een andere gradiënt tijdens de LC-MS analyse of door verdere reactie van dit nevenproduct. Wanneer men terug de 75-100% CH_3CN gradiënt bekijkt na sluiting (figuur 7.19), ziet men bij $R_t=5.445$ min een kleine piek met $m/z=1223.7$. Vermoedelijk ontstaat dit product door ringopening van het aspartimide na een nucleofiele aanval van morfoline tijdens de Alloc-ontscherming. (figuur 7.21) Het is gekend dat ringopening van een aspartimide kan gebeuren in aanwezigheid van piperidine. Dit zou dus kunnen gebeuren tijdens de Alloc-ontscherming. In het chromatogram treft men wel slechts één duidelijke piek aan, hoewel het morfoline in principe op twee plaatsen kan aanvallen. Mogelijk geniet een van beide plaatsen de voorkeur, ofwel kan men de twee producten niet scheiden bij deze gradiënt. Hoe dan ook het aandeel van deze nevenreactie is zeer beperkt.



Figuur 7.21 Mechanisme voor de vorming van morfoline zijproduct

Aangezien het eindproduct aanwezig is, wordt nu al het product afgesplitst. Na de afsplitsing werd een precipitatie met koude MTBE uitgevoerd. Vertrekkende van een 70-tal mg hars werd na zuivering 28 mg ruw peptide bekomen met een witbruine kleur. Dit bestaat op dit stadium wel nog uit een mengsel van de 3 diastereomeren en mogelijke andere zijproducten. Met behulp van HPLC worden de fracties bij $R_t=14.100$ min, 14.951 min en 15.589 min manueel gecollecteerd. (figuur 7.22) De piek bij $R_t=13.236$ min is het eerder vermelde UV-actieve product dat sterk is afgenomen maar toch niet volledig is verwijderd.



Figuur 7.22 Chromatogram van VII.5a, gradiënt 75-100% CH_3CN in 30 minuten op Luna C18(2) kolom. De opgevangen fracties zijn met pijlen aangeduid.

Aangezien slechts een beperkte hoeveelheid peptide (0.25 mg) per keer kan geïnjecteerd worden om goed geresolveerde pieken te verkrijgen, werd niet al het peptide opgezuiverd. Na het indampen van de fracties, wordt ook een lyofilisatie uitgevoerd om de laatste solventresten te verwijderen.

7.7 Conclusie en discussie

De synthese op grote schaal heeft opnieuw heel veel informatie opgeleverd. Zo is gebleken dat het mogelijk is om een groot gedeelte van de route te automatiseren. Vooral naar synthese van analogen toe is dit goed nieuws.

Daarnaast werden ook condities gevonden die toelaten om kwantitatief veel meer van het gewenste diastereomeer te bekomen bij vorming van de esterbinding naar Alloc-Ile. Dat dit effectief het correcte diastereomeer is, kan worden besloten uit de reactie met MSNT, omdat met dit koppelingsreagens selectief meer van het niet geëpimeriseerde product wordt gevormd. Daarnaast kan men dit afleiden omdat bij de vorming van de esterbinding met het minder basische pyridine als katalysator, opeens veel meer van het diastereomeer met de grootste retentietijd werd gevormd. Pyridine is minder basisch dan DMAP en zal dus ook minder snel een proton onttrekken, waardoor de kans op epimerisatie sterk verkleint. De verhouding tussen de twee diastereomeren blijft gedurende de verdere synthese behouden, waardoor men het correcte product kan blijven volgen. De geoptimaliseerde condities maken gebruik van DMF en pyridine en bovendien is de reactieduur veel beperkter.

Aangezien de betere condities slechts werden ontdekt nadat reeds begonnen was met de oude condities uit te voeren op het hars, is er toch nog vrij veel van het andere diastereomeer aanwezig. Hoe dan ook bij herhaling van de synthese beschikt men nu over geoptimaliseerde condities en zal het verschil nog meer uitgesproken zijn.

Tot slot wordt nog even stilgestaan bij de aspartimide zijreactie tijdens de koppeling van Alloc-L-Ile, die in hoofdstuk vijf nauwelijks optrad. Het lijkt erop dat de vorming van dit product zich vooral manifesteert onder de klassieke condities. In hoeverre deze reactie doorgaat onder geoptimaliseerde condities blijft voorlopig onduidelijk.

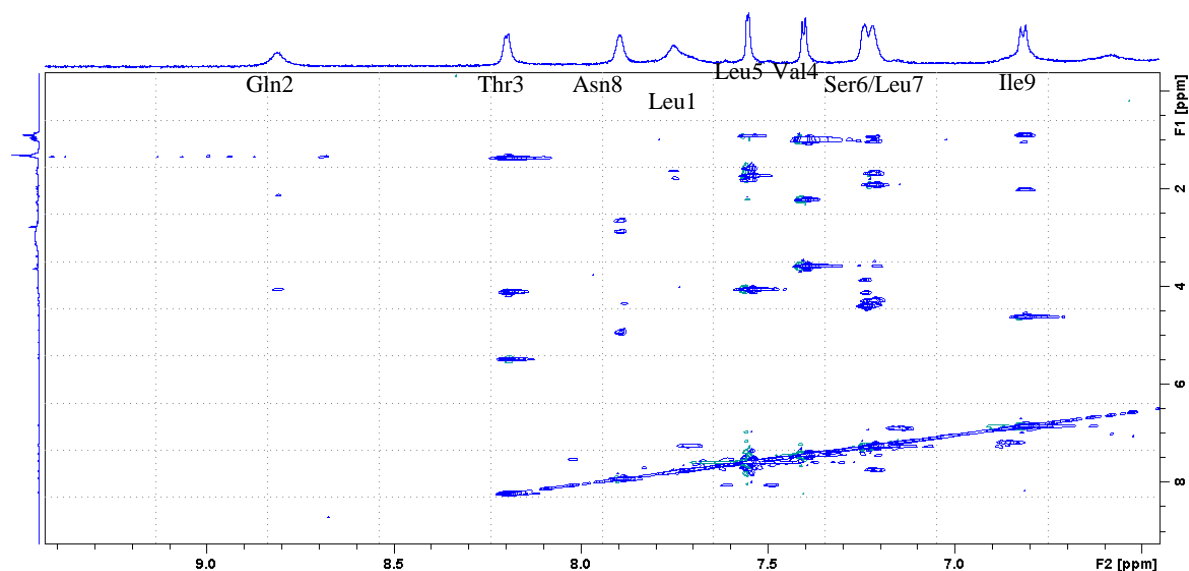
Hoofdstuk 8: Karakterisatie met NMR

Het geïsoleerde product uit de fractie bij $R_t=15.589$ min in figuur 7.22 zal worden onderworpen aan verder onderzoek met NMR om de identiteit van de moleculaire structuur te bevestigen. Door analyse van elk tussenproduct heeft men immers al een sterk vermoeden dat dit het product is met de ongewijzigde stereochemie. Ook dit kan men aantonen met NMR omdat men reeds over het spectrum beschikt van pseudodesmine A. Een verandering aan één van de stereocenters van de hoofdketen zal de chemische omgeving van de α -protonen sterk wijzigen en mogelijk zelfs de hele conformatie, waardoor men in het geval van een diastereomeer een sterk verschillend spectrum verwacht.

Daarnaast zal ook worden nagegaan of dit analoog zelfassocieert in apolaire omgeving. Hiervoor worden een aantal DOSY-experimenten uitgevoerd, waaruit men de diffusiecoëfficiënt D kan halen. De diffusiecoëfficiënt is omgekeerd evenredig met de hydrodynamische straal van de molecule, die een maat is voor zijn grootte. Als er zelfassociatie optreedt, zal de hydrodynamische straal toenemen en bijgevolg de diffusiecoëfficiënt drastisch dalen bij een hoge concentratie.

8.1 Structuuranalyse

Ongeveer 1.0 mg van het peptide werd opgelost in 10 μ l CD_3CN en overgebracht in een 1 mm NMR buis. De 1 mm NMR probe laat toe een hogere massagevoeligheid (ca. een factor 4) te bekomen t.o.v. de standaard 5 mm set-up en is dus geschikt voor de analyse van deze beperkte hoeveelheden product. Met behulp van 1D 1H , COSY, TOCSY en 1H - ^{13}C HSQC spectra werd de molecule volledig toegekend. Elk aminozuur vormt een afzonderlijk spinsysteem. Hierdoor is het mogelijk om in het 2D TOCSY een correlatiepatroon te herkennen vertrekkende vanuit elke amide resonantie naar de alifatische protonen. (figuur 8.1)



Figuur 8.2 2D TOCSY spectrum van VII.5a in CD_3CN , opgenomen bij 700MHz, 60 °C, focus op H^N -gebied

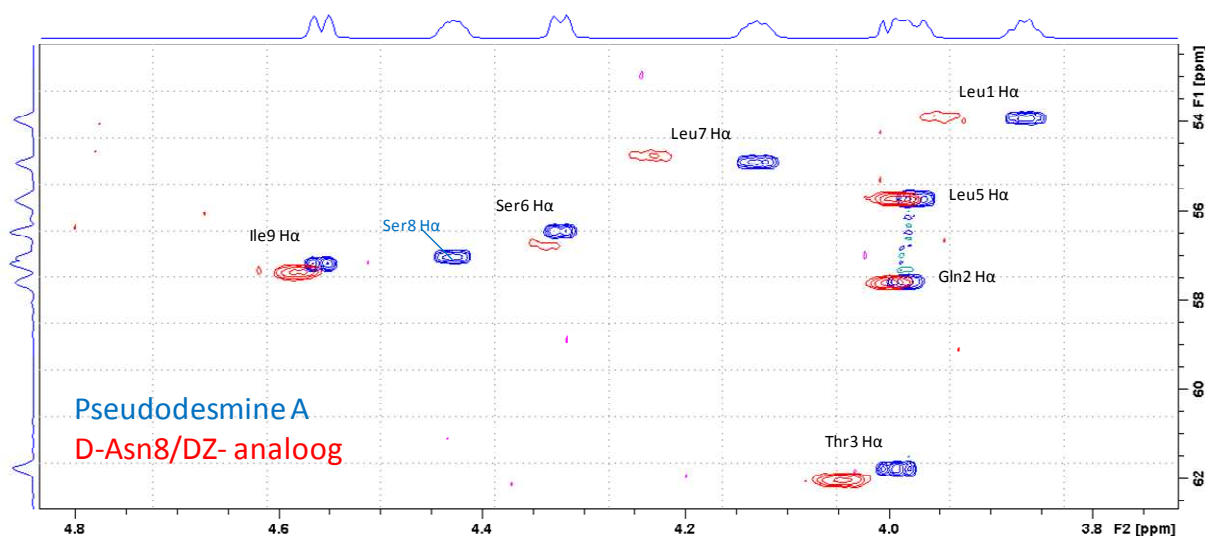
De volgorde van de spinsystemen in de sequentie kan men toekennen met behulp van een NOESY spectrum. De nOe kruispijken waren echter te zwak om dit effectief te doen vermoedelijk omdat de kruisrelaxatiesnelheidsconstanten bij deze omstandigheden klein zijn. Echter, gezien de volgorde van synthese en de tussentijdse analyseresultaten kennen we met zekerheid de volgorde van de spinsystemen. De volledige toekenning gebeurde bij 60 °C, omdat een aantal signalen bij

kamertemperatuur verbreed waren en zo soms niet uitkwamen boven het ruisniveau in de 2D spectra. Door de temperatuur te verhogen, scherpen de meeste signalen terug op en zijn de verliezen door transversale relaxatie tijdens het 2D experiment dan ook verminderd. (zie deel 8.2). De volledige toekenning van **VII.5a** vindt men terug in tabel 8.1.

DZ		¹ H δ [ppm]	¹³ C δ [ppm]		¹ H δ [ppm]	¹³ C δ [ppm]		¹ H δ [ppm]	¹³ C δ [ppm]
	DZ								
				Val4			Asn8		
	CH ₂ α	2,33	37,02	NH	7,40		NH	7,89	
	CHβ	1,67	26,33	CH α	3,57	65,01	CH α	4,90	52,15
	CH ₂ γ	1,33	30,20	CO			CO		
	CH ₂ δ	1,33	30,20	CH β	2,19	30,27	CH ₂ β1	2,64	44,40
	CH ₂ ε	1,33	30,20	CH ₃ γ	0,96	19,66	CH ₂ β2	2,86	44,40
	CH ₂ ζ	1,33	30,20	CH ₃ γ	0,99	21,11	Coy		
	CH ₂ η	1,27	32,79				NH ₂	7,22/7,70	
	CH ₂ θ	1,32	23,49	Leu5					
	CH ₃ ι	0,90	14,42	NH	7,55				
				CH α	4,05	55,91	Ile9		
	Leu1			CO			NH	6,82	
	NH	7,74		CH ₂ β1	1,57	41,00	CH α	4,58	57,59
	CH α	3,97	54,28	CH ₂ β2	1,70	41,00	CO		
	CO			CH γ	1,70	25,79	CH β	1,99	37,53
	CH ₂ β1	1,63	40,36	CH ₃ δ	0,89	21,29	CH ₃ γ	0,87	16,39
	CH ₂ β2	1,77	10,36	CH ₃ δ	0,90	23,46	CH ₂ γ1	1,04	25,64
	CH γ	1,70	25,81	Ser6			CH ₂ γ2	1,25	25,64
	CH ₃ δ	0,93	22,54	NH	7,24		CH ₃ δ	0,89	12,36
	CH ₃ δ	0,97	23,29	CH α	4,38	56,99			
				CO					
	Gln2			CH ₂ β1	3,83	64,1			
	NH	8,81		CH ₂ β2	4,09	64,1			
	CH α	4,05	57,78	OHγ					
	CO								
	CH ₂ β	2,12	26,85	Leu7					
	CH ₂ γ	2,44	32,54	NH	7,22				
	COδ			CH α	4,26	54,99			
	NH ₂	6,85/7,16		CO					
	allo-Thr3			CH ₂ β1	1,67	42,14			
	NH	8,20		CH ₂ β2	1,88	42,14			
	CH α	4,09	62,34	CH γ	4,26	25,8			
	CO			CH ₃ δ	0,92	21,64			
	CH β	5,45	70,77	CH ₃ δ	1,01	23,51			
	CH ₃ γ	1,35	18,66						

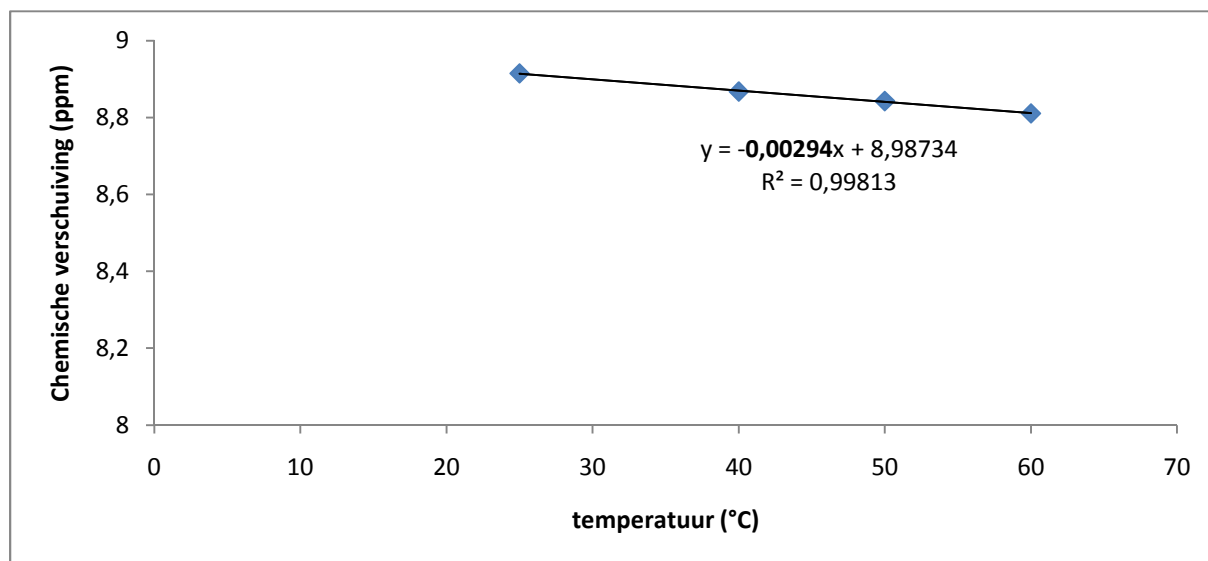
Tabel 8.1 ¹H en ¹³C toekenning van VII.5a (CD₃CN, 60 °C, 700 MHz)

De chemische verschuivingen komen zeer goed overeen met de eerder gepubliceerde verschuivingen van pseudodesmine A. [3] Het grootste verschil tussen beiden is dat ten opzichte van pseudodesmine A de signalen van het Ser8 residu zijn verdwenen en in de plaats daarvan de Asn8 resonanties terug te vinden zijn. Ook het patroon van signalen van de lipofiele staart is gewijzigd door het ontbreken van het β-alcohol. Wanneer men echter HSQC spectra van pseudodesmine en het gesynthetiseerde analoog over elkaar legt, dan valt vooral de sterke gelijkennis op. (figuur 8.3)



Figuur 8.3 2D ^1H - ^{13}C HSQC overlap tussen pseudodesmine en analog in CD_3CN bij 25°C , 700MHz, focus op H^a

Eveneens werden de temperatuurscoëfficiënten van de amideprotonen opgemeten door hun chemische verschuiving te volgen in 1D ^1H spectra opgemeten bij 25°C , 40°C , 50°C en 60°C . Deze worden uitgedrukt in ppb/K (1000 ppb = 1 ppm). De temperatuurscoëfficiënt wordt gedefinieerd als het tempo waarmee de chemische verschuiving verandert in functie van de temperatuur. Er wordt aangenomen dat de chemische verschuiving lineair afhankelijk is van de temperatuur. De berekening van de temperatuurscoëfficiënt wordt gedemonstreerd voor het amideproton van Gln2. (figuur 8.4)



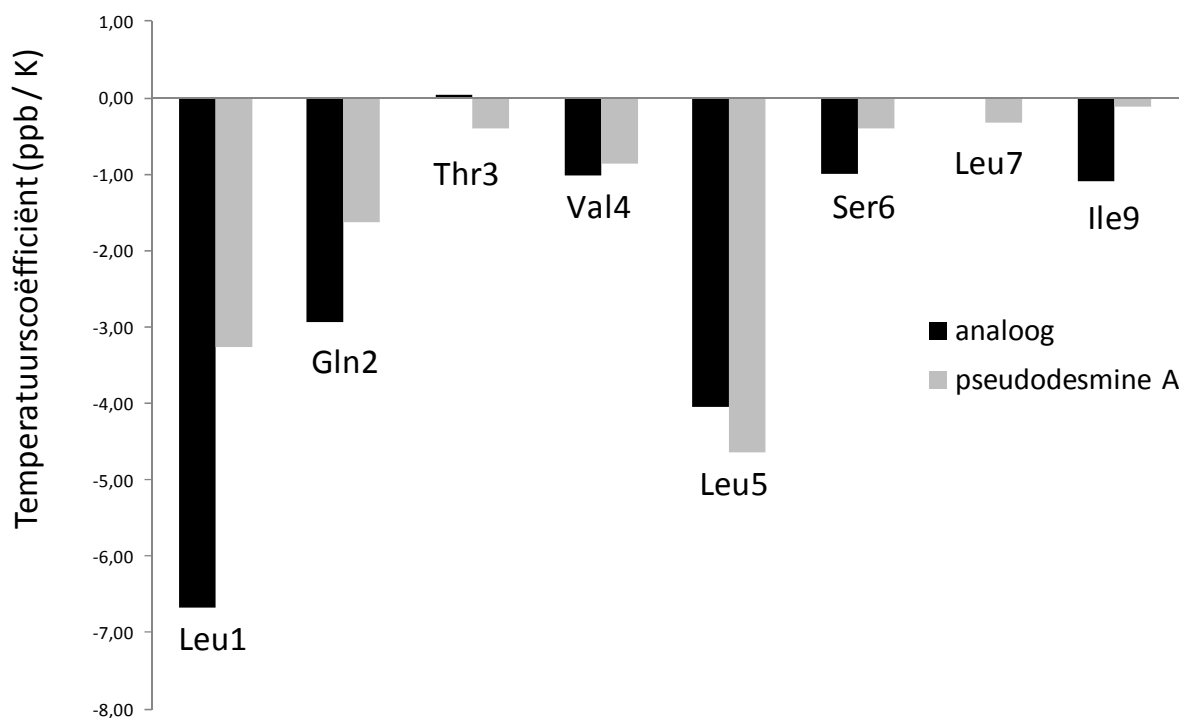
Figuur 8.4 Chemische verschuiving van het Gln2 H^{N} -proton in functie van de temperatuur. De rechte en vergelijking geven de lineaire regressie van de data weer (CD_3CN , 700 MHz)

De berekende temperatuurscoëfficiënten van de hoofdketen amideprotonen van **VII.5a** worden weergegeven in tabel 8.2. Op basis van de lineaire correlatiecoëfficiënt (R^2) kan worden vastgesteld dat alle protonen, op twee na, lineair afnemen met de temperatuur. De twee uitzonderingen zijn afkomstig van Thr3 en Leu7, die een nagenoeg constante verschuiving hebben. Omdat de variatie van de meetfout groter is dan de variatie afkomstig van de regressie is de waarde van de R^2 ook beduidend lager.

amideproton	temperatuurscoëfficiënt (ppb/K)	R ² van de lineaire regressie
Leu1	-6,67	0,99
Gln2	-2,94	1,00
Thr3	0,04	0,39
Val4	-1,02	0,94
Leu5	-4,05	0,99
Ser6	-1,01	0,98
Leu7	0,00	0,11
Asn8	-1,57	0,99
Ile9	-1,10	1,00

Tabel 8.2 Temperatuurscoëfficiënten van de amideprotonen van VII.5a (CD₃CN, 700 MHz)

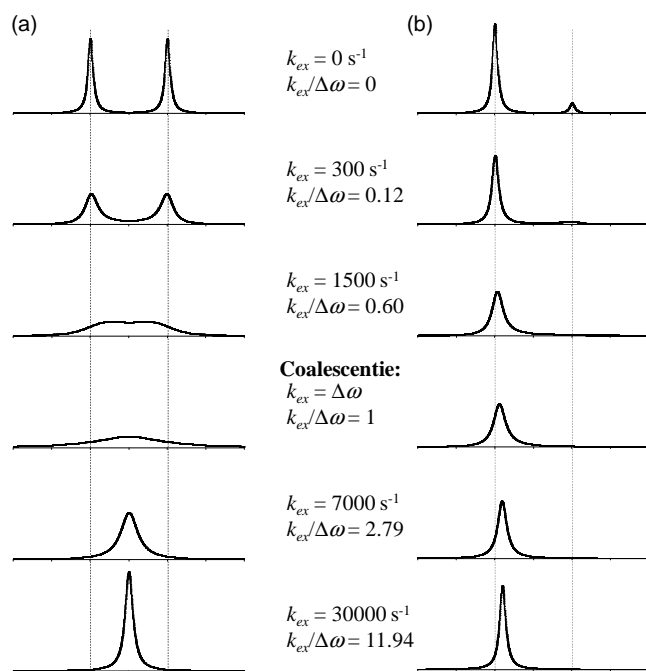
De vergelijking van de temperatuurscoëfficiënten met deze van pseudodesmine A[4] wordt gemaakt in figuur 8.5. Men stelt vast dat deze vrij gelijkaardig zijn. De temperatuurscoëfficiënten van het analoog zijn meestal iets groter dan deze van pseudodesmine, maar zijn steeds van dezelfde grootteorde. Aangezien de temperatuurscoëfficiënt een conformatiegevoelige parameter is, kan men net als uit de chemische verschuivingen besluiten dat beide moleculaire conformaties erg gelijkaardig zijn.



Figuur 8.5 Vergelijking van de temperatuurscoëfficiënten tussen VII.5a en pseudodesmine A. Beiden opgemeten in CD₃CN en bij 700 MHz.

8.2 Temperatuurstudie in CD₃CN

Zoals eerder vermeld, stelde men bij kamertemperatuur vast dat sommige signalen verbreed zijn. Het is echter niet zo dat alle signalen evenveel verbreed zijn zoals dit het geval is bij pseudodesmine A in apolaire solventen. De lijnverbreding is dus niet te wijten aan een vorm van zelfassociatie, wat ook bevestigd wordt door diffusiemetingen. (deel 8.3)



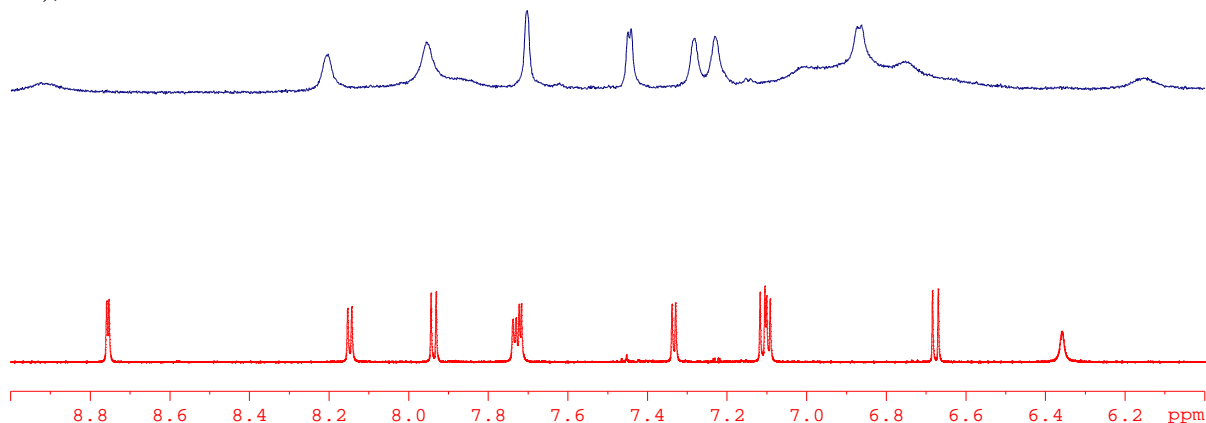
**Figuur 8.6 Conformationele uitwisseling tussen twee toestanden bij verschillende waarden voor k_{ex} . (a) $\alpha_A=0.5$ (b) $\alpha_A=0.9$.
Figuur overgenomen uit [4]**

door een snelle uitwisseling tussen twee of meer verschillende conformeren van **VII.5a**. (figuur 8.6)

Om uitwisseling tussen twee toestanden te beschrijven zijn er drie parameters van belang: de uitwisselingsnelheidsconstante k_{ex} , het frequentieverschil $\Delta\omega$ tussen de twee verschillende conformeren en tot slot de populatiebezetting α . In figuur 8.6a worden de resonanties getoond van een proton dat zich voor 50% in conformatie A bevindt en voor 50% in conformatie B. In figuur 8.6b is het conformeer B voor 90% bezet. Wanneer $\Delta\omega \gg k_{ex}$, spreekt men van trage uitwisseling en zal men twee scherpe en afzonderlijke signalen waarnemen. Als de k_{ex} toeneemt zal niet alleen de lijnbreedte toenemen maar ook het frequentieverschil tussen beide signalen zal schijnbaar dalen. Wanneer $\Delta\omega \approx k_{ex}$ dan heeft men het coalescentiepunt bereikt en zal de lijnbreedte zijn maximale waarde

aannemen. De afzonderlijke resonanties zijn niet langer meer te onderscheiden. Indien k_{ex} nog verder toeneemt dan komt men terecht in snelle uitwisselingscondities en dan zal de lijnbreedte terug afnemen en zich verder verplaatsen naar een frequentiegemiddelde $\Delta\omega_{gem} = \alpha_A\Delta\omega_A + \alpha_B\Delta\omega_B$.

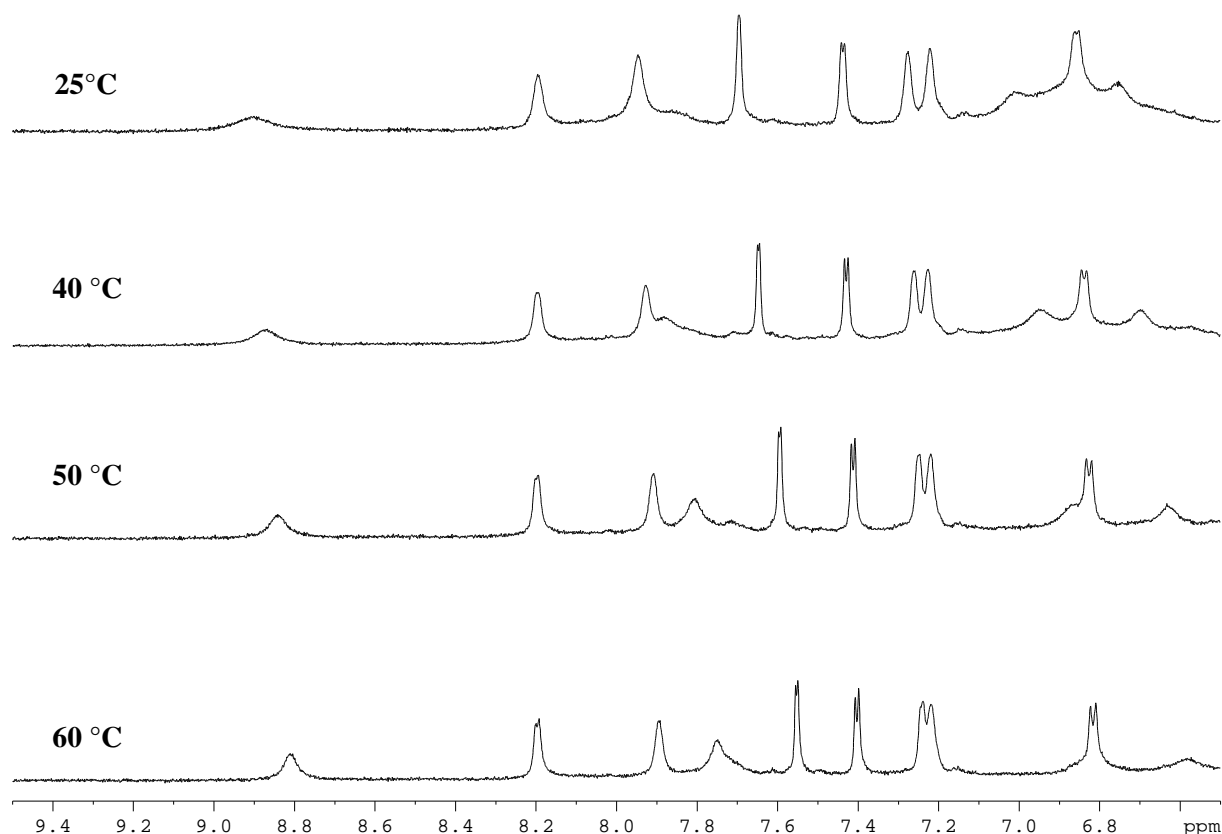
Op basis van de lijnverbreding kan men schatten dat het analoog zich in snelle uitwisseling bevindt, waarvan sommige resonanties zich voorbij het coalescentiepunt bevinden. Bij pseudodesmine A in CD₃CN treedt er voor geen enkel van de resonanties (op alcohol signalen na) lijnverbreding op. (figuur 8.7), wat betekent dat dit als één stabiele vorm voorkomt.



Figuur 8.7 1D-¹H spectra van VII.5a (boven) en pseudodesmine A (onder) bij 700 MHz, 25 °C, H^N-gebied

Door de modificaties in het analog is hoogstwaarschijnlijk een stabiliserende factor verdwenen of een destabiliserende factor geïntroduceerd. Eveneens werd vastgesteld dat het vooral de resonanties van de hydrofiele residuen zijn die deze lijnverbreding ondervinden. De Asn8 signalen – dit is het residu dat Ser8 vervangt – waren bij kamertemperatuur zelfs niet terug te vinden in de 2D spectra. Aangezien de lijnverbreding vooral optreedt bij hydrofiele residuen kan men stellen dat conformationele instabiliteit vooral een impact heeft ter hoogte van deze residuen. Eén of beide modificaties blijken dus kritisch te zijn voor de stabiliteit van de molecule.

Aangezien we in snelle uitwisseling zitten, zullen de pieken terug opscherpen door de temperatuur te verhogen omdat hierdoor ook de uitwisselingssnelheid wordt vergroot. Bij 60°C stelt men inderdaad een verscherping van de signalen vast in het 1D-¹H spectrum (figuur 8.8), maar ook in COSY, TOCSY en HSQC spectra komen nu (bijna) alle signalen uit boven de ruis.



Figuur 8.8 1D-¹H spectra van VII.5a in CD₃CN bij verschillende temperaturen bij 700 MHz, focus op H^N-protonen

8.3 Gedrag in apolaire omgeving

Om na te gaan of er ook zelfassociatie optreedt voor **VII.5a** wordt eerst een geschikt apolair solvent gezocht om dit product in op te lossen. Een voor de hand liggende keuze is chloroform, aangezien dit ook werd gebruikt bij pseudodesmine A om dergelijk gedrag aan te tonen. Een opmerkelijke vaststelling is dat **VII.5a** niet oplost in CDCl₃. Om toch dit gedrag te kunnen onderzoeken wordt gekozen voor dioxaan als solvent, waarin ook voor pseudodesmine A zelfassociatie werd vastgesteld. [2] In dit solvent bleek **VII.5a** zeer goed op te lossen.

Diffusie-NMR is een techniek die toelaat om de transversale diffusiecoëfficiënt *D* van moleculen in oplossing te bepalen. Wanneer zelfassociatie optreedt, krijg je een concentratie gewogen gemiddelde

diffusiecoëfficiënt over alle verschillende oligomeren aanwezig in oplossing. [5] Met behulp van DOSY-metingen kan de diffusiecoëfficiënt D afgeleid worden. Voor sferische deeltjes bestaat bovendien het volgende verband (Stokes-Einstein).

$$D = \frac{k_b T}{6\pi\eta r_H}$$

Waarbij k_B de Boltzmannconstante ($1,381 \cdot 10^{-23}$ J/K), T de temperatuur (in K), η de viscositeit van de oplossing (in Pa·s) en r_H de hydrodynamische radius (in m) van de sferische molecule voorstellen.

Hoewel pseudodesmine A en zijn synthetische analoog niet meteen als sferische deeltjes kunnen worden beschouwd, is de hydrodynamische radius r_H een goede maat voor de afmetingen van de molecule.

Aangezien bij zelfassociatie de diffusiecoëfficiënt ook afhankelijk is van de concentratie, is het de gewoonte om diffusiemetingen uit te voeren bij verschillende concentraties. Omdat er slechts een beperkte hoeveelheid materiaal is, zal de diffusiecoëfficiënt echter bij één concentratie gemeten worden in een polair en apolair solvent.

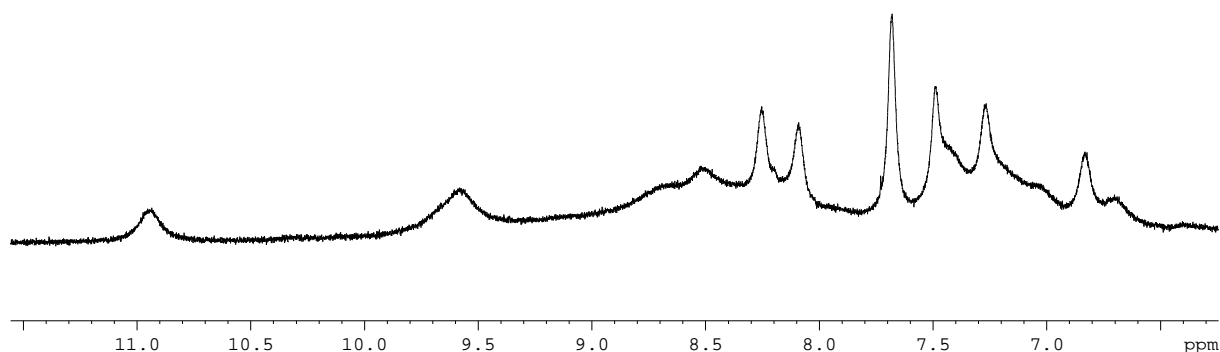
Eerst wordt de diffusiecoëfficiënt opgemeten in het polaire CD_3CN om deze te vergelijken met pseudodesmine A, dat zich in dit solvent in de monomere vorm bevindt. Ongeveer 1.0 mg **VII.5a** wordt daartoe opgelost in 10 μ l CD_3CN . Ondanks de beperkte hoeveelheid is de concentratie toch vrij groot (rond 80 mM). Hierdoor kan het deeltje niet langer zomaar willekeurig diffunderen en verschilt de waargenomen diffusiecoëfficiënt D_s van deze bij oneindige verdunning D_0 . Dit noemt men het obstructie-effect. In de literatuur wordt een correctie beschreven om de D_0 te berekenen, [69] als volgt:

$$D_0 = \frac{D_s}{(1 - 2\phi)}$$

waarbij ϕ de volumefractie van de deeltjes voorstelt. Dit werd hier bij benadering berekend door aan te nemen dat de afmetingen van één molecule gelijk is aan deze van een pseudodesmine A molecule.

Na verwerken van de DOSY metingen, wordt een $D_s = 676.8 \mu\text{m}^2/\text{s}$ berekend. Na bovenstaande correctie bekomt men $D_0 = 816.0 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Via de Stokes-Einstein vergelijking kan hieruit de hydrodynamische radius worden berekend, waarbij een viscositeit van acetonitrile van 0.000369 Pa·s gebruikt werd.[70] Niettegenstaande dit een ruwe berekening is, bekomt men een $r_H = 7.25 \text{ \AA}$, die identiek is aan de gekende afmetingen van een pseudodesmine A monomeer (7.2 \AA). Hiermee wordt bevestigd dat het gesynthetiseerde analoog in een monomeer vorm voorkomt in een polair solvent.

Om het gedrag in apolaire omgeving te onderzoeken, werd de molecule opgelost in dioxaan. Men stelt vast dat de signalen in het $1D\text{-}^1\text{H}$ spectrum allen een beetje verbreed zijn. Maar aangezien dioxaan een viskeuzer solvent is dan acetonitrile (1.117 mPa·s tegenover 0.369 mPa·s), kan de lijnverbreding ook hieraan te wijten zijn. (figuur 8.9)



Figuur 8.9 1D- ^1H spectrum van synthetisch analoog in dioxaan, opgenomen bij 700 MHz, 25 °C, focus op H^{N} -protonen

Identieke berekeningen en correcties worden gebruikt voor de berekening van D_0 in dioxaan. Men bekomt $D_0 = 175.0 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Dit stemt overeen met een hydrodynamische radius gelijk aan 11.2 Å. Deze waarde is iets groter dan deze in de monomere toestand, maar toch kan men stellen dat er geen of nauwelijks zelfassociatie is opgetreden. Zo is de viscositeit bijvoorbeeld afhankelijk van de concentratie, of zijn er ook nog minieme onzuiverheden aanwezig die ook een rol kunnen spelen. Het is in elk geval duidelijk dat er geen zelfassociatie optreedt zoals bij pseudodesmine A in gelijkaardige oplossingsomstandigheden. In een gelijkaardig experiment met pseudodesmine A bekomt men een r_{H} van 30-50 Å [4] bij een concentratie van ongeveer 10 mM, terwijl in dit geval de concentratie van het synthetische analoog rond 70 mM ligt. Het is daarom duidelijk dat zelfs indien er een zekere mate van zelfassociatie zou optreden, deze zeker en vast veel minder sterk is uitgesproken dan bij pseudodesmine A.

8.4 Conclusie

NMR-analyse bevestigt de moleculaire structuur van pseudodesmine A. Ondanks de twee modificaties (Asn8 in plaats van Ser8 en decaanzuur in plaats van hydroxydecaanzuur) bekomt men een molecule die conformationeel gezien, zeer goed op pseudodesmine A lijkt. Wel zorgen deze modificaties voor een zekere conformationele instabiliteit, in het bijzonder aanwezig ter hoogte van Asn8. De lijnbreedte van bepaalde ^1H resonanties verscherpen bij hogere temperatuur. Dit duidt op conformationele uitwisseling en leert dat het analoog minder rigide is als pseudodesmine A. Eveneens stelt men vast dat zelfassociatie en oplosbaarheid in chloroform sterk worden benadeeld.

Het lijkt erop dat de aanwezigheid van Ser8 belangrijk is voor de stabiliteit van de molecule. Vermoedelijk speelt de afwezigheid van een alcoholgroep in de vetzure staart aan het N-terminale uiteinde van de peptideketen een veel beperktere rol. Het ziet er dus naar uit dat men het Ser8 residu niet zomaar kan vervangen door een ander hydrofiel aminozuur indien men dezelfde structuur-functie verwantschap wil behouden. Bovendien stelt men vast dat ook alle andere gekende leden van de viscosinegroep steeds een Ser8 in hun sequentie bevatten.

Hoofdstuk 9: Experimenteel

Alle reagentia en solventen werden als dusdanig gebruikt zonder verdere zuiveringen. Alle experimenten waarbij vochtgevoelige producten werden gebruikt, werden uitgevoerd onder inerte atmosfeer (Ar, N₂). DIPEA, gebruikt voor koppelingsreacties en de TNBS-kleurtest is extra droog. mQ H₂O werd verkregen via een Sartorius Arium 11 DI vertrekkende van leidingwater.

Alle reacties in oplossing werden gevolgd via dunnelaagchromatografie (TLC) op silicagel (Merck Silicagel, 60F254). Zuivering van de producten gebeurde door kolomchromatografie op silicagel (korrelgrootte 5-200 µm, 30-60g silicagel per gram product).

De reacties op vaste drager werden uitgevoerd in een plastic peptide reactor (1,5 of 5 ml) met een gesinterde filter. De vaste fase reacties werden uitgevoerd met de Selecta Vibromatic shaker.

In de synthese komen heel wat standaard procedures aan bod. De naam van de procedure is onderlijnd, omdat naar deze naam wordt verwezen in het experimentele gedeelte.

De kleurtesten werden als volgt uitgevoerd:

TNBS-test procedure:

Enkele korrels worden overgebracht in een klein reactievat. Hieraan wordt 50µl van een 10% DIPEA oplossing in DMF toegevoegd en 50µl van 1% TNBS-oplossing in DMF. Oranje korrels duiden op de aanwezigheid van vrije aminegroepen, terwijl kleurloze korrels op de afwezigheid van vrije aminegroepen duiden.

NF31-test procedure:

Enkele korrels worden overgebracht in een klein reactievat. Vervolgens wordt 100 µl van een 2mM NF31 oplossing in acetonitril toegevoegd. Het mengsel wordt verwarmd bij 70 °C gedurende 10 minuten. De korrels worden vervolgens gewassen met DMF, MeOH en DCM. Rode korrels wijzen op de aanwezigheid van vrije aminegroepen, terwijl kleurloze korrels de afwezigheid van vrije aminefuncties aantonen.

NF31/DMAP-test procedure:

Enkele korrels worden overgebracht in een klein reactievat waaraan 50µl van een 0.2 M DMAP oplossing en 50 µl van een 2mM NF31 oplossing (beiden in acetonitril) worden toegevoegd. Het mengsel kan 10 minuten reageren bij kamertemperatuur, waarna het gewassen wordt met DMF en MeOH. Rode korrels wijzen op de aanwezigheid van vrij alcoholgroepen. Kleurloze korrels duiden op de afwezigheid hiervan.

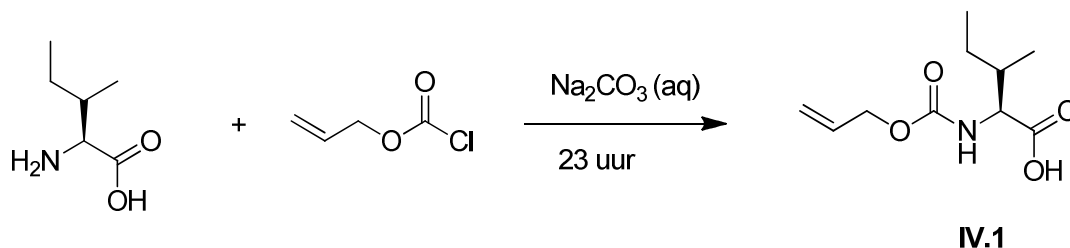
Fmoc-ontscherming

Het hars wordt behandeld met een oplossing van 20% piperidine/NMP (10 ml/g hars), waarna de reactor gedurende 20 minuten wordt geschud bij kamertemperatuur. De oplossing wordt afgefiltreerd, waarna het hars opnieuw met 20% piperidine/NMP wordt behandeld. Vervolgens wordt het hars gewassen met NMP (3 *30 s, 10 ml/g hars), MeOH (3 *30 s, 10 ml/g hars) en DCM (3 *30 s, 10 ml/g hars).

Proefafsplitsing

Om product af te splitsen van het hars wordt 1 mg resin in een nieuwe reactor gebracht. Hier wordt 200 μl van een oplossing aan toegevoegd die bestaat uit: TFA (95%, 190 μl), triisopropylsilaan (2.5%, 5 μl) en gedemineraliseerd water (2.5 %, 5 μl). De reactor wordt een uur geschud bij kamertemperatuur. Daarna wordt het hars gewassen met TFA (~1ml) en het opgevangen filtraat wordt droog geblazen met argon via een pasteurpipet. Het residu wordt gewogen en MeOH wordt toegevoegd om een concentratie van 1 mg product per ml MeOH te bekomen. LC-MS wordt opgenomen.

9.1 Alloc- bescherming van L-Ile: eerste poging



Figuur 9. 1 Alloc- bescherming van L-Ile

0.250 g L-Ile(1,9mmol;1.1 eq) en 1.479 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (5.2 mmol; 3 eq.) worden in 6.9 ml H_2O opgelost onder argonatmosfeer. Deze oplossing wordt geroerd en gekoeld bij 0°C , waarna traag 180 μl allylchloroformaat wordt toegevoegd. (1 eq; 1.7 mmol). De oplossing wordt 1 uur geroerd bij 0°C waarna de oplossing geleidelijk aan kon opwarmen tot kamertemperatuur. De reactie wordt gevolgd op TLC met als eluens DCM/MeOH met een 85/15 verhouding. Na 23 uur wordt de reactie stopgezet en wordt de waterige oplossing 2 maal gewassen met 10 ml DCM. Nadien wordt de waterige fase aangezuurd tot $\text{pH}=1$ door geconcentreerd HCl toe te voegen. De bekomen suspensie wordt geëxtraheerd met EtOAc (3*20ml). De verzamelde extracten worden gedroogd op Na_2SO_4 . Na een half uur wordt dit afgefilterd en het filtraat wordt ingedampt. Een massaspectrum werd opgenomen met ESI-MS.

Analysedata:

TLC: 2-3 spots: $R_f=0$ beginproduct;

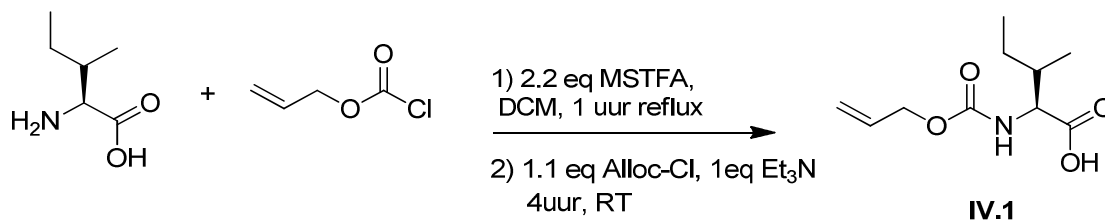
$R_f=0.12$ en 0.20 gevormde producten

Moleculair gewicht=215.25 g/mol

ESI-MS: (m/z,fragment, intensiteit): 215.6 [**IV.1**+H]⁺,5

469.0 [tetrapeptide+H]⁺,100

9.2 Alloc-bescherming van L-Ile met tijdelijke bescherming carbonzuur: tweede poging



Figuur 9. 2 Alloc bescherming van L-Ile

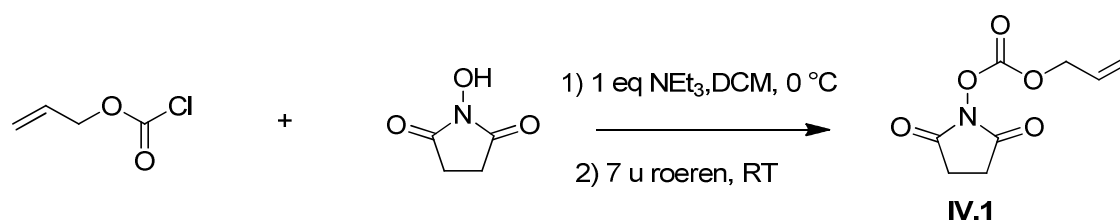
0.1467 g L-Ile (1eq; 1.114 mmol) wordt opgelost in 5 ml droge DCM en gekoeld bij 0°C onder argonatmosfeer. Men stelt vast dat de L-Ile niet oplost. 0.454 ml MSTFA (2.2 eq; 2,461 mmol) wordt toegevoegd. Het reactiemengsel wordt 2 uur gerefluxt bij 50°C. Omdat Ile niet oplost wordt gradueel 3 ml DMF en 1 ml THF toegevoegd met weinig zichtbaar resultaat. Wanneer de oplossing is afgekoeld tot kamertemperatuur wordt er 130 µl Alloc-Cl (1.1 eq; 1.225 mmol) en 155 µl Et₃N (1eq en 1,114 mmol) toegevoegd waarna reactiemengsel vier uur geroerd wordt bij kamertemperatuur. De reactie wordt ondertussen gevolgd op TLC met als eluens DCM/MeOH in 97/3 verhouding. Om de reactie te stoppen wordt 4 ml MeOH toegevoegd waarna nog een uur geroerd wordt. Hierna wordt het solvent ingedampt. Het bekomen product wordt opgelost in 10 ml EtOAc en driemaal geëxtraheerd met 10 ml 1M KHSO₄(aq). De organische fasen worden gedroogd op MgSO₄. Na een half uur wordt dit afgefiltreerd en het filtraat wordt geconcentreerd. Het bekomen product wordt gezuiverd via een kolomchromatografische scheiding op silica met als eluens DCM/MeOH in een 98/2 verhouding. Er worden 3 fracties gescheiden waarvan een massaspectrum met ESI-MS werd opgenomen. Deze 3 fracties waren echter zeer miniem en bevatten geen van allen het product.

Analysedata:

Moleculair gewicht=215.25 g/mol

ESI-MS: (m/z): elke fractie bevatte m/z= 170

9.3 Vorming Alloc-OSu



Figuur 9.3 Vorming Alloc-OSu

Onder argonatmosfeer wordt 2.15 ml Alloc-Cl (1eq; 0.020 mol) en 2.30 g N-hydroxysuccinimide (1eq; 0.020 mol) in 20 ml DCM gebracht en vervolgens gekoeld tot 0°C. Vervolgens wordt 2.90 ml NEt₃ (1eq; 0.020 mol) druppelsgewijs toegevoegd. Na 7 uur wordt het reactiemengsel ingedampt. Wat overblijft is een mengsel van het ruwe Alloc-OSu en het Et₃N.HCl zout. Dit mengsel wordt opgelost in 30 ml DCM en in een scheidrecter overgebracht. De organische fase wordt 3 keer gewassen met 30 ml verzadigde NaHCO₃-oplossing, waarna ze gedroogd wordt op Na₂SO₄. Het droogmiddel wordt na een halfuur afgefiltreerd en het filtraat wordt ingedampt en gedroogd aan de oliepomp waarna men 2.6955 g van een gele olie bekomt. Het rendement bedraagt 67.67 %

Analysedata:

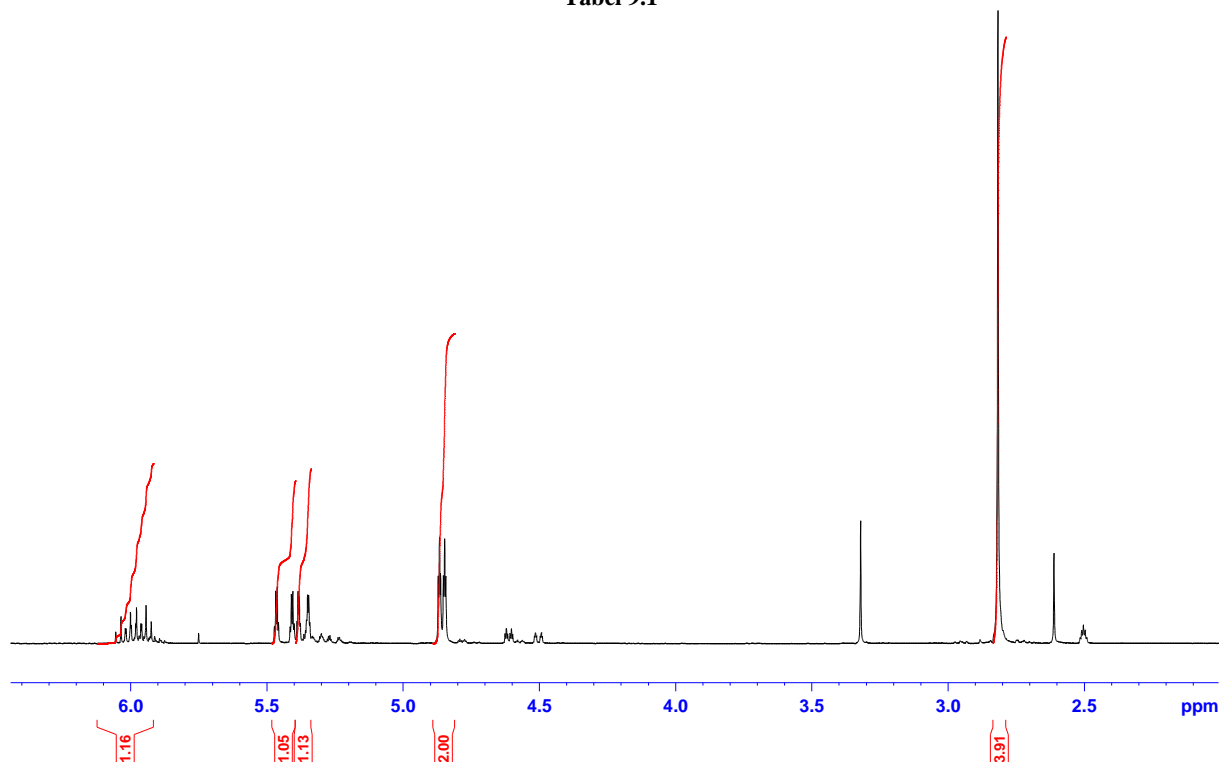
Moleculair gewicht=199.161 g/mol

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300 MHz)

Structuur	Positie	δ (ppm)	Integratie	Multipliciteit	J (Hz)
	1	2.82	4H	s	/
	2	4.86	2H	ddd	5.75; 1.33; 1.33
	3	5.99	1H	ddt	17.2;10.4;5.75
	4	5.44	1H	dd(t)*	17.2;1.5;1.33
	5	5.36	1H	dd(t)*	10.4;1.5;1.33

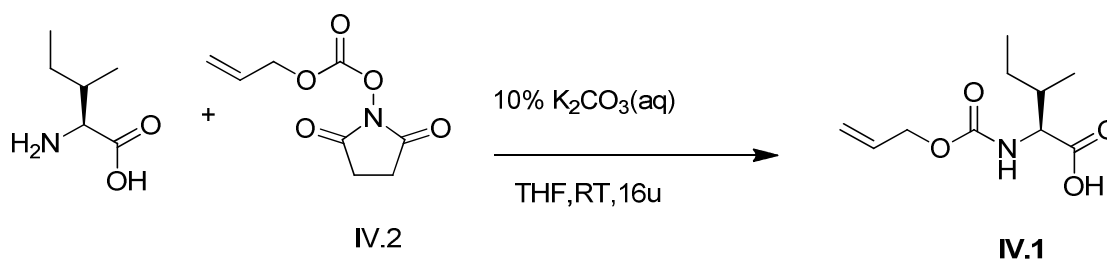
* triplet fijnstructuur is niet meer te herkennen

Tabel 9.1



Figuur 9.3a 1D-¹H spectrum van Alloc-OSu in DMSO-d₆ voor opzuivering. Bevat nog sporen van beginproducten. solventresiduele (2.5 ppm) en waterpiek (3.3 ppm) zijn zichtbaar.

9.4 Alloc-bescherming van L-Ile via Alloc-OSu



Figuur 9. 4 Alloc-bescherming van L-Ile via Alloc-OSu

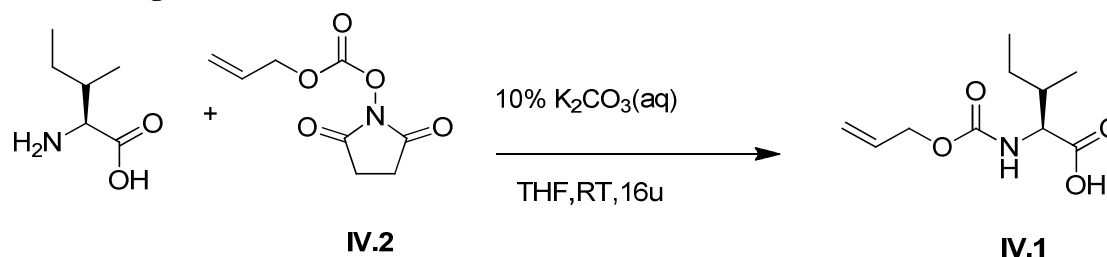
Onder argonatmosfeer wordt 0.2 g L-Ile (1eq; 1.515 mmol) toegevoegd aan een oplossing van 0.4626 g Alloc-OSu (1.5 eq; 2.353mmol) in 1.366 ml THF. 0.9 ml van een 10% waterige K₂CO₃-oplossing

wordt toegevoegd, waarna deze suspensie 17 uur geroerd wordt. Dan wordt het reactiemengsel ingedampt tot een halve ml. Aan deze oplossing wordt 1 ml 10% $K_2CO_3(aq)$ en 2 ml H_2O toegevoegd en dit wordt 4 maal met anderhalve ml diethylether gewassen. De waterige fase wordt aangezuurd tot $pH=1$ en geëxtraheerd met 4 * 2ml DCM. De verzamelde DCM-fasen worden gedroogd op $MgSO_4$ en ingedampt tot ruw product. Hiervan werd een massaspectrum opgenomen met ESI-MS. Het ruwe product wordt gezuiverd op een silicakolom met als eluens zuiver DCM, waarbij geleidelijk wordt overgegaan naar DCM/MeOH met 95/5 en 90/10 verhouding. Het product werd bekomen met een rendement van 25.0%

Analysedata:

Moleculair gewicht=215.25 g/mol

9.5 Vorming Alloc-L-Ile via Alloc-OSu



Figuur 9. 5 Vorming Alloc-Ile via Alloc-OSu

IV.2 afkomstig van poging 9.3 en 9.5 worden samengebracht als beginproduct. Onder argonatmosfeer wordt 1.6808 g L-Ile (0.9 eq; 12.8 mmol) toegevoegd aan een oplossing van 4.332 g Alloc-OSu (1.5 eq; 21.75 mmol) in 15 ml THF. 8.5 ml van een 10% waterige K_2CO_3 -oplossing wordt toegevoegd, waarna deze suspensie 17 uur geroerd wordt. Dan wordt het reactiemengsel ingedampt tot een halve ml. Aan deze oplossing wordt 8.5 ml 10% $K_2CO_3(aq)$ en 17 ml H_2O toegevoegd en dit wordt 4 maal met 15 ml diethylether gewassen. De waterige fase wordt aangezuurd tot $pH=1$ en geëxtraheerd met 4 * 20 ml DCM. De verzamelde DCM-fasen worden gedroogd op $MgSO_4$ en ingedampt tot ruw product. Opzuivering gebeurt door kolomchromatografie op silicagel met als eluens DCM/MeOH in een 995/5 verhouding. Van de fracties die product bevatten werden een TLC en het 1H -NMR-spectrum opgenomen. Alloc-L-Ile wordt bekomen als een viskeuze kleurloze olie met een rendement van 77.48%.

Analysedata:

Moleculair gewicht=215.25 g/mol

ESI-MS: (m/z,fragment, intensiteit): 215.6, $[IV.1+H]^+$, 100

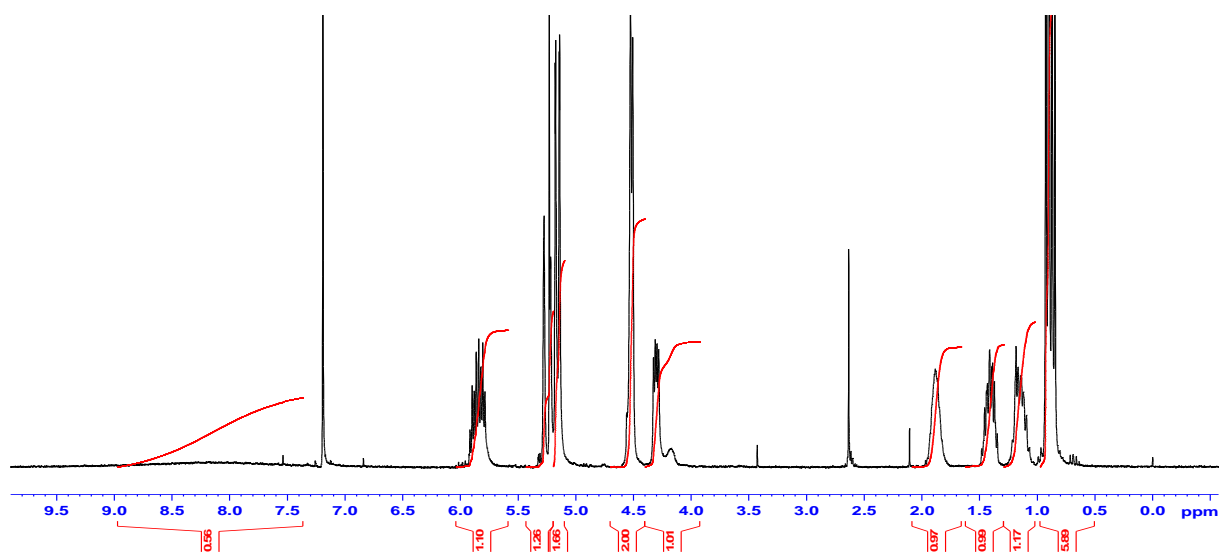
TLC: $R_f=0.109$ (DCM/MeOH in 995/5, 2 druppels azijnzuur)

1H -NMR (($CDCl_3$, 300 MHz)

Structuur	Positie	δ (ppm)	Integratie	Multipliciteit	J (Hz)
	1	0.87	3H	t	7.44
	2	1.16	1H	pd	7.44;*
		1.42	1H	pd	7.44;*
	3	0.92	3H	d	6.87
	4	1.88	1H	sept	4.5
	5	4.30	1H	dd	8.9;4.5
	6	4.52	2H	d	5.70
	7	5.85	1H	ddt	17;10.8;5.70
	8	5.15	1H	dd	10.8; 1.25
	9	5.25	1H	dd	17;1.25
	10	5.15	1H	d	*
11	8.16	1H	s	/	

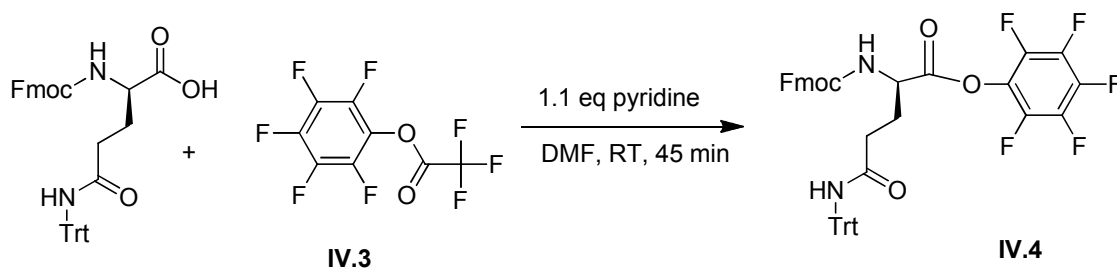
* Fijnstructuur valt niet te herkennen

Tabel 9.2



Figuur 9.6a 1D-¹H spectrum van Alloc-Ile in CDCl₃.

9.6 Activatie van Fmoc-D-Gln (NTrt)-OH



Figuur 9. 6 Activatie Fmoc-D-Gln(NTrt)-OH

Voor deze reactie wordt IV.3 commercieel aangekocht. Bij kamertemperatuur en onder argonatmosfeer wordt 303.7 mg Fmoc-D-Gln(NTrt)-OH (1eq; 0.50mmol) opgelost in 1 ml DMF. Aan deze oplossing wordt 44 µl pyridine (1.1 eq; 0.55mmol) en 80 µl pentafluorofenyltrifluoroacetaat (1.16 eq;0.58mmol) toegevoegd. Na 45 minuten roeren wordt het reactiemengsel verdund met 100 ml EtOAc en overgebracht in een scheitrechter. De organische fase wordt drie keer gewassen met 100 ml 0.1 M HCl_(aq) en vervolgens drie keer met een 100 ml 5% NaHCO_{3(aq)}-oplossing. Hierna wordt de organische fase gedroogd op MgSO₄ en daarna ingedampd tot een witte vaste stof. Fmoc-D-Gln(NTrt)-OPfp werd bekomen met een rendement van 88.6 %. Het product werd onderzocht met LC-MS, ESI-MS en een ¹⁹F-NMR spectrum werd opgenomen.

Analysedata:

Moleculair gewicht=776.75 g/mol

LC-MS (0-100% in 15 minuten op C18-kolom):

Retentietijd	massa	interpretatie
10.337	243	Trityl-groep
14.611	243	Trityl-groep

Tabel 9.3

De trityl-groep is een groep die zeer goed ioniseert. Daarnaast is het geactiveerde glutamine ook erg gevoelig voor nucleofiele aanval. Waarschijnlijk gaat het product kapot op de kolom. LC-MS is aldus geen goede analysetechniek. Het gebruik van ¹⁹F-NMR liet echter wel toe de identiteit van het bekomen product toe te wijzen.

ESI-MS in MeOH: (m/z,fragment, intensiteit): 243, [Trt]⁺, 100
647.3, [methylester van IV.4+Na]⁺, 39
799.2, [IV.4+Na]⁺, 17

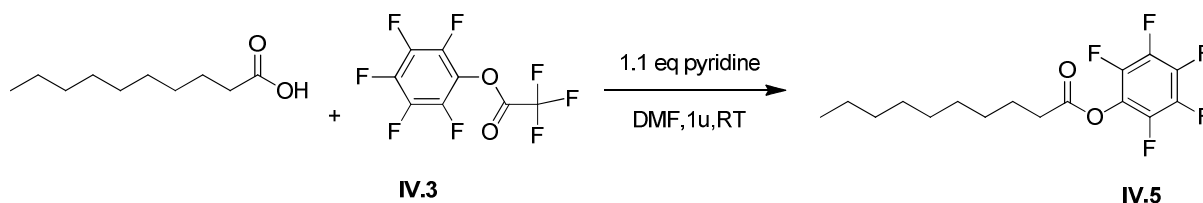
ESI-MS in CH₃CN: (m/z,fragment, intensiteit): 243, [Trt]⁺, 100
799.6, [IV.4+Na]⁺, 6
633.6, [IV.4-Pfp+Na]⁺, 5

¹⁹F-NMR (CDCl₃, 282.4MHz)

Structuur	Positie	δ (ppm)	Integratie	Multipliciteit	J (Hz)
	1(ortho)	-152.16	2F	d	17.8
	2(meta)	-161.77	2F	dd	22.1;17.8
	3(para)	-157.14	1F	t	22.1

Tabel 9.4

9.7 Activatie van decaanzuur



Figuur 9. 7 Activatie decaanzuur

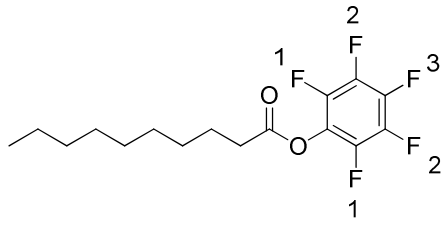
Voor deze reactie wordt IV.3 commercieel aangekocht. Bij kamertemperatuur en onder argonatmosfeer wordt 303.6 mg decaanzuur (1eq; 1.74 mmol) opgelost in 1 ml DMF. Aan deze oplossing wordt 155 µl pyridine (1.1 eq; 1.9 mmol) en 280 µl pentafluorofenyltrifluoroacetaat (1.16 eq; 2.02 mmol) toegevoegd. Na 60 minuten roeren wordt het reactiemengsel verdund met 100 ml EtOAc en overgebracht in een scheidrecther. De organische fase wordt drie keer gewassen met 100 ml 0.1 M HCl_(aq) en vervolgens drie keer met een 100 ml 5% NaHCO_{3(aq)}-oplossing. Hierna wordt de organische fase gedroogd op MgSO₄ en daarna ingedampt tot een vloeïende gele olie. Dit wordt opgezuiverd met kolomchromatografie op silica met zuiver DCM als eluens. Na opzuivering wordt geactiveerd decaanzuur bekomen met een rendement van 79.8 %. Een ¹⁹F-NMR werd opgenomen.

Analysedata:

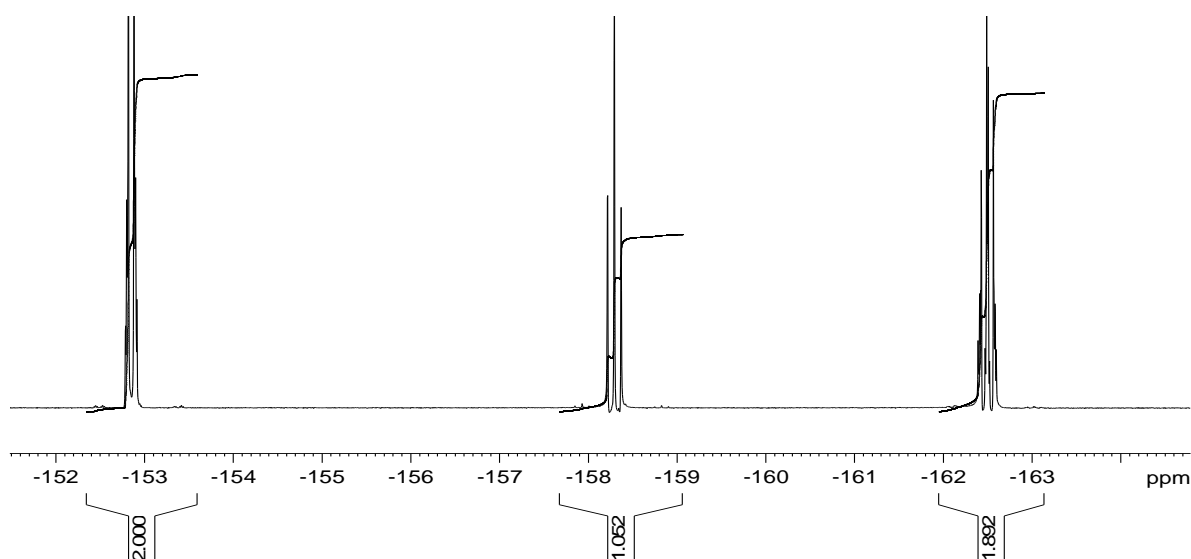
Moleculair gewicht=338.312 g/mol

TLC: R_f= 0.76 en UV-actief (zuiver DCM)

¹⁹F-NMR (CDCl₃, 282.4MHz)

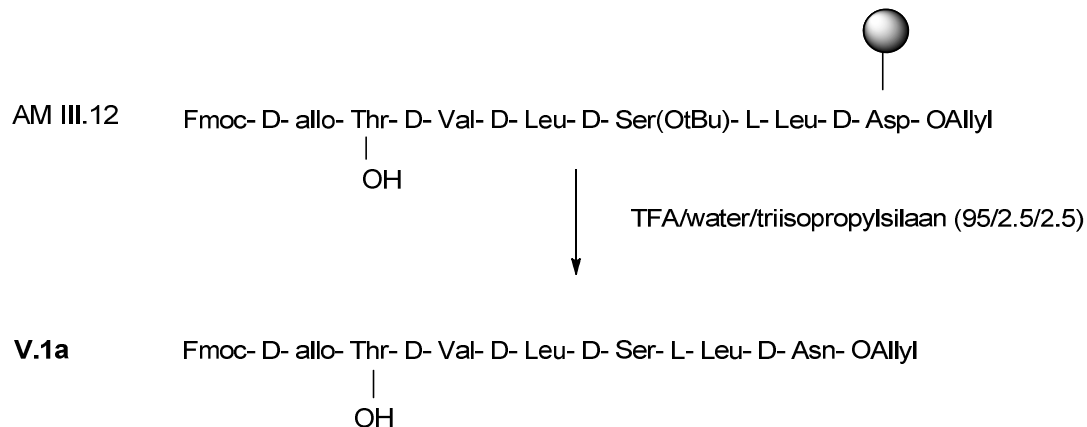
Structuur	Positie	δ (ppm)	Integratie	Multipliciteit	J (Hz)
	1(ortho)	-152.85	2F	d	17.0
	2(meta)	-161.77	2F	dd	21.8;17.0
	3(para)	--158.29	1F	t	21.8

Tabel 9.5



Figuur 9.10a 1D-¹⁹F NMR-spectrum van IV.5

9.8 Proefafsplitsing van startmateriaal (afkomstig van Anna Malinowska [6])



Figuur 9. 8 Proefafsplitsing

Om na te gaan of het startmateriaal AM III.12 – gemaakt door Anna Malinowska – nog goed is, wordt een proefafsplitsing uitgevoerd op een minieme hoeveelheid van het beginmateriaal. Het afgesplitste product wordt met LC-MS onderzocht.

Analysedata:

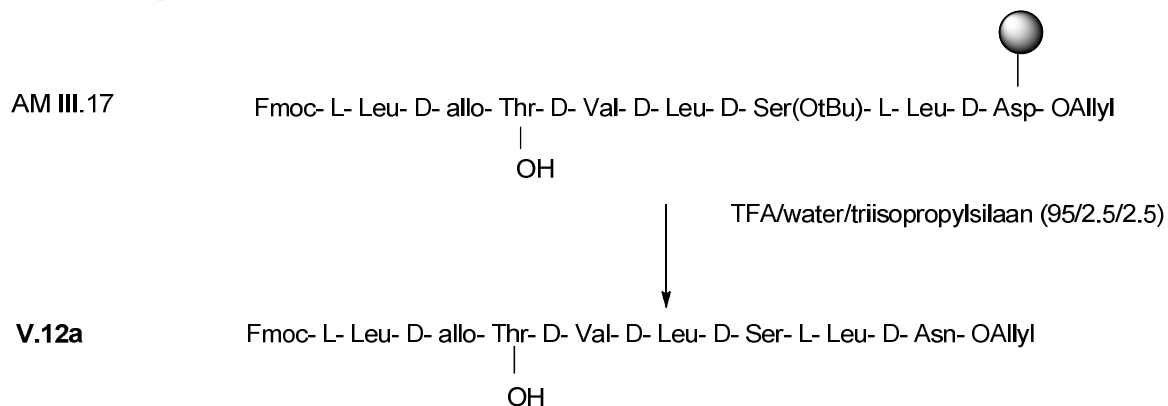
Moleculair gewicht: 908.05 g/mol

LC-MS (0-100% in 15 minuten op C18-kolom):

retentietijd	massa	interpretatie
16.773	908.4	[V.1a+H] ⁺

Tabel 9.6

9.9 Proefafsplitsing van AM III.17 (afkomstig van Anna Malinowska[6])



Figuur 9. 9 Proefafsplitsing

Om na te gaan of het startmateriaal AM III.17 – gemaakt door Anna Malinowska – nog goed is, wordt een proefafsplitsing uitgevoerd op een minieme hoeveelheid van het beginmateriaal. Het afgesplitst product wordt met LC-MS onderzocht.

Analysedata:

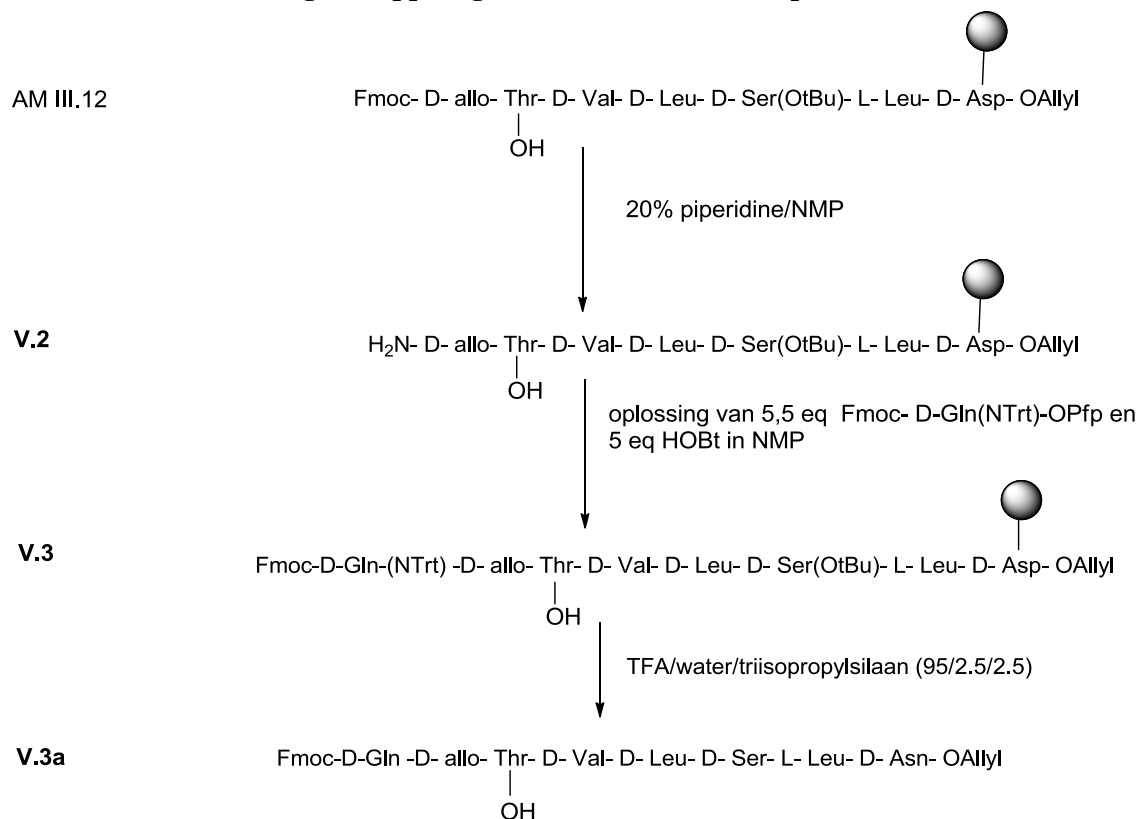
Moleculair gewicht: 1021.21 g/mol

LC-MS ((0-100% in 15 minuten op C18-kolom):

retentietijd	massa	interpretatie
8.918	100	NMP (solvent)
17.904	1021.5	[V.12a+H] ⁺

Tabel 9.7

9.10 Fmoc-ontscherming en koppeling Fmoc-D-Gln(NTrt)-OPfp



Figuur 9. 3 Fmoc-ontscherming en koppeling Fmoc-D-Gln(NTrt)-OPfp

Na Fmoc-ontscherming wordt een TNBS-kleurtest wordt uitgevoerd. Oranje korrels wijzen op een succesvolle ontscherming.

Het ontschermde hars (~10.9 mg) wordt twee keer gewassen met 0.5 ml NMP. Een oplossing van 11.2 mg Fmoc-D-Gln(NTrt)-OPfp (5.5 eq; 0.0144 mmol) en 1.77 mg HOBt (5.0 eq; 0.0131mmol) in 110 µl NMP wordt toegevoegd en 2 uur geschud bij kamertemperatuur. Hierna wordt de oplossing afgefiltreerd en het hars gewassen met 3*0.5 ml NMP, 3*0.5 ml MeOH en 3*0.5 ml DCM. Kleurtesten worden uitgevoerd. TNBS-test en NF31leveren kleurloze korrels op. NF31/DMAP toont lichtrode korrels. Dit wijst op een succesvolle koppeling. Een proefafsplitsing wordt uitgevoerd, gevolgd door analyse met LC-MS.

Analysedata:

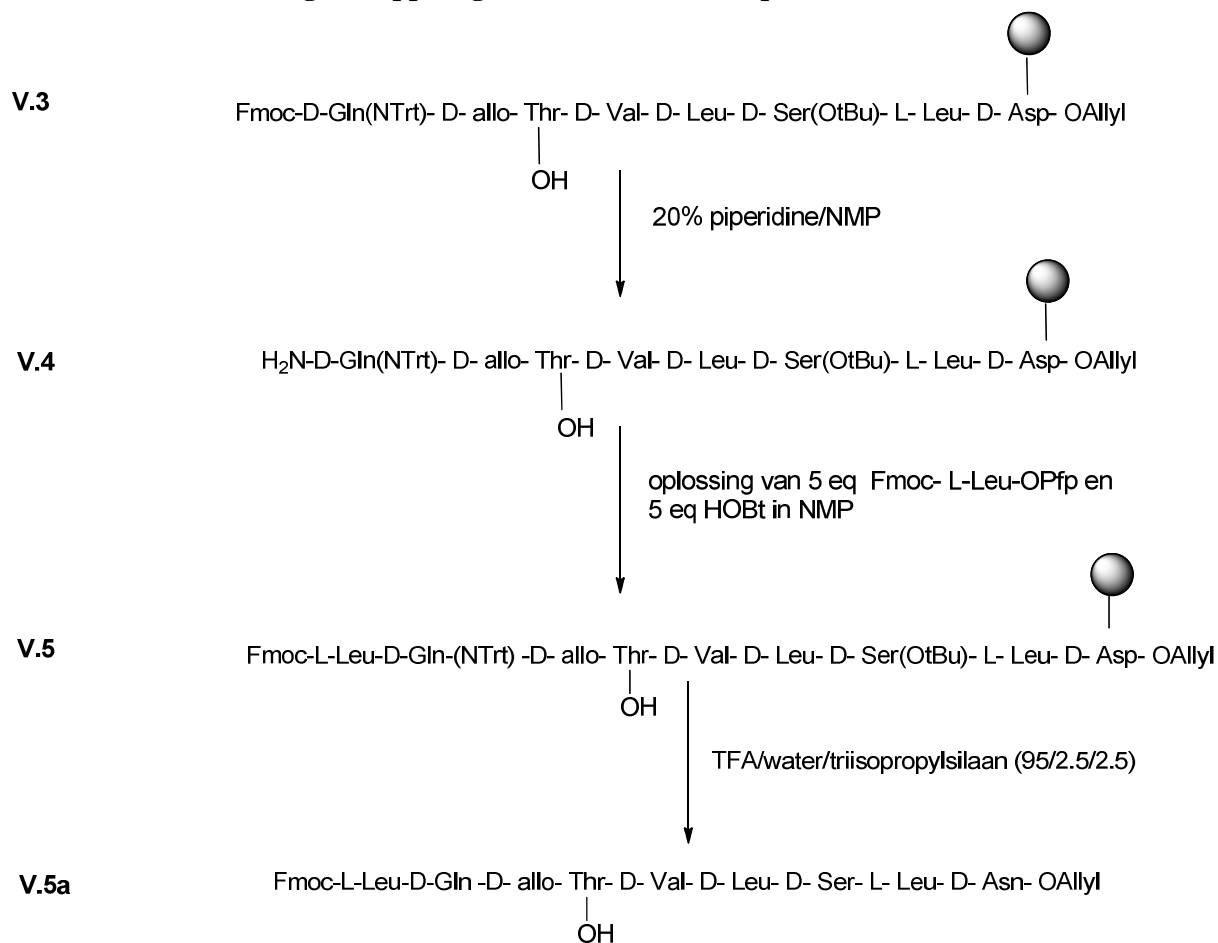
Moleculair gewicht: 1036.18 g/mol

LC-MS (0-100% in 15 minuten op C18-kolom):

retentietijd	Massa	interpretatie
8.872	100	NMP (solvent)
15.452	1036.4	[V.3a+H] ⁺

Tabel 9.8

9.11 Fmoc-ontscherming en koppeling van Fmoc-L-Leu-OPfp



Figuur 9. 4 Fmoc-ontscherming en koppeling van Fmoc-L-Leu-OPfp

Na Fmoc-ontscherming wordt een TNBS-kleurtest uitgevoerd. Oranje korrels wijzen op een succesvolle ontscherming.

Het ontschermd hars (~10.9 mg) wordt twee keer gewassen met 0.5 ml NMP. Een oplossing van 6.8 mg Fmoc-D-Gln(NTrt)-OPfp (5.0 eq; 0.0131 mmol) en 1.77 mg HOBt (5.0 eq; 0.0131 mmol) in 110 µl NMP wordt toegevoegd en het geheel wordt 2 uur geschud bij kamertemperatuur. Hierna wordt het overtollige reagens afgefiltreerd en het hars wordt gewassen met 3*0.5 ml NMP, 3*0.5 ml MeOH en 3*0.5 ml DCM. Kleurtesten worden uitgevoerd. TNBS-test en NF31 leveren kleurloze korrels op. NF31/DMAP tonen lichtrode korrels. Dit wijst op een succesvolle koppeling. Een proefafsplitsing wordt uitgevoerd, gevolgd door analyse met LC-MS.

Analysedata:

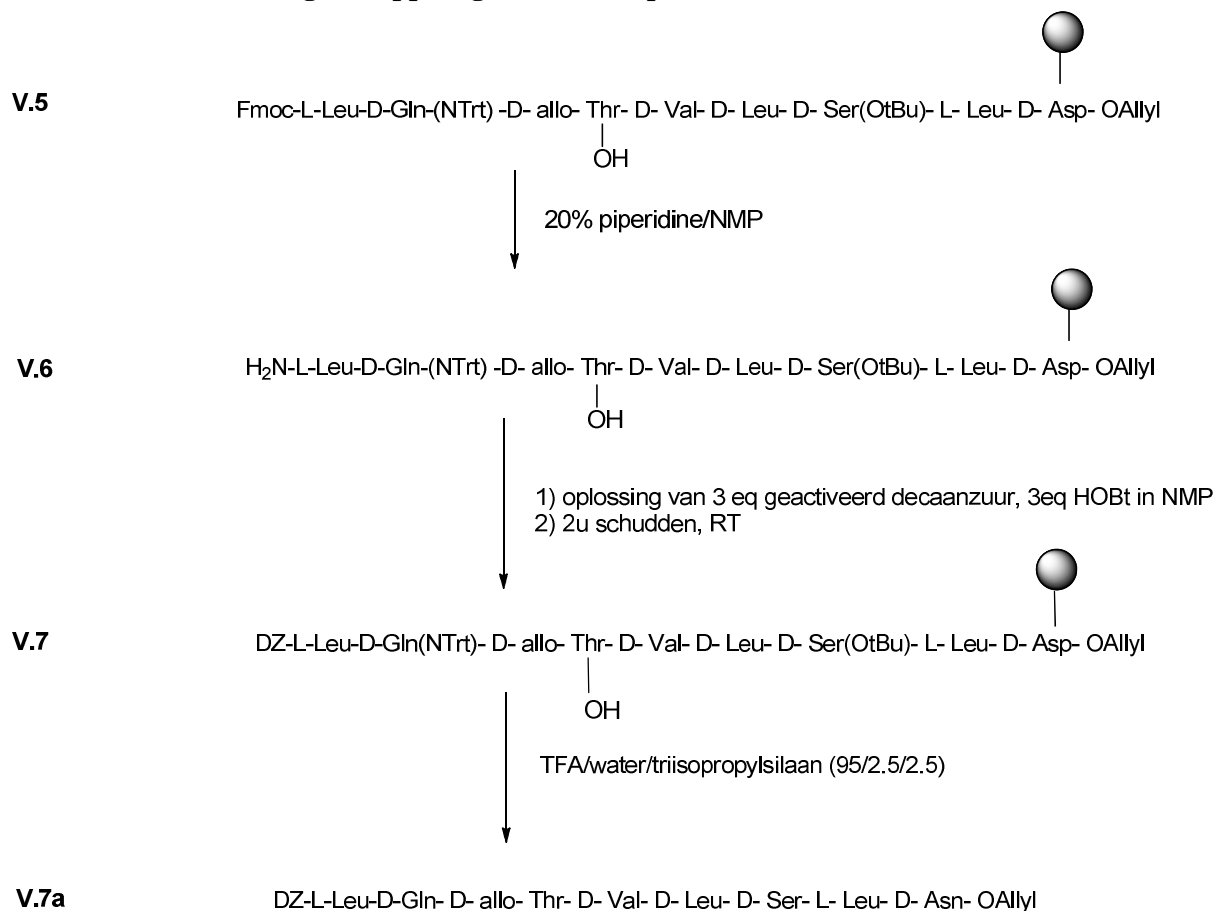
Moleculair gewicht: 1149.33 g/mol

LC-MS (0-100% in 15 minuten op C18-kolom):

retentietijd	massa	interpretatie
17.012	1149.5	[V.5a +H] ⁺
17.888	1021.5	[V.12a +H] ⁺ (deletiepeptide zonder Gln)

Tabel 9.9

9.12 Fmoc-ontscherming en koppeling van DZ-OPfp



Figuur 9. 5 Fmoc-ontscherming en koppeling van DZ-OPfp

Na Fmoc-ontscherming wordt een TNBS-kleurtest uitgevoerd. Oranje korrels wijzen op een succesvolle ontscherming.

Het ontschermde hars (~10.9 mg) wordt twee keer gewassen met 0.5 ml NMP. Een oplossing van 2.65 mg Fmoc-D-Gln(NTrt)-OPfp (3.0 eq; 0.0078 mmol) en 1.06 mg HOBt (3.0 eq; .0078 mmol) in 110 µl NMP wordt toegevoegd en het geheel wordt 2 uur geschud bij kamertemperatuur. Hierna wordt het overtollige reagens afgefilterd en het hars wordt gewassen met 3*0.5 ml NMP, 3*0.5 ml MeOH en 3*0.5 ml DCM. TNBS-kleurtest wordt uitgevoerd. TNBS-kleurtest levert kleurloze korrels op. Dit wijst op een succesvolle koppeling. Een proefafsplitsing wordt uitgevoerd, gevolgd door analyse met LC-MS.

Analysedata:

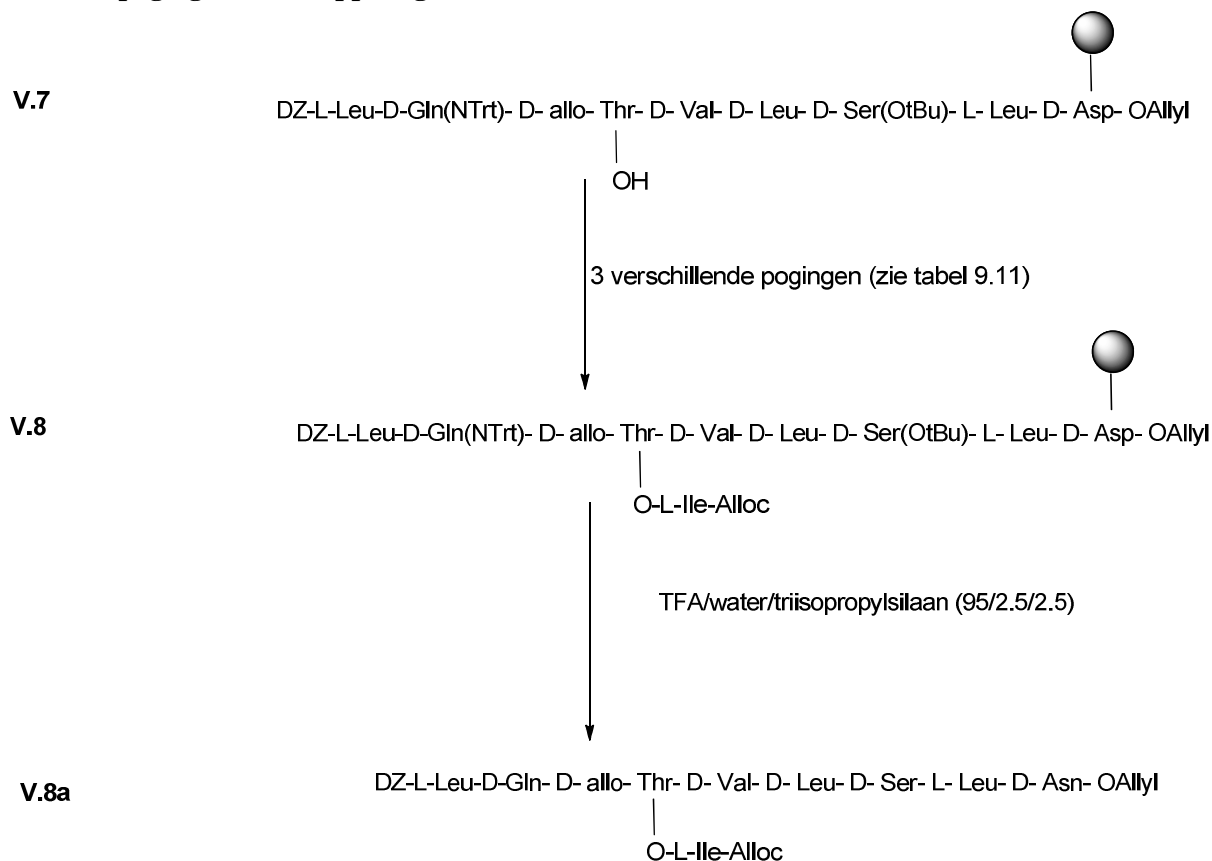
Moleculair gewicht: 1081.35 g/mol

LC-MS (0-100% in 15 minuten op C18-kolom):

retentietijd	massa	interpretatie
8.867	100	NMP (solvent)
18.2	1081.6	[V.7a +H] ⁺
19.351	953.5	(deletiepeptide zonder Gln)

Tabel 9.10

9.13 Testpogingen voor koppeling van Alloc-Ile



Figuur 9.13 Koppeling van Alloc-Ile

Drie pogingen werden ondernomen om Alloc-Ile te koppelen. Aangezien het beginproduct **V.7** niet of nauwelijks is weggereageerd bij deze pogingen, werden deze telkens uitgevoerd op dezelfde reactor. Een overzicht van de drie pogingen wordt gegeven in tabel 9.11

	Conditie	Resultaat (op basis van LC-MS na proefafsplitsing)
1^e poging	7 eq Alloc-Ile, 7eq DIC, 0.7 eq DMAP in droge DCM 3 uur schudden, RT	Minimale hoeveelheid V.8 gevormd
2^e poging	5 eq Alloc-Ile, 5eq DMTMM Cl, 5eq NMM in droge DMF 19 uur schudden, RT	Geen reactie
3^e poging	10 eq Alloc-Ile, 10 eq DMTMM BF ₄ , 10 eq NMM in droge DMF 1 week schudden, RT	Geen reactie

Tabel 9.11

Data na LC-MS analyse eerste poging:

Moleculair gewicht: 1278.58 g/mol

LC-MS (75-100% in 15 minuten op C18-kolom):

retentietijd	Massa	interpretatie
6.028	1081.6	[V.7a +H] ⁺
9.907 (minieme piek)	1278.7	[V.8a1 +H] ⁺
10.977 (minieme piek)	1278.7	[V.8a2 +H] ⁺

Tabel 9.12 Resultaat na eerste poging

De grootste piek stemt overeen met **V.7**, wat betekent dat er amper reactievorming is opgetreden. De massa overeenstemmend met **V.8a** is zichtbaar bij twee retentietijden, maar ze vormen slechts zeer kleine pieken in het chromatogram.

Data na LC-MS analyse tweede poging:

Moleculair gewicht: 1278.58 g/mol

LC-MS (75-100% in 15 minuten op C18-kolom):

retentietijd	Massa	interpretatie
6.006	1081.6	[V.7a+H] ⁺
9.926 (minieme piek)	640	[V.8a1+H] ²⁺
11.018 (minieme piek)	640	[V.8a2+H] ²⁺

Tabel 9.13 Resultaat na tweede poging

De grootste piek stemt overeen met V.7, wat betekent dat er amper reactie is opgetreden. De massa overeenstemmend met de helft van V.8a is zichtbaar bij twee retentietijden, maar ze vormen slechts twee zeer kleine pieken in het chromatogram. Bovendien zijn deze twee pieken bijna uitsluitend afkomstig van de eerste poging.

Data na LC-MS analyse derde poging:

Moleculair gewicht: 1278.58 g/mol

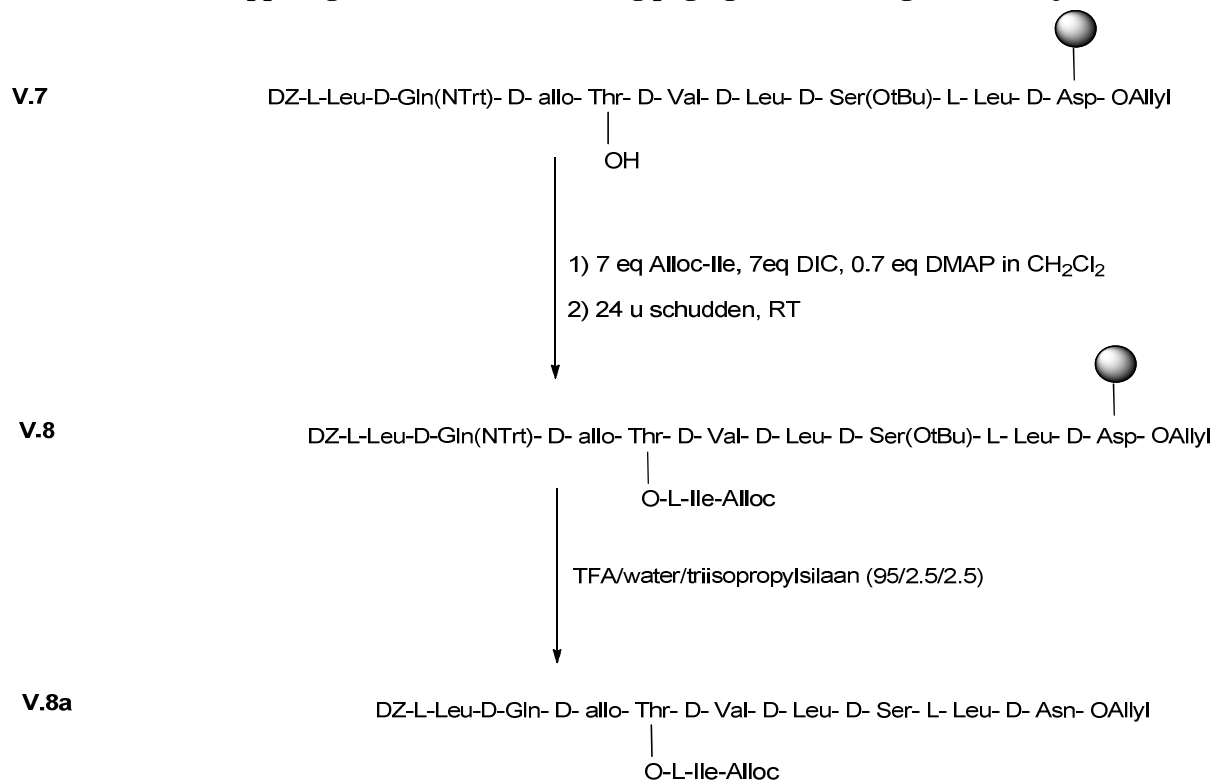
LC-MS (75-100% in 15 minuten op C18-kolom):

retentietijd	massa	interpretatie
5.942	1081.6	[V.7a+H] ⁺
9.762 (minieme piek)	1278.7	[V.8a1+H] ⁺
10.886 (minieme piek)	1278.7	[V.8a2+H] ⁺

Tabel 9.14 Resultaat na derde poging

De grootste piek stemt overeen met V.7, wat betekent dat er amper reactie is opgetreden. De massa overeenstemmend met V.8 is zichtbaar bij twee retentietijden, maar ze vormen slechts twee zeer kleine pieken in het chromatogram. Bovendien zijn deze twee pieken bijna uitsluitend afkomstig van de eerste poging. Dit kan men afleiden omdat de drie pogingen ondernomen zijn op hetzelfde hars.

9.14 Succesvolle koppeling van Alloc-Ile: herhaling poging 1 met verlengde reactietijd



Figuur 9. 14 Koppeling van Alloc-Ile

Uit de eerste drie pogingen kan men afleiden dat enkel in de eerste poging er product werd gevormd. Daarom wordt besloten om de reactie te hernemen met een verlengde reactietijd.

15 mg hars wordt 3 keer gewassen met 0.5 ml droge DCM. Er wordt onder argonatmosfeer gewerkt omdat DIC zeer gevoelig is voor luchtvochtigheid. Aan de reactor wordt een oplossing van 5.4 mg Alloc-Ile (7eq; 0.0252 mmol), 0.307 mg DMAP (0.7 eq; 0.00252 mmol) en 3.9 µl DIC (7 eq; 0.0252mmol) in 300 µl droge DCM toegevoegd. Hierna wordt de reactor gespoeld met argon en 24 uur geschud bij kamertemperatuur. De korrels worden hierna gewassen met 3*0.5 ml droge DCM, 3*0.5 ml MeOH en 3*0.5 ml droge DCM. Hierna wordt deze werkwijze herhaald en wordt het reactiemengsel opnieuw 24 uur geschud. Tijdens de herhalingsstap is het solvent geleidelijk aan verdampt, waardoor de reagentia sterk geconcentreerd aanwezig waren.

Om te controleren of het reactieproduct is gevormd, wordt een proefafsplitsing uitgevoerd waarop LC-MS wordt uitgevoerd. Hieruit blijkt dat er nu wel veel product is gevormd. Er trad echter wel epimerisatie op met vorming van twee diastereomeren. Een proefafsplitsing wordt uitgevoerd, gevolgd door analyse met LC-MS.

Analysedata:

Moleculair gewicht: 1278.58 g/mol

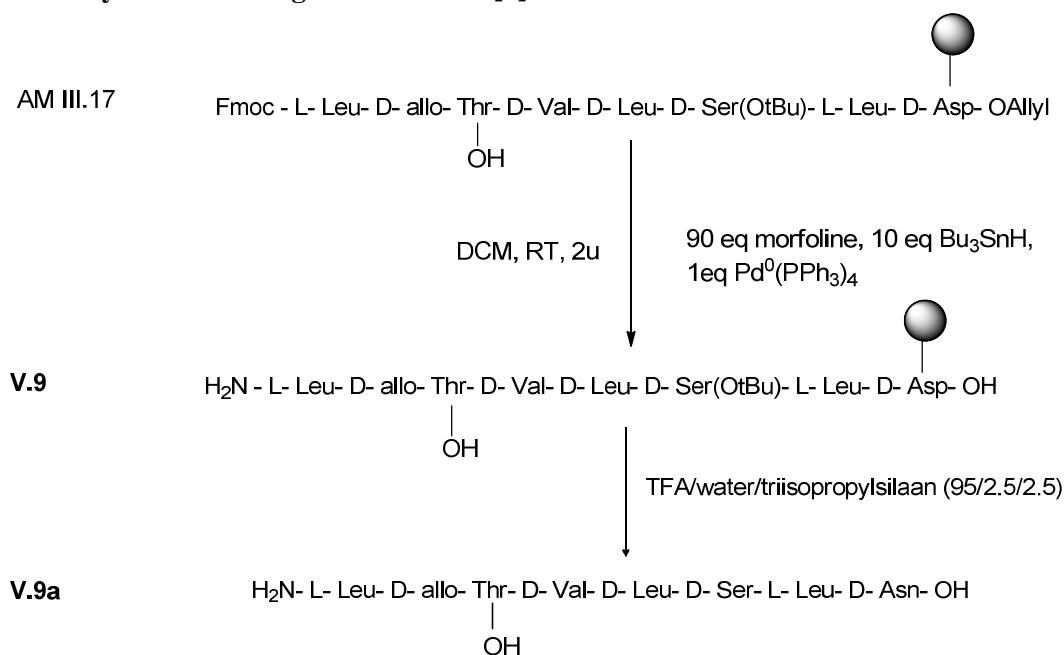
LC-MS (75-100% in 15 minuten op C18-kolom):

retentietijd	massa	Interpretatie
6.066	1081.6	[V.7a+H] ⁺
9.988	1278.7	[V.8a1+H] ⁺
11.101	1278.7	[V.8a2+H] ⁺
13.678	1150.6	Deletiepeptide zonder Gln
14.820	1150.6	Deletiepeptide zonder Gln

Tabel 9.15

Deze keer is er wel meer V.8 aanwezig dan V.7, dus de reactie gaat nu wel door. Twee pieken met de juiste massa zijn zichtbaar. Er blijken 2 diastereomeren gevormd.

9.15 Allyl-ontscherming van AM III.17[6]



Figuur 9. 15 Allylontscherming van AM III.17

7.3 mg gedroogd hars AM III.17, afkomstig van Ana Malinowska, wordt in een reactor gebracht met 50 μl *moist* (= niet gedroogd) DCM en het geheel wordt onder argon gezet. Hierbij wordt 13.8 μl morfoline (90 eq; 0.1577 mmol), 4.6 μl Bu_3SnH (10 eq; 0.01752 mmol) en 2.3 mg $\text{Pd}^0(\text{PPh}_3)_4$ (1eq; 0.001752mmol) en 60 μl DCM gebracht. De reactor wordt gespoeld met argon, afgeschermd van licht en twee uur geschud bij kamertemperatuur. Hierna wordt overtollig solvent en reagentia door de filter geblazen en intensief gewassen met 3*DCM, 3*DMF, 3*MeOH en 3*DCM.

Om te controleren of het reactieproduct is gevormd, wordt een proefafsplitsing uitgevoerd op V.9 waarna LC-MS wordt uitgevoerd op het afgesplitste product. Hieruit blijkt dat de Allyl-ontscherming succesvol is. Het aanwezige morfoline zorgt ook voor gedeeltelijke Fmoc-ontscherming. Een proefafsplitsing wordt uitgevoerd, gevolgd door analyse met LC-MS.

Analysedata:

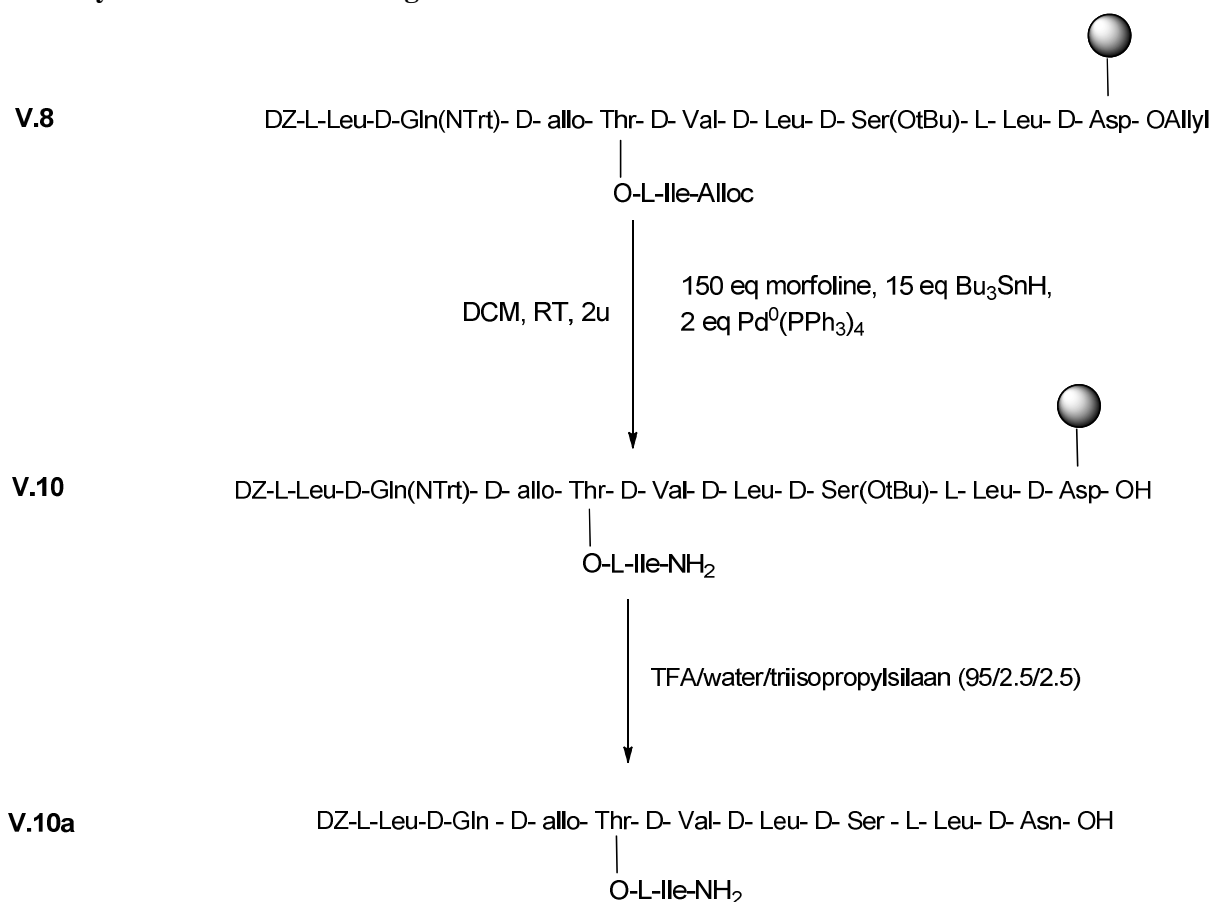
Moleculair gewicht: 758.90 g/mol

LC-MS (0-100% in 15 minuten op C18-kolom):

retentietijd	Massa	interpretatie
8.483	375	?
11.475	759.4	$[\text{V.9a}+\text{H}]^+$
14.626	981.4	$[\text{V.9a}+\text{Fmoc}+\text{H}]^+$

Tabel 9.16

9.16 Allyl- en Alloc-ontscherming van V.8



Figuur 9. 16 Allyl- en Alloc-ontscherming

10 mg gedroogd hars V.8 wordt in een reactor gebracht met 70 μl DCM en het geheel wordt onder argon gezet. Hierbij wordt 30 μl morfoline (150 eq; 0.36 mmol), 9.5 μl Bu_3SnH (15 eq; 0.036 mmol)

en 5.5 mg Pd⁰(PPh₃)₄ (1eq; 0.0048mmol) en 100 µl DCM gebracht. De reactor wordt gespoeld met argon, afgeschermd van licht en twee uur geschud bij kamertemperatuur. Hierna wordt overtollig solvent en reagentia door de filter geblazen en intensief gewassen met 3*DCM, 3*DMF, 3*MeOH en 3* DCM.

Om te controleren of het reactieproduct is gevormd, wordt een proefafsplitsing uitgevoerd op V.10 waarna LC-MS wordt uitgevoerd op het afgesplitste product. Hieruit blijkt dat de Allyl- en Alloc ontscherming succesvol is. Een proefafsplitsing wordt uitgevoerd, gevolgd door analyse met LC-MS.

Analysedata:

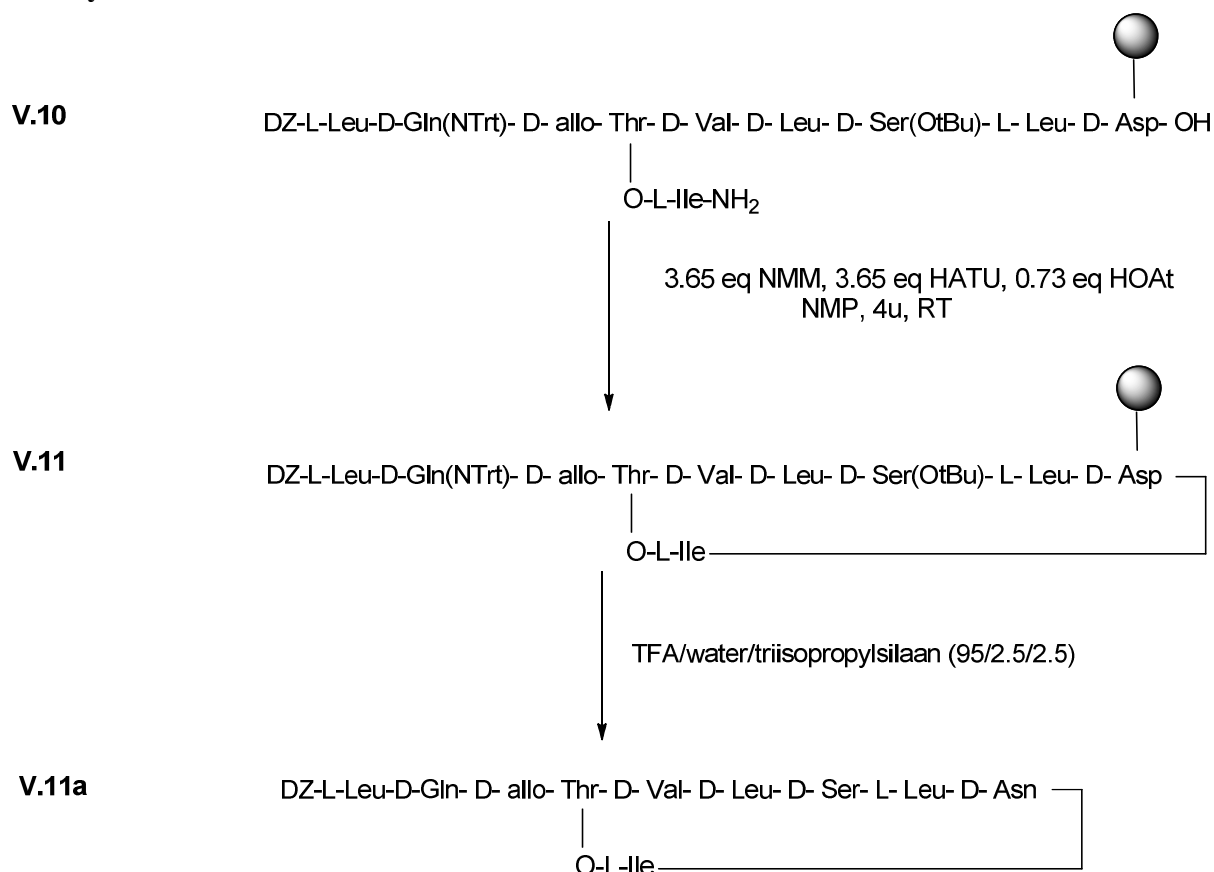
Moleculair gewicht: 1154.44 g/mol

LC-MS (0-100% in 15 minuten op C18-kolom):

Retentietijd	massa	interpretatie
8.469	375	?
15.282	1154.7	[V.10a1+H] ⁺
15.537	1154.7	[V.10a2+H] ⁺

Tabel 9.17

9.17 Cyclisatie van V.10



Figuur 9. 17 Cyclisatie van V.10

10 mg van het hars V.10 wordt gewassen met 2*0.5 ml NMP en onder argon gezet. Een oplossing van 0.96 µl NMM (3.65 eq; 0.008876mmol), 3.3 mg HATU (3.65eq; 0.008876 mmol) en 0.23 mg HOAt (0.73 eq; 0.00175mmol) in 150µl NMP wordt toegevoegd. De reactor wordt 4 uur geschud bij kamertemperatuur. Hierna wordt het overtollige solvent en reagentia afgefiltreerd en het product wordt gewassen met 3*0.5 ml NMP, 3*0.5 ml MeOH en 3*0.5 ml DCM.

Om te controleren of het reactieproduct is gevormd, wordt een proefafsplitsing uitgevoerd op V.11 waarna LC-MS wordt uitgevoerd op het afgesplitste product. Hieruit blijkt dat merendeel van V.10 gecycliseerd werd. Een proefafsplitsing wordt uitgevoerd, gevolgd door analyse met LC-MS.

Analysedata:

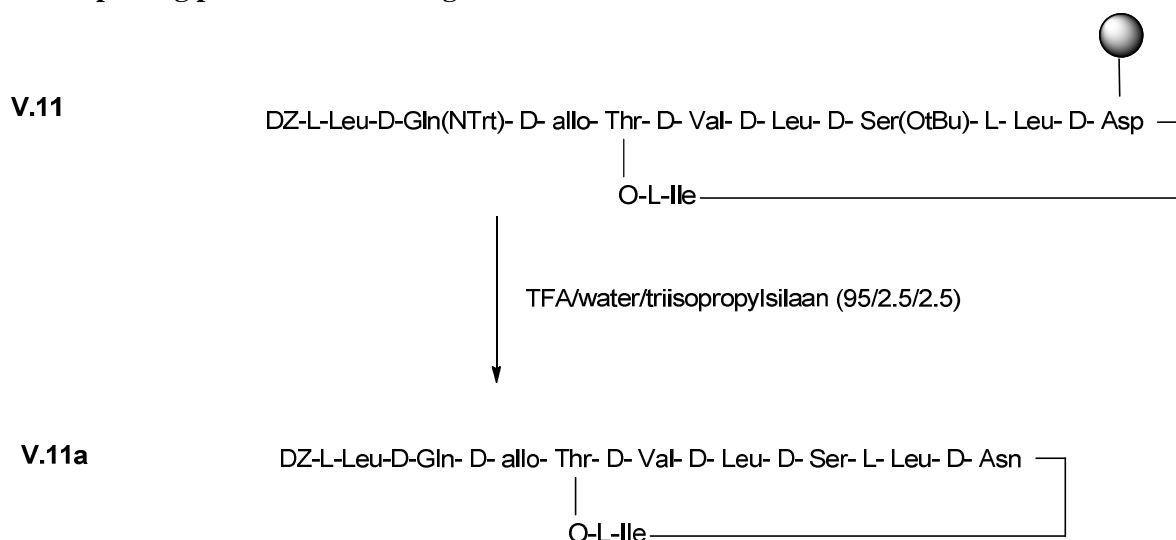
Moleculair gewicht: 1136.42 g/mol

LC-MS (75-100% in 15 minuten op C18-kolom):

retentietijd	Massa	interpretatie
12.119	1136.7	[V.11a1+H] ⁺
12.481	1136.7	[V.11a2+H] ⁺
13.134	1136.7	[V.11a3+H] ⁺
13.207	1136.7	[V.11a4+H] ⁺

Tabel 9.18

9.18 Afsplitsing product en zuivering V.11a



Figuur 9. 18 Afsplitsing product

Om product af te splitsen wordt 10 mg hars in een nieuwe reactor gebracht. Hier wordt 300 µl van een oplossing aan toegevoegd die bestaat uit: TFA (95%, 190µl), triisopropylsilaan (2.5%, 7.5µl) en gedemineraliseerd water (2.5 %,7.5 µl). De reactor wordt een uur geschud bij kamertemperatuur. Daarna wordt de vaste drager gewassen met TFA (~1ml) en het filtraat wordt opgevangen in een eppendorfje en wordt droog geblazen met argon via een pasteurpipet. De afsplitsing wordt herhaald waarbij het filtraat wordt opgevangen in zelfde eppendorfje.

Hierna wordt koude MTBE toegevoegd en het geheel 5 minuten gecentrifugeerd bij 5°C. De MTBE met de hierin opgeloste onzuiverheden wordt gedecanteerd. Het centrifuge proces wordt tweemaal herhaald. Hierna wordt 1.3 mg van een bruin-witte neerslag bekomen. LC-MS wordt opgenomen. Via HPLC worden de afzonderlijke fracties gecollecteerd.

Analysedata:

Moleculair gewicht: 1136.42 g/mol

LC-MS (75-100% in 15 minuten op C18-kolom):

retentietijd	Massa	Interpretatie
12.094	1136.7	[V.11a1+H] ⁺
12.481	1136.7	[V.11a2+H] ⁺
13.167	1136.7	[V.11a3+H] ⁺ en [V.11a4+H] ⁺

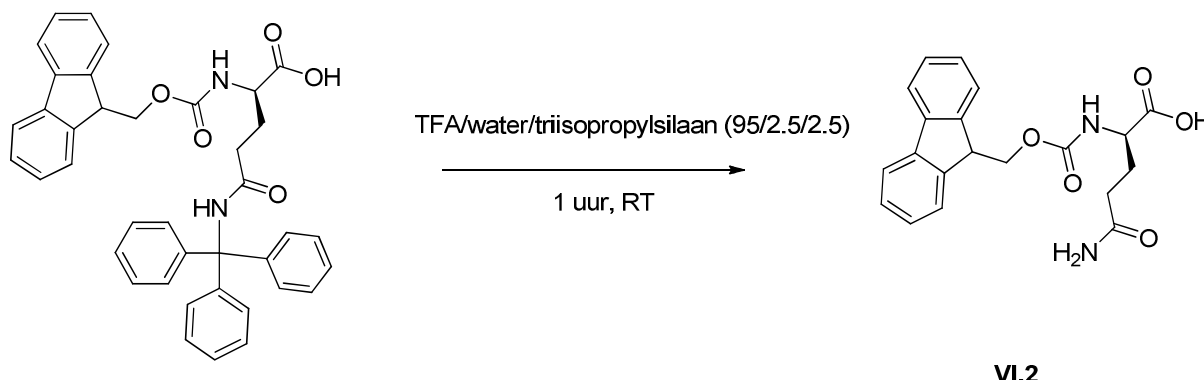
Tabel 9.19

HPLC (75-100% in 15 minuten op C18(2)-kolom):

retentietijd	interpretatie
11.781	[V.11a1+H] ⁺
12.352	[V.11a2+H] ⁺
12.895	[V.11a3+H] ⁺
13.420	[V.11a4+H] ⁺

Tabel 9.20

9.19 Trityl-ontscherming van Fmoc-D-Gln(NTrt)-OH



Figuur 9. 19 Trityl-ontscherming

0.250 g Fmoc-D-Gln(NTrt)-OH (0.4144 mmol) wordt in een plasticen recipiënt gebracht. Hier wordt 2.5 ml van een oplossing aan toegevoegd die bestaat uit: TFA (95%, 2.375 ml), triisopropylsilaan (2.5%, 0.0625 ml) en gedemineraliseerd water (2.5 %,0.0625 ml). De reactor wordt een uur geschud bij kamertemperatuur. Hierna wordt het reactiemengsel droog geblazen met stikstof. De reactie wordt herhaald en opnieuw drooggeblazen. Hierna wordt koude MTBE toegevoegd en 5 minuten gecentrifugeerd bij 5°C. De MTBE – met de hierin opgeloste onzuiverheden– wordt gedecanteerd. Het centrifuge proces wordt tweemaal herhaald. Het ontschermde product wordt bekomen met een rendement van 89.2 %. LC-MS wordt uitgevoerd.

Analysedata:

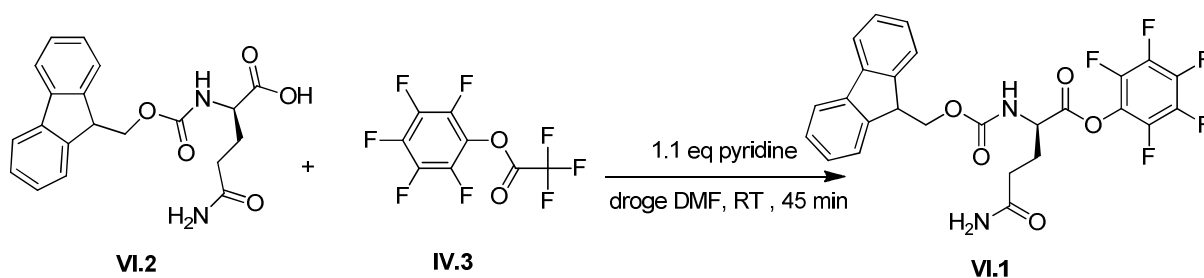
Moleculair gewicht: 368.38 g/mol

LC-MS (0-100% in 15 minuten op C18-kolom):

retentietijd	Massa	interpretatie
11.569	369.1	[VI.2+H] ⁺
	407.0	[VI.2+K] ⁺

Tabel 9.21

9.20 Activatie van Fmoc-D-Gln-OH



Figuur 9. 20 activatie van VI.2

Voor deze reactie wordt IV.3 commercieel aangekocht. Bij kamertemperatuur en onder argon atmosfeer wordt 125 mg Fmoc-D-Gln-OH (1eq; 0.339 mmol) opgelost in 1 ml droge DMF. Aan deze oplossing wordt 30 µl pyridine (1.1 eq; 0.373mmol) en 67 µl pentafluorofenyltrifluoroacetaat (1.16 eq; 0.394 mmol) toegevoegd. Na 45 minuten roeren wordt het reactiemengsel verdund met 70 ml EtOAc en overgebracht in een scheidrecther. De organische fase wordt drie keer gewassen met 70 ml 0.1 M HCl_(aq) en vervolgens drie keer met een 70 ml 5% NaHCO_{3(aq)}-oplossing. Hierna wordt de organische fase gedroogd op MgSO₄ en daarna ingedampd tot een witte vaste stof. Het product werd onderzocht met ESI-MS, LC-MS en een ¹⁹F-NMR spectrum werd opgenomen. Uit deze analyses blijkt dat het product grotendeels het juiste is maar dat er in mindere mate ook zijproducten aanwezig zijn. Uit NMR-analyse van IV.3 bleek dat dit product gedeeltelijk gedegradieerd was.

Analysedata:

Moleculair gewicht=534.43 g/mol

LC-MS (0-100% in 15 minuten op C18-kolom):

retentietijd	Massa	interpretatie
11.6	369.1	[VI.1 +H] ⁺
15.306	351.1	Cyclisch zijproduct
17.872	535.0	[VI.2 +H] ⁺

Tabel 9.22

ESI-MS: (m/z,fragment, intensiteit): 556.8 [**VI.1**+Na]⁺,100

534.3 [**VI.1**+H]⁺,13

390.9 [**VI.2**+Na]⁺,6

370.2 [cyclisch zijproduct + Na]⁺,5

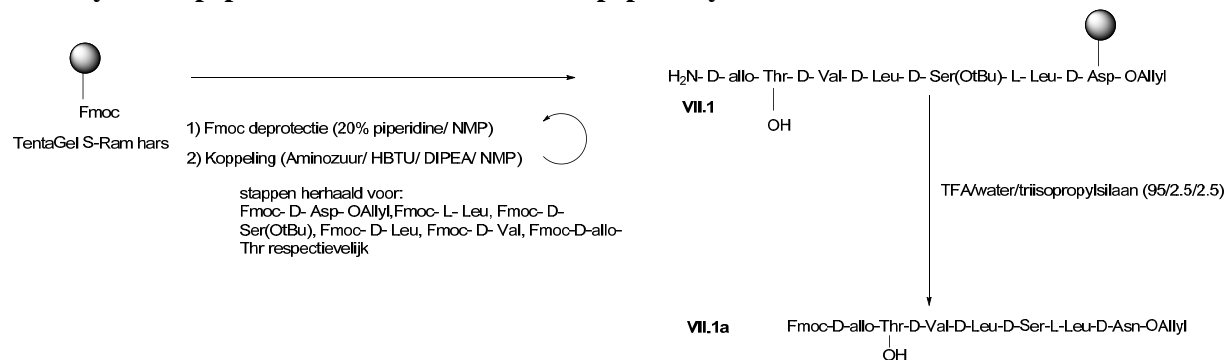
¹⁹F-NMR (CDCl₃, 282.4MHz)

Structuur	Positie	δ (ppm)	Integratie	Multipliciteit	J (Hz)
	1(ortho)	-152.23	2F	d	18.5
	2(meta)	-161.67	2F	dd	22.7;18.5
	3(para)	-156.95	1F	t	22.7

Tabel 9.23

Het fluorspectrum bevat daarnaast nog andere signalen bij -75, -156 en 163 ppm, die verder niet toegekend werden.

9. 21 Synthese peptide VII.1 met automatische peptide synthesizer.



Figuur 9. 21 Synthese peptide VII.1

Met de automatische peptide synthesizer wordt peptide VII.1 volledig automatisch aangemaakt. Men vertrekt van 150 mg Tentagel S Ram hars (0.036mmol). Eerst wordt het hars ontschermt een 20% piperidine oplossing in NMP, waarna het volgende Fmoc-beschermd aminozuur met PyBOP en DIPEA wordt gekoppeld. Deze stappen worden herhaald voor de individuele aminozuren. Een proefafsplitsing wordt uitgevoerd en het afgesplitste product aan LC-MS onderworpen. Dit leert dat VII.1 met succes gemaakt werd.

Analysedata:

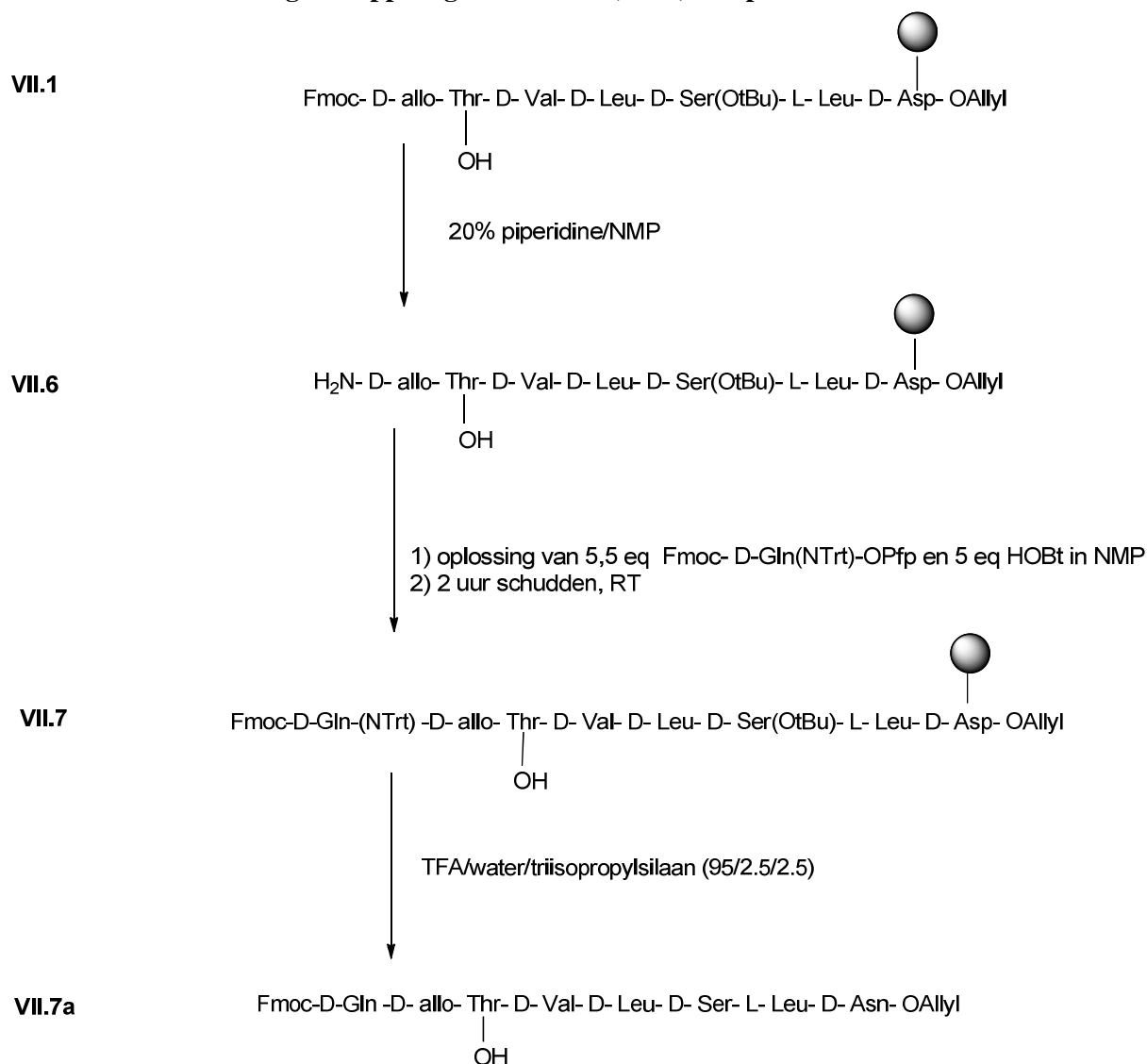
Moleculair gewicht: 908.05 g/mol

LC-MS (0-100% in 15 minuten op C18-kolom):

retentietijd	Massa	Interpretatie
16.797	908.40	[VII.1a+H] ⁺

Tabel 9.24

9.22 Fmoc-ontscherming en koppeling Fmoc-D-Gln(NTrt)-OPfp



Figuur 9. 22 Fmoc-ontscherming van en koppeling Fmoc-D-Gln(NTrt)-OPfp

Na Fmoc-ontscherming wordt een TNBS-kleurttest uitgevoerd. Oranje korrels wijzen op een succesvolle ontscherming.

Het ontschermd hars (~120 mg) wordt twee keer gewassen met 1.2 ml NMP. Een oplossing van 123 mg Fmoc-D-Gln(NTrt)-OPfp (5.5 eq; 0.1584 mmol) en 19.5 mg HOBt (5.0 eq; 0.144 mmol) in 1.2 ml NMP wordt toegevoegd en 2 uur geschud bij kamertemperatuur. Hierna wordt de oplossing afgefilterd en het hars gewassen met 3*1.2 ml NMP, 3*1.2 ml MeOH en 3*1.2 ml DCM. Kleurtesten worden uitgevoerd. TNBS-test en NF31 leveren kleurloze korrels op. NF31/DMAP tonen lichtrode korrels. Dit wijst op een succesvolle koppeling. Een proefafsplitsing wordt uitgevoerd, gevolgd door analyse met LC-MS.

Analysedata:

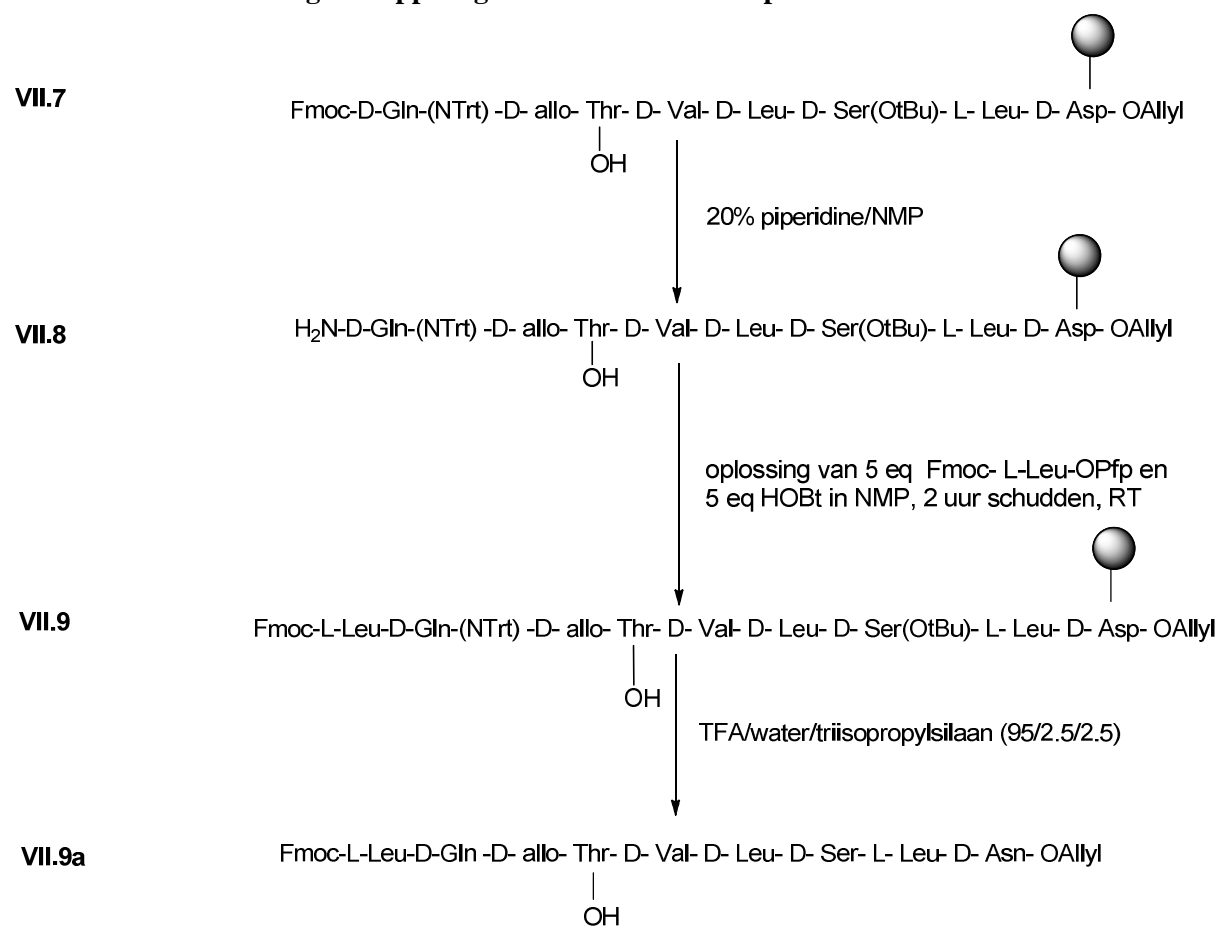
Moleculair gewicht: 1036.18 g/mol

LC-MS (0-100% in 15 minuten op C18-kolom):

Retentietijd	Massa	interpretatie
15.542	1036.40	[VII.7a+H] ⁺

Tabel 9.25

9.23 Fmoc-ontscherming en koppeling van Fmoc-L-Leu-OPfp



Figuur 9. 23 Fmoc-ontscherming van Fmoc-L-Leu-OPfp

Na Fmoc-ontscherming wordt een TNBS-kleurtest uitgevoerd. Oranje korrels wijzen op een succesvolle ontscherming.

Het ontschermd hars (~120 mg) wordt twee keer gewassen met 1.5 ml NMP. Een oplossing van 74.8 mg Fmoc-L-Leu-OPfp (5.0 eq; 0.144 mmol) en 19.5 mg HOBt (5.0 eq; .144mmol) in 1.2 µl NMP wordt toegevoegd en het geheel wordt 2 uur geschud bij kamertemperatuur. Hierna wordt het

overtollige reagens afgefiltreerd en het hars gewassen met 3*1.5 ml NMP, 3*1.5 ml MeOH en 3*1.5 ml DCM. Een proefafsplitsing wordt uitgevoerd, gevolgd door analyse met LC-MS.

Analysedata:

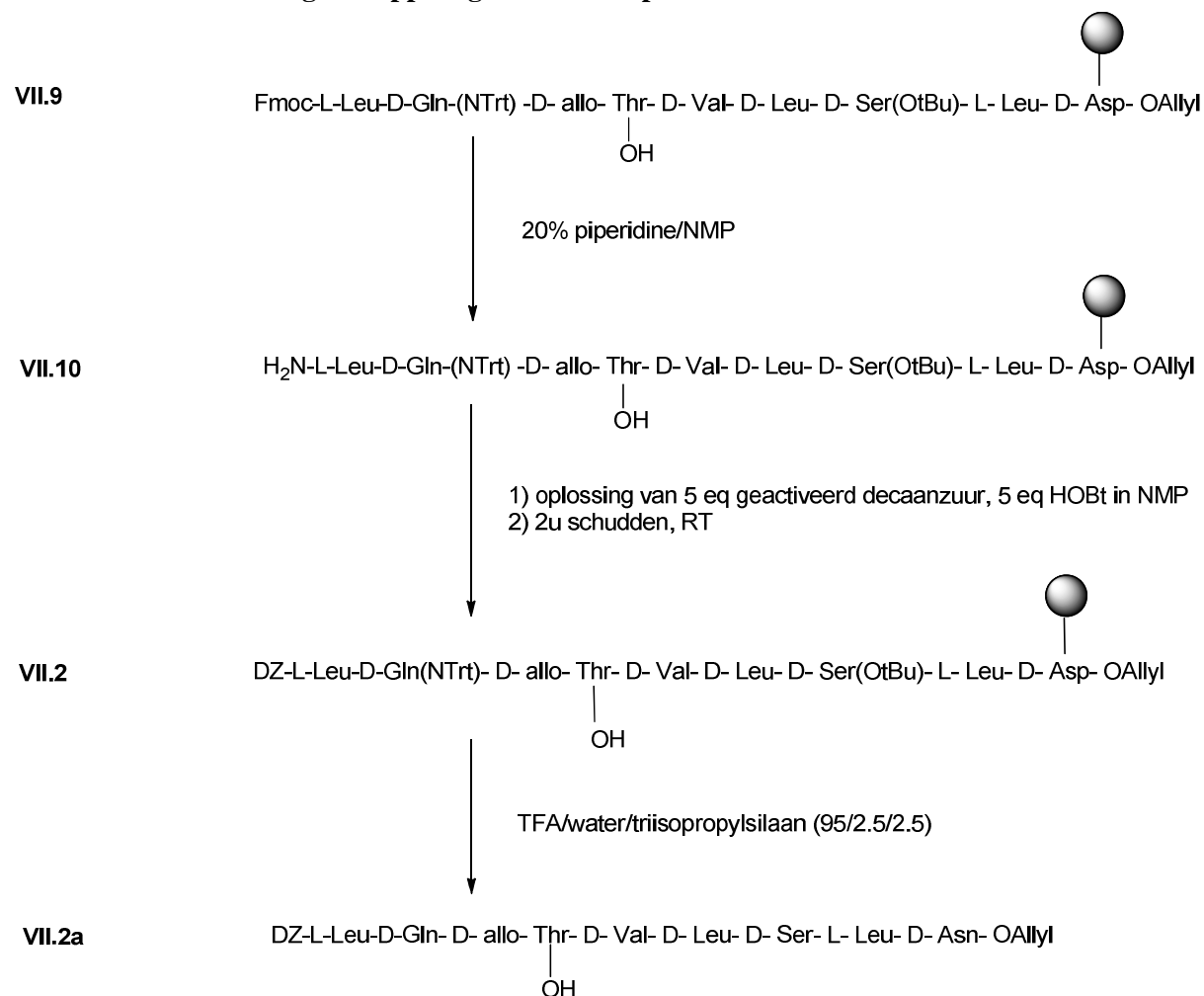
Moleculair gewicht: 1149.33 g/mol

LC-MS (0-100% in 15 minuten op C18-kolom):

retentietijd	Massa	interpretatie
17.134	1149.50	[VII.9a+H] ⁺

Tabel 9.26

9.24 Fmoc-ontscherming en koppeling van DZ-OPfp



Figuur 9. 24 Fmoc-ontscherming en koppeling van DZ-OPfp

Na Fmoc-ontscherming wordt een TNBS-kleurtest uitgevoerd. Oranje korrels wijzen op een succesvolle ontscherming.

Het ontschermd hars (~120 mg) wordt twee keer gewassen met 1.5 ml NMP. Een oplossing van 48.7 mg Fmoc-D-Gln(NTrt)-OPfp (5.0 eq; 0.144 mmol) en 19.5 mg HOBt (5.0 eq; 0.144 mmol) in 1.2 ml NMP wordt toegevoegd en het geheel wordt 2 uur geschud bij kamertemperatuur. Hierna wordt het overtollige reagens afgefiltreerd en het hars wordt gewassen met 3*1.5 ml NMP, 3*1.5 ml MeOH en 3*1.5 ml DCM. Een proefafsplitsing wordt uitgevoerd, gevolgd door analyse met LC-MS.

Analysedata:

Moleculair gewicht: 1081.35 g/mol

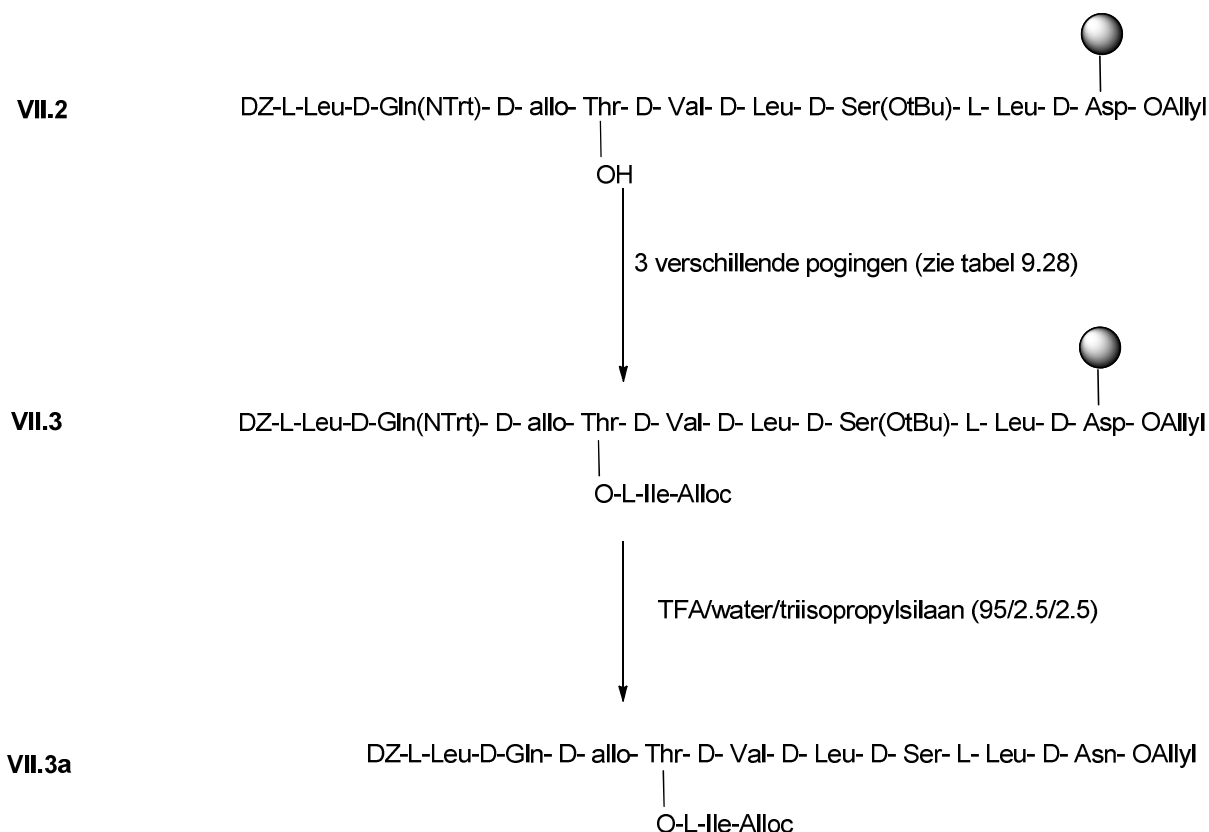
LC-MS (75-100% in 15 minuten op C18-kolom):

retentietijd	Massa	interpretatie
6.144	1081.60	[VII.2a+H] ⁺

Tabel 9.27

9.25 Testpogingen voor koppeling van Alloc-Ile

In hoofdstuk vijf werd vastgesteld dat epimerisatie optrad tijdens de koppeling van Alloc-Ile. Daarom wordt in de opschaling gezocht naar reagentia die dit voorkomen. Er werden drie pogingen in een afzonderlijke reactor ondernomen op telkens 10 mg VII.2. (tabel 9.28)



Figuur 9. 25 Koppeling van Alloc-Ile

	Conditie	Resultaat (op basis van LC-MS na proefafplitsing)
1 ^e poging	5 eq Alloc-Ile, 5eq HOAt, 5 eq DIC in droge DCM 16 uur schudden, RT	Geen reactie
2 ^e poging	5 eq Alloc-Ile, 3.75 eq MeIm, 5eq MSNT in droge DCM 5 uur schudden, RT	Minieme hoeveelheid VII.3a gevormd. (VII.3a2)
3 ^e poging	7 eq Alloc-Ile, 7 eq DIC, 0.1 eq DMAP in droge DCM 20 uur week schudden, RT	Geen reactie

Tabel 9.28

Data na LC-MS analyse eerste poging:

Moleculair gewicht: 1278.58 g/mol

LC-MS (75-100% in 15 minuten op C18-kolom):

retentietijd	Massa	interpretatie
6.059	1081.6	[VII.2a+H] ⁺

Tabel 9.29

De grootste piek stemt overeen met VII.2a. De massa overeenkomstig met VII.3a wordt nergens teruggevonden wat betekent dat er geen noemenswaardige reactie is opgetreden.

Data na LC-MS analyse tweede poging:

Moleculair gewicht: 1278.58 g/mol

LC-MS (75-100% in 15 minuten op C18-kolom):

retentietijd	Massa	interpretatie
6.121	1081.6	[V.2a+H] ⁺
11.175	1278.7	[V.3a2+H] ⁺

Tabel 9.30

De grootste piek stemt overeen met VII.2. De massa overeenkomstig met VII.3a wordt op slechts één plaats teruggevonden. Deze piek is echter amper zichtbaar in het chromatogram.

Data na LC-MS analyse derde poging:

Moleculair gewicht: 1278.58 g/mol

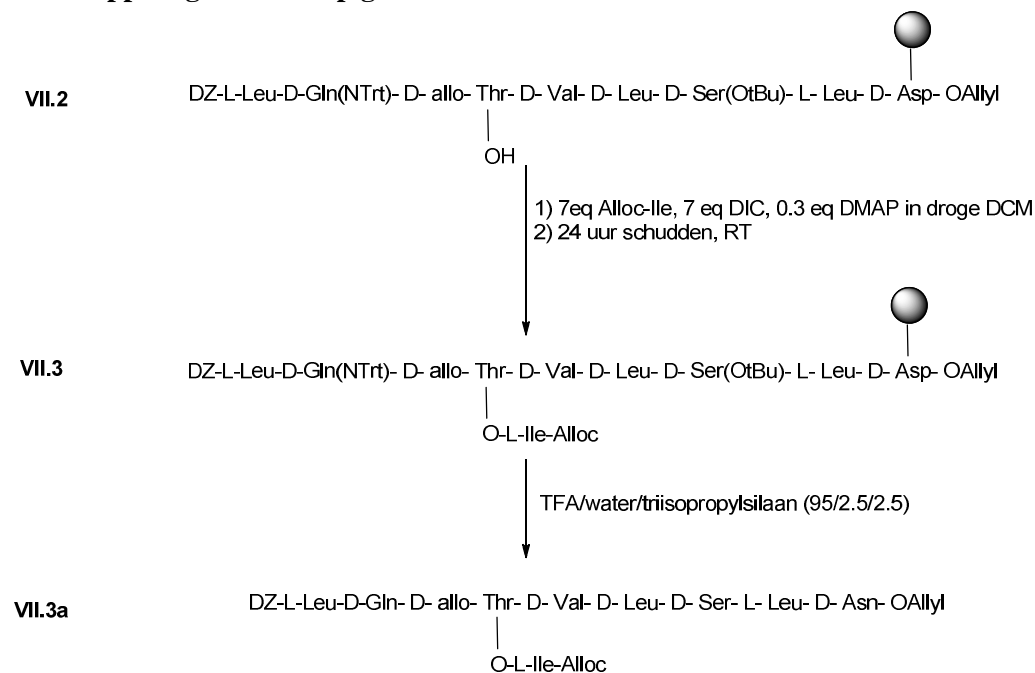
LC-MS (75-100% in 15 minuten op C18-kolom):

retentietijd	massa	interpretatie
6.121	1081.6	[V.2a+H] ⁺
10.066	1278.7	[V.3a1+H] ⁺
11.157	1278.7	[V.3a2+H] ⁺
11.280	1278.7	[V.3a2+H] ⁺ (vormt één piek met vorige)

Tabel 9.31

Deze keer is er wel meer VII.3a aanwezig dan VII.2a. Dus de reactie gaat nu wel door. Twee pieken met de juiste massa zijn zichtbaar. Er blijken dus 2 diastereomeren gevormd.

9.26 Koppeling Alloc-Ile op grote schaal met 'klassieke' condities



Figuur 9. 6 Koppeling van Alloc-Ile met klassieke condities

Tijdens de testreacties werd vastgesteld dat enkel de condities met DIC/DMAP aanleiding geven tot vorming van VII.3. Daarom worden deze condities herhaald op grote schaal (80 mg hars) Aangezien

de koppeling niet volledig doorging werd geopteerd om 0.3 eq DMAP te gebruiken. Om te voorkomen dat al het solvent verdampft en het hars droog komt te staan wordt meer solvent toegevoegd. Als gevolg hiervan worden ook meer equivalenten van de reagentia toegevoegd om de concentratie gelijk te houden.

80.0 mg hars (VII.2) wordt in een droge reactor geplaatst. De korrels worden gewassen met droge DCM om op te zwellen. Hierna wordt de reactor onder argon gezet. Ondertussen wordt in een droge kolf 57.9 mg Alloc-Ile (14eq; 0.1344 mmol) gebracht en opgelost in 800 µl droge DCM. Hierna wordt 42 µl DIC (14 eq; 0.1344 mmol) toegevoegd. Hierna wordt het mengsel met een spuit overgebracht naar de reactor. Tot slot wordt 1.4 mg DMAP (0.6 eq; 0.00192 mmol) toegevoegd, waarna de reactor 24 uur zacht geschud wordt bij kamertemperatuur. Deze werkwijze wordt tweemaal uitgevoerd. De korrels worden hierna gewassen droge DCM, MeOH en droge DCM. Een proefafsplitsing wordt uitgevoerd waarop LC-MS uitgevoerd wordt.

Analysedata:

Moleculair gewicht: 1278.58 g/mol

LC-MS (75-100% in 15 minuten op C18-kolom):

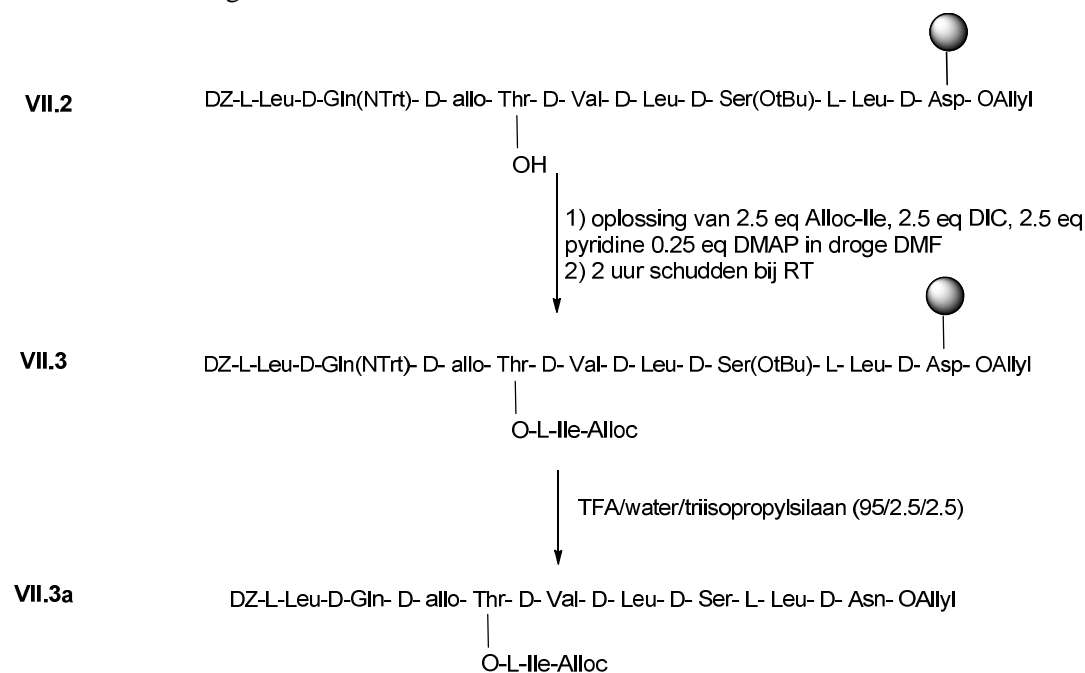
retentietijd	massa	interpretatie
6.096	1081.6	[V.2a+H] ⁺
8.559	1221.6	zijproduct
10.063	1278.7	[V.3a1+H] ⁺
11.144	1278.7	[V.3a2+H] ⁺

Tabel 9.32

Er is in beperkte mate V.3a gevormd en iets meer van het diastereomeer met de hoogste retentietijd.

9.27 Koppeling Alloc-Ile op grote schaal met ‘geoptimaliseerde condities’

Nadat de opschaling was aangevangen werd toch nog een conditie gevonden die de moeite waard was om uit te testen, aangezien er nog veel beginproduct aanwezig was, werd de opschaalreactie verder gezet volgens deze nieuwe methode. Een bijkomend voordeel is dat deze methode gebruik maakt van het minder vluchtige DMF.



Figuur 9. 27 Koppeling van Alloc-Ile met geoptimaliseerde condities

Een reactor met 80.0 mg gedroogd hars wordt gewassen met droge DMF en onder argon geplaatst. Ondertussen wordt in een droge kolf 10.5 mg Alloc-Ile (2.5 eq; 0.048 mmol) opgelost in 0.150 ml droge DMF. Hieraan wordt 7.5 μ l DIC (2.5 eq; 0.048mmol) toegevoegd en 20 minuten geroerd bij kamertemperatuur. Hierna wordt het mengsel met een spuit overgebracht naar reactor waarna 4 μ l pyridine(2.5 eq; 0.048 mmol) en 0.95 mg DMAP(0.25 eq; 0.0048mmol) wordt toegevoegd. Hierna wordt de reactie twee uur geschud bij kamertemperatuur. Het hars wordt gewassen met droge DMF, MeOH en DCM. Deze reactie wordt in totaal 5 keer uitgevoerd. Een proefafplitsing wordt uitgevoerd waarop LC-MS wordt uitgevoerd.

Analysedata:

Moleculair gewicht: 1278.58 g/mol

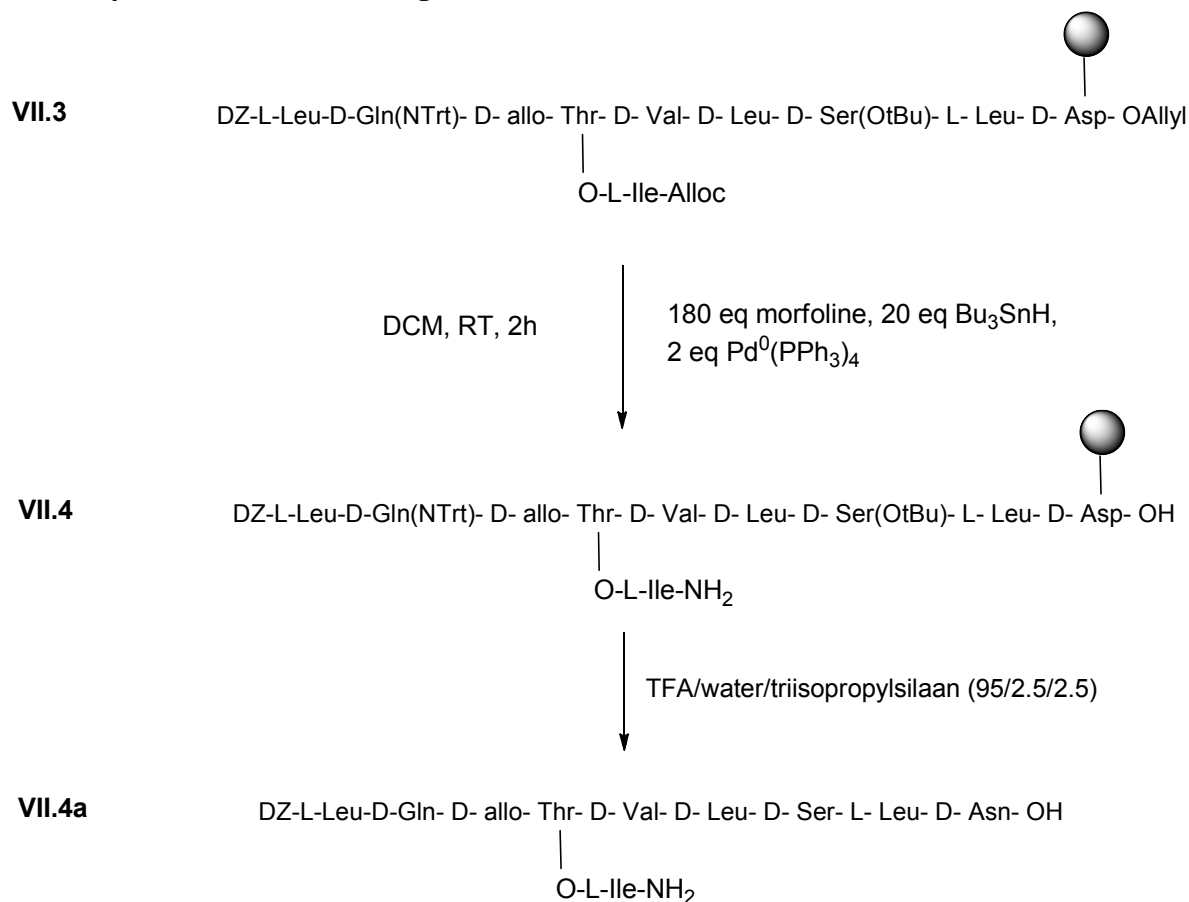
LC-MS ((75-100% in 15 minuten op C18-kolom):

retentietijd	massa	interpretatie
6.019	1081.6	[V.2a+H] ⁺
8.453	1221.6	zijproduct
9.939	1278.7	[V.3a1+H] ⁺
11.022	1278.7	[V.3a2+H] ⁺

Tabel 9.33

Er is amper nog beginproduct over. Daarnaast ziet men dat men nu dubbel zoveel van de tweede diastereomeer heeft.

9.28 Allyl- en Alloc ontscherming van VII.3



Figuur 9. 28 Allyl- en Alloc-ontscherming

80 mg gedroogd hars VII.3 wordt in een reactor gebracht met 600 μ l *moist*(= niet gedroogd) DCM en het geheel wordt onder argon gezet. Hierbij wordt 300 μ l morfoline(180 eq; 3.456 mmol), 110 μ l

Bu₃SnH (20eq; 0.384 mmol) en 44.4 mg Pd⁰(PPh₃)₄ (2 eq; 0.0384 mmol) en 600 µl DCM gebracht. De reactor wordt gespoeld met argon, afgeschermd van licht en twee uur geschud bij kamertemperatuur. Hierna wordt overtollig solvent en reagentia door de filter geblazen en intensief gewassen met 3*DCM, 3*DMF, 3*MeOH en 3* DCM.

Om te controleren of het reactieproduct is gevormd, wordt een proefafsplitsing uitgevoerd op VII.4 waarna LC-MS wordt uitgevoerd op het afgesplitste product. Hieruit blijkt dat de Allyl- en Alloc ontscherming succesvol is.

Analysedata:

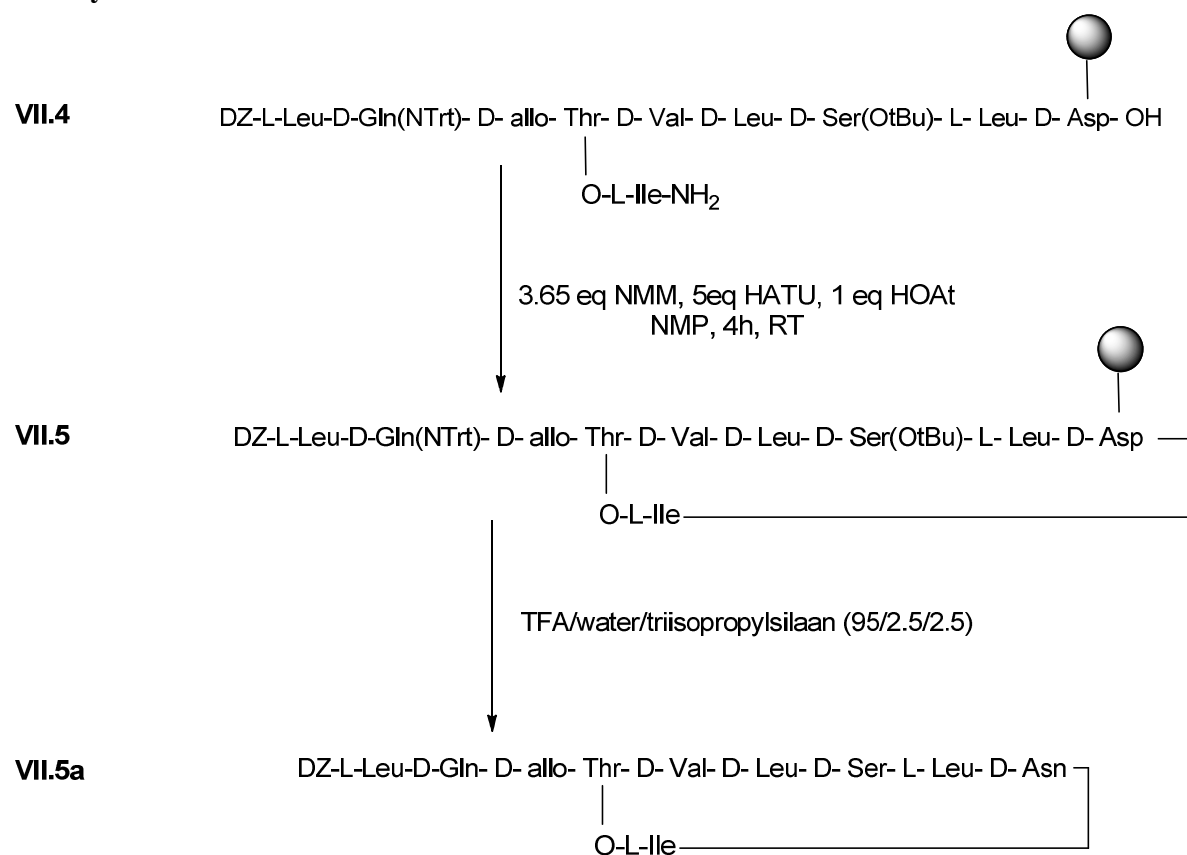
Moleculair gewicht: 1154.44 g/mol

LC-MS ((0-100% in 15 minuten op C18-kolom):

retentietijd	massa	interpretatie
16.160	1154.7	[VII.4a1+H] ⁺
16.251	1154.7	[VII.4a2+H] ⁺

Tabel 9.34

9.29 Cyclisatie van VII. 4



Figuur 9. 29 Cyclisatie van VII.4

80 mg van het hars VII.4 word gewassen met 2*1.5 ml NMP en onder argon gezet. Een oplossing van 8 µl NMM (3.65 eq; 0.07008 mmol), 36.5 mg HATU (5 eq; 0.096 mmol) en 2.6 mg HOAt (1 eq; 0.0192 mmol) in 1 ml NMP wordt toegevoegd. De reactor wordt 4 uur geschud bij kamertemperatuur. Hierna wordt het overtollige solvent en reagentia afgefiltreerd en het product wordt gewassen met 3*1.5 ml NMP, 3*1.5 ml MeOH en 3*1.5 ml DCM.

Om te controleren of het reactieproduct is gevormd, wordt een proefafsplitsing uitgevoerd op VII.5 waarna LC-MS wordt uitgevoerd op het afgesplitste product. Hieruit blijkt dat merendeel van VII.4 gecycliseerd werd.

Analysedata:

Moleculair gewicht: 1136.42 g/mol

LC-MS (75-100% in 15 minuten op C18-kolom):

retentietijd	massa	interpretatie
11.996	1136.7	[VII.5a+H] ⁺
12.403	1136.7	[VII.5a+H] ⁺
13.091	1136.7	[VII.5a+H] ⁺

Tabel 9.35

9.30 Afsplitsing product en zuivering VII.5a

Om product af te splitsen van het hars wordt de ongeveer 70 mg resin in contact gebracht met 1 ml van een oplossing die bestaat uit: TFA (95%, 950 µl), triisopropylsilaan (2.5%, 25 µl) en gedemineraliseerd water (2.5 %,25 µl). De reactor wordt een uur geschud bij kamertemperatuur. Daarna wordt de vaste drager gewassen met TFA (~1ml) en filtraat wordt opgevangen in een centrifugebuis en wordt droog geblazen met stikstof via een pasteurpipet. De afsplitsing wordt herhaald waarbij het filtraat wordt opgevangen in dezelfde centrifugebuis.

Om een restant NMP te verwijderen, werd het staal ook gelyofiliseerd.

Hierna wordt koude MTBE toegevoegd en 5 minuten gecentrifugeerd bij 5°C. De MTBE met de hierin opgeloste onzuiverheden wordt gedecanteerd. Het centrifuge proces wordt tweemaal herhaald. Hierna wordt 53.6 mg van een bruin-witte neerslag bekomen. LC-MS wordt opgenomen. Via HPLC worden de afzonderlijke fracties gecollecteerd.

Analysedata:

Moleculair gewicht: 1136.42 g/mol

LC-MS ((75-100% in 15 minuten op C18-kolom):

retentietijd	Massa	interpretatie
11.849	1136.7	[VII.5a1+H] ⁺
12.241	1136.7	[VII.5a2+H] ⁺
12.939	1136.7	[VII.5a3+H] ⁺

Tabel 9.36

HPLC ((75-100% in 15 minuten op C18(2)-kolom):

retentietijd	interpretatie
14.100	VII.5a1
14.951	VII.5a2
15.589	VII.5a3

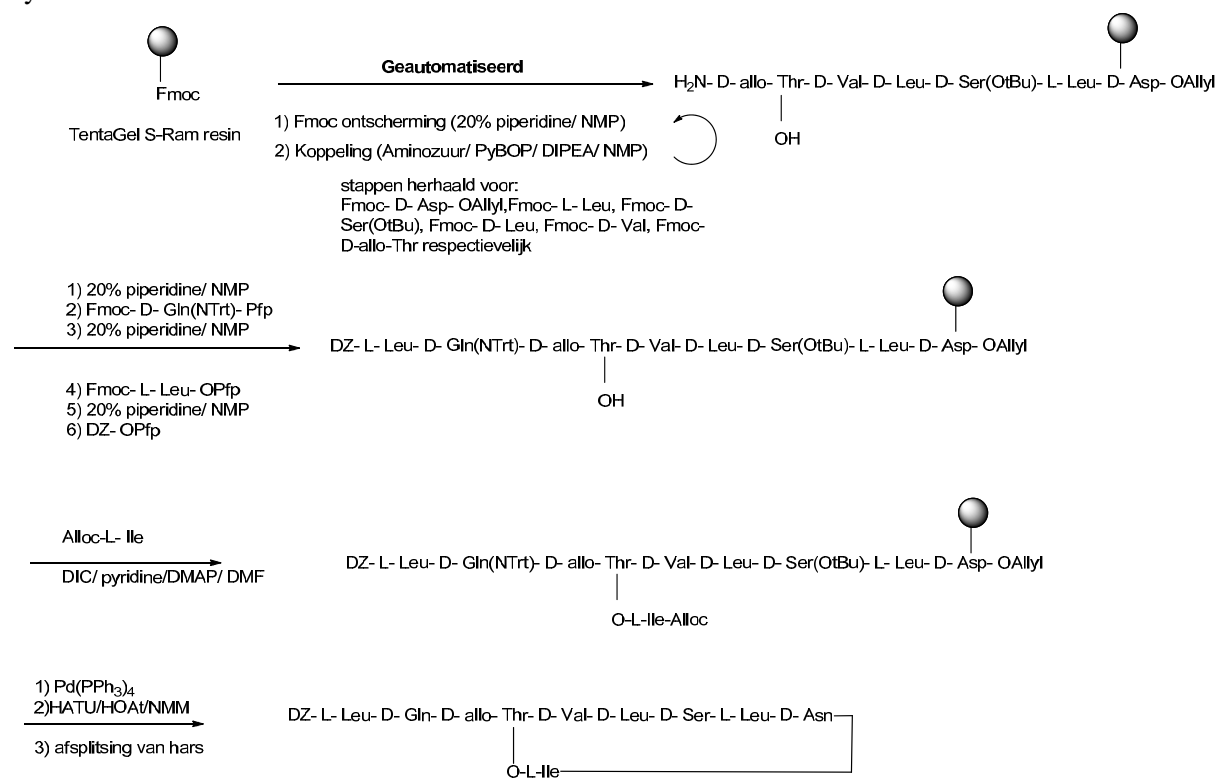
Tabel 9.37

Hoofdstuk 10: Conclusie, discussie en perspectieven

Pseudodesmine A is een natuurproduct dat antimicrobiële activiteit vertoont tegen Gram positieve bacteriën, waaronder een aantal stammen zoals MRSA (methicilline resistente *Staphylococcus aureus*) en VRE (vancomycine resistente *Enterococcus*) die resistent zijn tegen klassieke antibiotica. Het veronderstelde mechanisme van de biologische activiteit is verbonden met de capaciteit van dit peptide om transmembraan poriën te vormen. Met NMR onderzoek werd vastgesteld dat deze moleculen zelfassociëren in apolaire solventen. Een verklarend model werd opgesteld voor de vorming van een supramoleculaire structuur in apolair milieu wat gekoppeld kan worden aan de vorming van poriestructuren in het celmembraan.

In het licht van de kleine beschikbare hoeveelheden van het natuurlijke materiaal, is het voor verder onderzoek zeer interessant om een synthese voor dit soort verbindingen te ontwikkelen. Dit is dan ook het doel van deze masterscriptie. Eenmaal ontwikkeld laat de strategie ook toe om analogen te synthetiseren, waarbij het effect op het zelfassociërend gedrag en de biologische activiteit kunnen worden waargenomen en dus het opgestelde model kan getoetst worden. Daarnaast kunnen deze naar de toekomst toe ook getest worden als potentieel antibioticum.

In dit werk werd een syntheseroute ontwikkeld op vaste drager voor het maken van pseudodesmine A analogen. Deze route, geschetst in figuur 10.1, werd ontwikkeld en geoptimaliseerd op het TentaGel S Ram hars. De sleutelstappen omvatten het vormen van de depsipeptidebinding naar een Thr residu dat onbeschermde wordt ingevoerd en de gelijktijdige palladium gekatalyseerde ontscherming van het N-Alloc beschermde Ile en het C-Allyl beschermde Asp residu, gevolgd door de uiteindelijke cyclisatie.

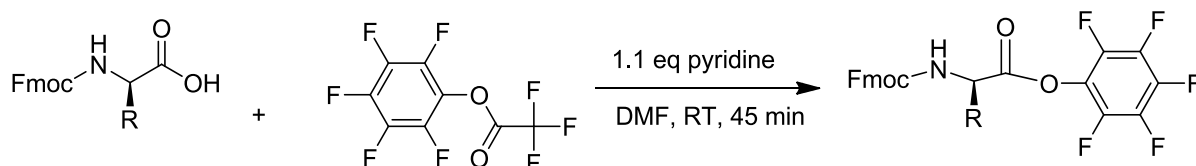


Figuur 10.1 Geoptimaliseerde route voor de synthese van een pseudodesmine A analoog

Er werd gekozen voor een zijketen immobilisatie van D-Asp8 wat uiteindelijk leidt tot een D-Asn8/D-Ser8 analoog van de beoogde molecule. Een verdere vereenvoudiging werd doorgevoerd op het niveau van de lipofiele staart waar decaanzuur ingevoerd werd in plaats van het enantiomeer zuivere (*R*)-hydroxydecaanzuur. Na initiële aanmaak van de D-allo-Thr(OH)-D-Val-D-Leu-D-Ser(OtBu)-L-Leu-D-Asp-OAllyl sequentie via klassieke vaste fase peptide synthese, werden de residuen D-Gln, L-Leu en de finale hydroxydecaanzuur staart ingevoerd met behulp van vooraf bereide pentafluorofenyl derivaten, dit teneinde koppeling aan de N-terminus te verzekeren en ongewenste koppeling op de vrije Thr-OH te voorkomen. Vervolgens diende het resterende N-Alloc beschermde L-Ile residu via een esterbinding ingevoerd te worden.

De moeilijkste stap bleek net het maken van deze esterbinding te zijn. De aanvankelijk condities gaven aanleiding tot epimerisatie ter hoogte van de C^α van Ile9 met vorming van twee diastereomeren als gevolg. Deze twee diastereomeren werden gescheiden met HPLC. Met de geoptimaliseerde condities kan men selectief meer van het ene diastereomeer maken. Alles wijst erop dat dit het diastereomeer is met de onveranderde stereochemie. Als reagens wordt gebruik gemaakt van pyridine dat minder basisch is dan DMAP en dus minder epimerisatie veroorzaakt. Het is niet volledig uit te sluiten dat er ook nog gedeeltelijke epimerisatie doorgaat met deze geoptimaliseerde condities, maar de resultaten tonen wel aan dat er een duidelijk verschil is.

Het is verder mogelijk gebleken om de koppeling van de eerste 6 aminozuren te automatiseren. Dit levert een aanzienlijke tijds winst op. Hoewel de daaropvolgende koppeling via de Pfp-esters zeer efficiënt verloopt, zijn de vereiste Pfp-esters van D-aminozuren niet commercieel beschikbaar zodat zij aangemaakt dienden te worden (zie figuur 10.2.)



Figuur 10.2 Synthese van de Pfp-esters

Vermits het secundaire alcohol van threonine niet erg reactief bleek, kan daarom naar de toekomst toe overwogen worden om de koppeling van Leu, Gln en decaanzuur ook geautomatiseerd uit te voeren met behulp van standaard beschermde aminozuren en koppelingsreagentia.

Ook het vereiste Alloc-Ile derivaat was niet commercieel beschikbaar en diende gesynthetiseerd te worden. Dit verliep niet zonder moeite aangezien dit slechts na verschillende pogingen succesvol kon gebeuren. In dit werk kon een verklaring geformuleerd worden voor het falen van de initiële beschermingspogingen.

Om de uiteindelijk cyclisatie te kunnen uitvoeren, werden de Allyl- en Alloc-beschermgroepen selectief ontschermd waarbij deze perfect orthogonaal bleken te zijn met de overige gebruikte zijketen beschermende groepen. De condities voor de daaropvolgende on-hars cyclisatie bleken efficiënt en reproduceerbaar te zijn. Een minimale epimerisatie trad ook op in deze stap.

Na afsplitsing en zuivering werd de moleculaire structuur bevestigd met de gebruikelijke NMR-analysetechnieken (1D-¹H, COSY, TOCSY en HSQC). Bovendien wordt vastgesteld dat deze conformationeel gezien sterk op pseudodesmine A lijkt, maar wel een zekere conformationele labiliteit

vertoont. Dit manifesteert zich het duidelijkst ter hoogte van het Asn8 residu. Met behulp van DOSY-metingen worden de transversale diffusiecoëfficiënt berekend waaruit, bij benadering, een hydrodynamische radius r_H in polaire solventen van 7.25 Å afgeleid kon worden. Interessant genoeg werd vastgesteld dat het synthetische analoog niet in chloroform oplost, waarin zelfassociatie bij pseudodesmine A werd bestudeerd. In een andere apolaire solvent (dioxaan) lost het analoog wel op, maar kon geen zelfassociatie vastgesteld worden bij concentraties waarvoor dit wel zeer sterk het geval is bij pseudodesmine A. Hieruit kunnen we besluiten dat het zelfassociatiegedrag sterk wordt benadeeld door het invoeren van één van deze twee of door de combinatie van beide modificaties.

Vermoedelijk is vooral D-Ser8 belangrijk voor de stabiliteit en het gedrag van de molecule. De andere modificatie bevindt zich op de zeer flexibele lipofiele staart en wordt verondersteld minder belangrijk te zijn. Het D-Ser8 residu is waarschijnlijk wel zeer belangrijk omdat andere verwante natuurproducten op deze plaats telkens dit residu hebben. Vermoedelijk is het primair alcohol van Ser8 betrokken in een (aantal) specifieke interactie(s) zoals bijvoorbeeld waterstofbrugvorming met een ander residu in het supramoleculair complex. Bij een vervanging van de alcoholgroep door een amidegroep in de zijketen wordt dit interactiepatroon vermoedelijk verstoord.

Perspectieven

De finale molecule die bekomen werd in de hier geschetste synthese verschilt zoals eerder aangehaald op twee plaatsen van pseudodesmine A: ze bevat een D-Asn8 modificatie en vertoont een lichtjes gewijzigde lipofiele staart. Naar de toekomst toe is het uiteraard interessant om deze toegevingen weg te werken, zeker omdat deze twee modificaties resulteren in een product dat niet langer zelfassocieert. Koppeling van enantiomeer zuiver β -hydroxydecaanzuur zal vermoedelijk geen probleem vormen en kan bekomen worden via een elders beschreven omkristallisatieprocedure. Een mogelijk alternatief is het inbouwen van 3-oxodecaanzuur, gevolgd door een selectieve reductie van het β -keton.

De incorporatie van het originele D-Ser8 residu ligt met deze synthese strategie iets moeilijker. Dit vereist dat Ser8 gekoppeld wordt via de zijketen. Een mogelijke oplossing kan bestaan uit de immobilisatie van de alcoholfunctie van D-Ser8 op een chlorotriyl of een Merrifield hars.

Bibliografie

1. Nybroe, O. and J. Sorensen, *Production of cyclic lipopeptides by fluorescent pseudomonads. pseudomonas*, 2004. **3**: p. 147-162.
2. Sinnaeve, D., *Gevorderde Structuuranalyse van een Recent Geïsoleerd Natuurproduct met Behulp van NMR Spectroscopie* 2005, licentiaatsthesis, Universiteit Gent.
3. Sinnaeve, D., et al., *Structure and X-ray conformation of pseudodesmins A and B, two new cyclic lipodepsipeptides from Pseudomonas bacteria*. Tetrahedron, 2009. **65**(21): p. 4173-4181.
4. Sinnaeve, D., *Characterisation of the structure and self-assembly of a small cyclic peptide. An analysis using NMR spectroscopy, diffusion and heteronuclear relaxation measurements*. 2010, PhD thesis, Universiteit Gent.
5. Sinnaeve, D., et al., *The Solution Structure and Self-Association Properties of the Cyclic Lipodepsipeptide Pseudodesmin A Support Its Pore-Forming Potential*. Chemistry-a European Journal, 2009. **15**(46): p. 12653-12662.
6. Malinowska, A., *Solid Phase Synthesis of cyclolipodepsipeptide*, in *Laboratory for Organic and Biomimetic Chemistry*. 2009, Universiteit Gent.
7. Zasloff, M., *Antimicrobial peptides of multicellular organisms*. Nature, 2002. **415**(6870): p. 389-395.
8. Brogden, K.A., *Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?* Nature Reviews Microbiology, 2005. **3**(3): p. 238-250.
9. Reddy, K.V.R., R.D. Yedery, and C. Aranha, *Antimicrobial peptides: premises and promises*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2004. **24**(6): p. 536-547.
10. Montesinos, E., *Antimicrobial peptides and plant disease control*. Fems Microbiology Letters, 2007. **270**(1): p. 1-11.
11. Raaijmakers, J.M., et al., *Natural functions of lipopeptides from Bacillus and Pseudomonas: more than surfactants and antibiotics*. Fems Microbiology Reviews, 2010. **34**(6): p. 1037-1062.
12. Roongsawang, N., K. Washio, and M. Morikawa, *Diversity of Nonribosomal Peptide Synthetases Involved in the Biosynthesis of Lipopeptide Biosurfactants*. International Journal of Molecular Sciences, 2011. **12**(1): p. 141-172.
13. Raaijmakers, J.M., I. de Bruijn, and M.J.D. de Kock, *Cyclic lipopeptide production by plant-associated Pseudomonas spp.: Diversity, activity, biosynthesis, and regulation*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2006. **19**(7): p. 699-710.
14. Gross, H. and J.E. Loper, *Genomics of secondary metabolite production by Pseudomonas spp*. Natural Product Reports, 2009. **26**(11): p. 1408-1446.
15. Hutchison, M.L., M.A. Tester, and D.C. Gross, *Role of biosurfactant and ion channel-forming activities of syringomycin in transmembrane ion flux - A model for the mechanism of action in the plant-pathogen interaction*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1995. **8**(4): p. 610-620.
16. Bender, C.L., F. Alarcon-Chaidez, and D.C. Gross, *Pseudomonas syringae phytotoxins: Mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1999. **63**(2): p. 266-+.
17. Coraiola, M., et al., *WLIP and tolaasin I, lipodepsipeptides from Pseudomonas reactans and Pseudomonas tolaasii, permeabilise model membranes*. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 2006. **1758**(11): p. 1713-1722.
18. Lo Cantore, P., et al., *Biological characterization of white line-inducing principle (WLIP) produced by Pseudomonas reactans NCPPB1311*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2006. **19**(10): p. 1113-1120.
19. Mortishiresmith, R.J., et al., *Determination of the structure of an extracellular peptide produced by the mushroom saprotroph Pseudomonas reactans*. Tetrahedron, 1991. **47**(22): p. 3645-3654.
20. AUSTIN, R., M., Jr., et al., *Antibiotics from bacteria isolated from amphibian skin*. 2002.
21. Burke, T.R., M. Knight, and B. Chandrasekhar, *Solid-phase synthesis of viscosin, a cyclic depsipeptide with antibacterial and antiviral properties*. Tetrahedron Letters, 1989. **30**(5): p. 519-522.

22. Stawikowski, M. and P. Cudic, *A novel strategy for the solid-phase synthesis of cyclic lipodepsipeptides*. Tetrahedron Letters, 2006. **47**(48): p. 8587-8590.
23. Davies, J.S., *The cyclization of peptides and depsipeptides*. Journal of Peptide Science, 2003. **9**(8): p. 471-501.
24. Socha, A.M., et al., *Diversity-oriented synthesis of cyclic acyldepsipeptides leads to the discovery of a potent antibacterial agent*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2010. **18**(20): p. 7193-7202.
25. Alexander, *Antiinfective Lipopeptides* 2008.
26. Lopez-Macia, A., et al., *Synthesis and structure determination of kahalalide F*. Journal of the American Chemical Society, 2001. **123**(46): p. 11398-11401.
27. Kuisle, O., E. Quinoa, and R. Riguera, *A general methodology for automated solid-phase synthesis of depsides and depsipeptides. Preparation of a valinomycin analogue*. Journal of Organic Chemistry, 1999. **64**(22): p. 8063-8075.
28. Sarabia, F., C. Samy, and C. Garcia-Ruiz, *Solid Phase Synthesis of Globomycin and SF-1902 A5* J. Org. Chem, 2011.
29. Romanovskis, P. and A.F. Spatola, *Preparation of head-to-tail cyclic peptides via side-chain attachment: Implications for library synthesis*. Journal of Peptide Research, 1998. **52**(5): p. 356-374.
30. Derbal, S., et al., *On resin amino acid side chain attachment strategy for the head to tail synthesis of new glutamine containing gramicidin-S analogs and their antimicrobial activity*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2010. **20**(19): p. 5701-5704.
31. Monroc, S., et al., *Improvement of cyclic decapeptides against plant pathogenic bacteria using a combinatorial chemistry approach*. Peptides, 2006. **27**(11): p. 2575-2584.
32. Seo, H. and D. Lim, *Total Synthesis of Halicyclindramide A*. Journal of Organic Chemistry, 2009. **74**(2): p. 906-909.
33. Hamze, A., J. Martinez, and J.F. Hernandez, *Solid-phase synthesis of arginine-containing peptides and fluorogenic substrates using a side-chain anchoring approach*. Journal of Organic Chemistry, 2004. **69**(24): p. 8394-8402.
34. Kochi, M., Bact. Proc. , 1951: p. 29-30
35. Mouls, L., et al., *O-N-Acyl migration in N-terminal serine-containing peptides: mass spectrometric elucidation and subsequent development of site-directed acylation protocols*. Tetrahedron Letters, 2004. **45**(6): p. 1173-1178.
36. Mauger, A.B. and O.A. Stuart, *Slow O,N-acyl shift in an actinomycin-related peptide lactone*. International Journal of Peptide and Protein Research, 1987. **30**(4): p. 481-488.
37. Burke, T.R. and B. Chandrasekhar, *Preparative reversed-phase high-performance liquid-chromatography in the synthesis of viscosin, a cyclic depsipeptide*. Journal of Chromatography, 1989. **484**: p. 293-298.
38. Guibe, F., *Allylic protecting groups and their use in a complex environment - Part II: Allylic protecting groups and their removal through catalytic palladium pi-allyl methodology*. Tetrahedron, 1998. **54**(13): p. 2967-3042.
39. Verzele, D., *Development of Miniature b(-HLH)-ZIP Peptidosteroid Conjugates as New Transcription Factor Models*. 2009, PhD thesis, universiteit Gent.
40. Merrifield, R.B., *Solid phase peptide synthesis .I. Synthesis of a tetrapeptide*. Journal of the American Chemical Society, 1963. **85**(14): p. 2149-&.
41. Merck Novabiochem, *Peptide Synthesis*. 2008/2009.
42. Lloyd-Williams, P., F. Albericio, and E. Giralt, *Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins*. 1997, Barcelona, Spain.
43. *rapp-polymer catalogue (<http://www.rapp-polymer.com>)*.
44. Isidro-Llobet, A., M. Alvarez, and F. Albericio, *Amino Acid-Protecting Groups*. Chemical Reviews, 2009. **109**(6): p. 2455-2504.
45. Kragol, G. and L. Otvos, *Orthogonal solid-phase synthesis of tetramannosylated peptide constructs carrying three independent branched epitopes*. Tetrahedron, 2001. **57**(6): p. 957-966.
46. Karskela, T., et al., *Solid-supported synthesis of bicyclic peptides containing three parallel peptide chains*. European Journal of Organic Chemistry, 2003(9): p. 1687-1691.

47. Chamorro, C., et al., *A general approach for the non-stop solid phase synthesis of TAC-scaffolded loops towards protein mimics containing discontinuous epitopes*. Chemical Communications, 2009(7): p. 821-823.
48. Dangles, O., et al., *Selective cleavage of the allyl and allyloxycarbonyl groups through palladium-catalyzed hydrostannolysis with tributyltin hydride - Application to the selective protection-deprotection of amino-acid derivatives and in peptide-synthesis*. Journal of Organic Chemistry, 1987. **52**(22): p. 4984-4993.
49. Benoiton, N.L. and F.M.F. Chen, *2-alkoxy-5(4H)-oxazolones from N-alkoxycarbonylamino acids and their implication in carbodiimide-mediated reactions in peptide-synthesis*. Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie, 1981. **59**(2): p. 384-389.
50. Benoiton, N.L., *2-alkoxy-5(4H)-oxazolones and the enantiomerization of N-alkoxycarbonylamino acids*. Biopolymers, 1996. **40**(2): p. 245-254.
51. Albericio, F., et al., *Use of onium salt-based coupling reagents in peptide synthesis*. Journal of Organic Chemistry, 1998. **63**(26): p. 9678-9683.
52. Hancock, W.S. and J.E. Battersby, *New micro-test for detection of incomplete coupling reactions in solid-phase peptide-synthesis using 2,4,6-trinitrobenzene-sulphonic acid*. Analytical Biochemistry, 1976. **71**(1): p. 260-264.
53. Madder, A., et al., *A novel sensitive colorimetric assay for visual detection of solid-phase bound amines*. European Journal of Organic Chemistry, 1999(11): p. 2787-2791.
54. Caroen, J. and J. Van der Eycken, *A sensitive and practical colorimetric test for polymer-supported hydroxyl and thiol groups*. Tetrahedron Letters, 2009. **50**(1): p. 41-44.
55. Shibata, N., et al., *Electrophilic Sulfenylation in a Stereocontrolled Synthesis of Protected (2F,3R)-3-Mercaptoaspartic Acid from L-Aspartic Acid*. Tetrahedron Letters, 1996. **52**(39): p. 12839-12852.
56. Isidro-Llobet, A., et al., *Fmoc-2-Mercaptobenzothiazole, for the Introduction of the Fmoc Moiety Free of Side-Reactions*. Biopolymers, 2007. **88**.
57. Rew, Y. and M. Goodman, *Solid-Phase Synthesis of Amine-bridged Cyclic Enkephalin Analogues via On-Resin Cyclization Utilizing the Fukuyama-Mitsunobu Reaction*. J. Org. Chem, 2002. **67**: p. 8820-8826.
58. Hu, A.F., et al., *Benzyl 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl carbonate*. Acta Crystallographica Section E-Structure Reports Online, 2008. **64**: p. O1326-U2462.
59. Kisfaludy, L. and I. Schon, *Preparation and applications of pentafluorophenyl esters of 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino-acids for peptide-synthesis*. Synthesis-Stuttgart, 1983(4): p. 325-327.
60. Green, M. and J. Berman, *Preparation of pentafluorophenyl esters of Fmoc protected amino-acids with pentafluorophenyl trifluoroacetate*. Tetrahedron Letters, 1990. **31**(41): p. 5851-5852.
61. Kunishima, M., et al., *4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methyl-morpholinium chloride: An efficient condensing agent leading to the formation of amides and esters*. Tetrahedron, 1999. **55**(46): p. 13159-13170.
62. Kunishima, M., et al., *Synthesis and characterization of 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride*. Tetrahedron Letters, 1999. **40**(29): p. 5327-5330.
63. Kaminski, Z.J., et al., *N-triazinylammonium tetrafluoroborates. A new generation of efficient coupling reagents useful for peptide synthesis*. Journal of the American Chemical Society, 2005. **127**(48): p. 16912-16920.
64. Gilon, C., Y. Klausner, and A. Hassner, *Novel method for the facile synthesis of depsipeptides*. Tetrahedron Letters, 1979(40): p. 3811-3814.
65. Sieber, P. and B. Riniker, *Protection of carboxamide functions by the trityl residue - application to peptide-synthesis*. Tetrahedron Letters, 1991. **32**(6): p. 739-742.
66. Nielsen, J. and L.O. Lyngso, *Combinatorial solid-phase synthesis of balanol analogues*. Tetrahedron Letters, 1996. **37**(46): p. 8439-8442.
67. Yang, Y., et al., *Aspartimide Formation in Base-driven 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Chemistry*. Tetrahedron Letters, 1994. **35**(52): p. 9689-9692

68. Burke, T.J., B. Chandrasekhar, and M. Knight, *Analogs of Viscosin and their uses*. 1992.
69. Lekkerkerker, H.N.W. and J.K.G. Dhont, *On the calculation of the self-diffusion coefficient of interacting Brownian particles*. *Journal of Chemical Physics*, 1984. **80**(11): p. 5790-5792.
70. Lide, D.R., "*Handbook of Chemistry and Physics 90th edition*". 2009-2010, CRC Press: Boca Raton.

Towards the Efficient Synthesis of Pseudodesmin A Analogues as a Means to Investigate Supramolecular Structure Function Relationship

M. De Vleeschouwer^{ab,*}, J. Van den Begin^a, D. Sinnaeve^b, A. Madder^a, J.C. Martins^b

^a Laboratory for Organic and Biomimetic chemistry, Department of Organic Chemistry, Faculty of Sciences, Ghent University, Krijgslaan 281 S4, B-9000 Gent, Belgium

^b NMR and Structure Analysis Unit, Department of Organic Chemistry, Faculty of Sciences, Ghent University, Krijgslaan 281 S4, B-9000 Gent, Belgium

Pseudodesmin A is a cyclic lipodepsipeptide (CLP) which possesses antibacterial activity against Gram positive bacteria, including MRSA. A rapid and efficient Fmoc solid-phase synthesis of CLP analogues of pseudodesmin A is developed. Our synthetic route starts with side-chain attachment of the first amino acid. Stepwise solid-phase synthesis leads to the linear peptide, which is N-terminally equipped with a lipid tail prior to depsipeptide bond formation and on-resin head-to-tail cyclization. The obtained analogues are subjected to characterization by NMR, to investigate the supramolecular self-assembly in a hydrophobic environment.

Introduction

Pseudodesmin A is produced by *Pseudomonas* bacteria living in the mucous layer of the black belly salamander. This molecule has demonstrated moderate antibacterial and antiviral activity. Most interestingly it also shows activity against some antibiotic resistant strains such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE). Recently, the chemical and conformational structure of pseudodesmin A has been determined (**1**) through X-Ray diffraction and NMR spectroscopic analysis (Figure 1) [1]. In this way pseudodesmin A was identified as a new member of the viscosin group of antimicrobial peptides (AMPs).

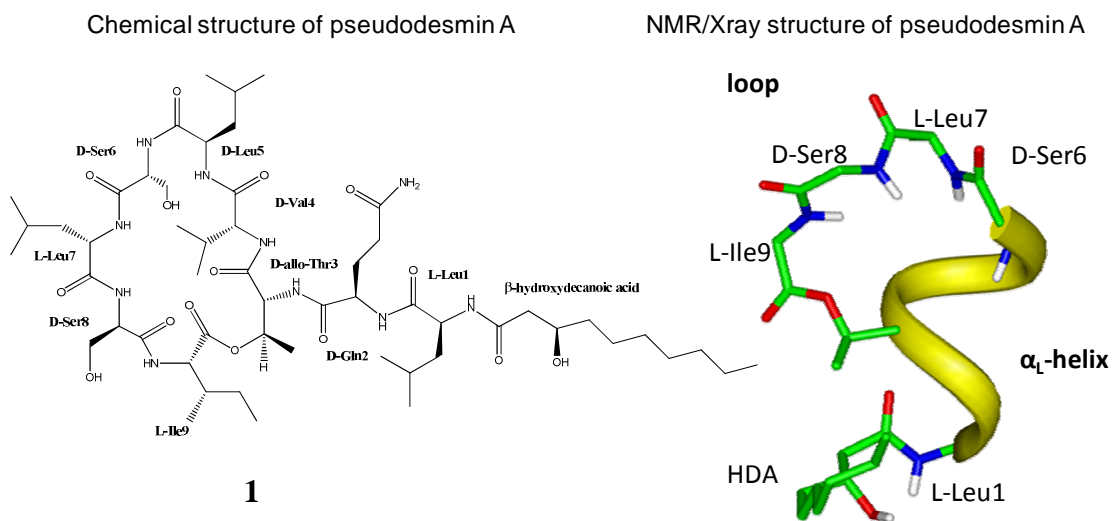


Figure 1. Chemical structure and conformation of pseudodesmin A

The biological activity of many CLPs, including some of the members of the viscosin group, is assumed to be caused by transmembrane pore formation. Due to their moderate size (~1 nm) compared to the typical membrane thickness (~3-4 nm), a supramolecular self-assembly process has been proposed based on translational diffusion measurements on pseudodesmin. [2]

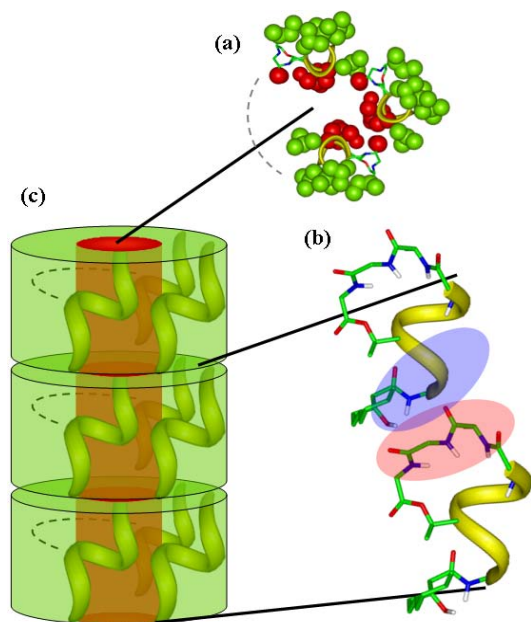


Figure 2. Illustration of the proposed model of self-association.[2]

In this model two distinct intermolecular interactions are important. First of all, pseudodesmin A possesses an amphipathic character, as illustrated in Figure 2a where the hydrophilic and hydrophobic sides of the molecule are colored red and green respectively. In an apolar solvent or membrane environment, one can expect that pseudodesmin A molecules arrange their hydrophilic surfaces towards each other while the hydrophobic surfaces extend themselves outward to minimize energetically unfavorable interactions (Figure 2a). This principle is well known for AMPs in general.[3] However this aggregation alone is not sufficient to span the membrane bilayer and also does not explain the strong increase in size observed in apolar solvents.

Longitudinal aggregation is caused by a different intermolecular interaction. The free amide groups at the N-terminal side of the helix can form intermolecular hydrogen bonds with the free carbonyl groups at the C-terminal side of the helix or in the loop (Figure 2b). Both processes combined, results in a large supramolecular structure with a hydrophilic interior and a hydrophobic exterior. (Figure 2c)

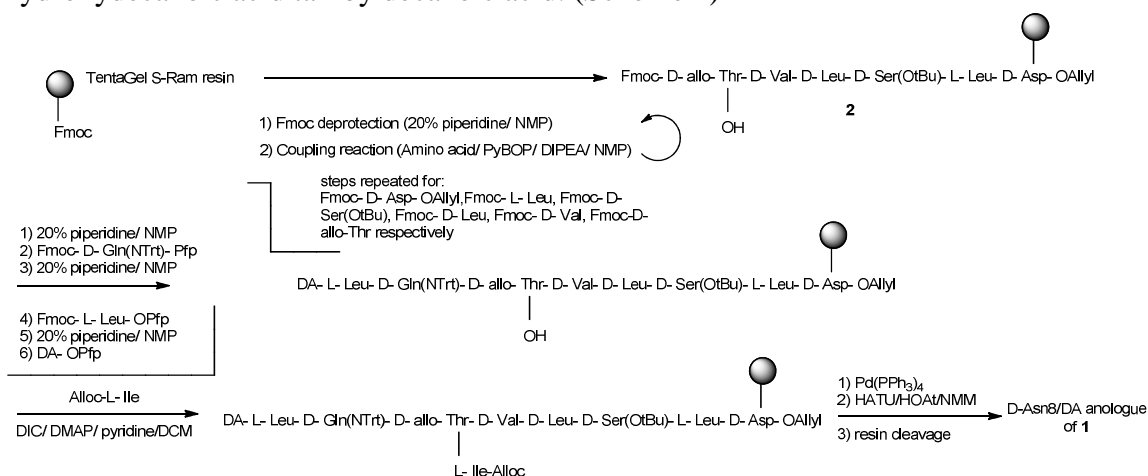
It is clear that the development of a synthesis strategy for pseudodesmin A variants will contribute to a more fundamental understanding of the structure-function relationship of the viscosin group of CLPs. New compounds can be screened for their activity against pathogens, while the crucial parameters that are responsible for self-association in apolar environment can be identified. This will also allow to further correlate the capacity for self-association with the biological activity.

Synthesis Route

A synthetic route for viscosin, which can be considered as the D-Glu2/L-Leu5 analogue of **1**, was already reported in 1989. [4] The procedure starts with the solid-phase synthesis of a linear precursor that already contains the ester bond, followed by ring closure through the formation of an amide bond in solution. However, the authors describe a series of problems related to side reactions and purification difficulties when following this strategy [5]. A further disadvantage of the described methodology is the need for high dilution conditions during the final cyclisation in order to prevent intermolecular oligomerization.

In view of the reported difficulties, we chose to develop a new strategy that is partially based on the more recent work of Stawikowski en Cudic [6], which permits a more straightforward synthesis and purification. This procedure makes use of a side chain attachment of the first amino acid to the solid support. After synthesis of the linear precursor, this finally results in an on-resin head-to-tail cyclization, benefitting from a pseudo-dilution effect.

As to allow more straightforward side-chain attachment, it was decided to replace the D-Ser8 residue by a D-Asp8 residue. As final cleavage from the TentaGel S Ram resin results in a carboxamide, this ultimately leads to a D-Asn8/D-Ser8 analogue of pseudodesmin A. For reasons of synthetic simplicity we further chose to replace the (*R*)-hydroxydecanoic acid tail by decanoic acid. (Scheme 1)



Scheme 1. Synthetic plan towards analogues of pseudodesmin A. (DA=decanoic acid)

The synthesis starts with a side-chain attachment of the Fmoc-D-Asp-OAllyl residue to an acid labile Rink amide based solid support. The linear precursor **2** was achieved by using standard Fmoc deprotection (piperidine/NMP) and standard coupling procedures (PyBOP/DIPEA/NMP). The last building block in **2**, Fmoc-D-allo-Thr, was coupled with an unprotected side-chain, as this is the branch point to which later the ester bond will be formed.

In the synthesis of depsipeptides it is well-known that exposure to basic conditions can lead to an undesired O→N-acylshift. [7, 8] To avoid this, the subsequent building blocks will be coupled prior to ester bond formation. To avoid acylation of the unprotected D-allo-Thr hydroxyl group, coupling was achieved using the pentafluorophenyl esters (Pfp) of the amino acids, which leads to fast reaction with amines but slow reaction with alcohols.

After final N-terminal derivatisation with the coupling of decanoic acid, Alloc-L-Ile is coupled through ester bond formation with DIC/DMAP. This depsipeptide bond formation proved to be far from straightforward. The need for long reaction times induced epimerization at the α -position of Ile9. Through substitution of catalytic DMAP by excess pyridine, reaction times decreased significantly and formation of the desired diastereomer was favored.

The orthogonal Alloc and Allyl protecting groups needed to be removed prior to ring closure. Simultaneous deprotection of the N-Alloc protected Ile9 and the C-Allyl protected Asp8 residue was achieved using classical Pd catalyzed deprotection conditions. [9] Finally, ring closure is performed with HATU/HOAt/NMM. [10] After resin cleavage the compound is purified via HPLC and lyophilized to remove residual volatile solvents that can potentially disrupt self-association. LC-MS and NMR confirmed respectively the correct molecular weight and structure.

Characterization by NMR

^1H and ^{13}C resonance assignment confirmed the molecular structure of the obtained pseudodesmine A variant. The chemical shift of the resonances differ only slightly from those of pseudodesmin A, indicating that the stereochemistry is conserved. For a diastereomer, one can expect that the α -protons from the backbone most likely have a significantly altered chemical shift. The similarity of the α -proton and α -carbon chemical shifts is illustrated by an overlay of the HSQC spectra of the variant and pseudodesmin A in Figure 3.

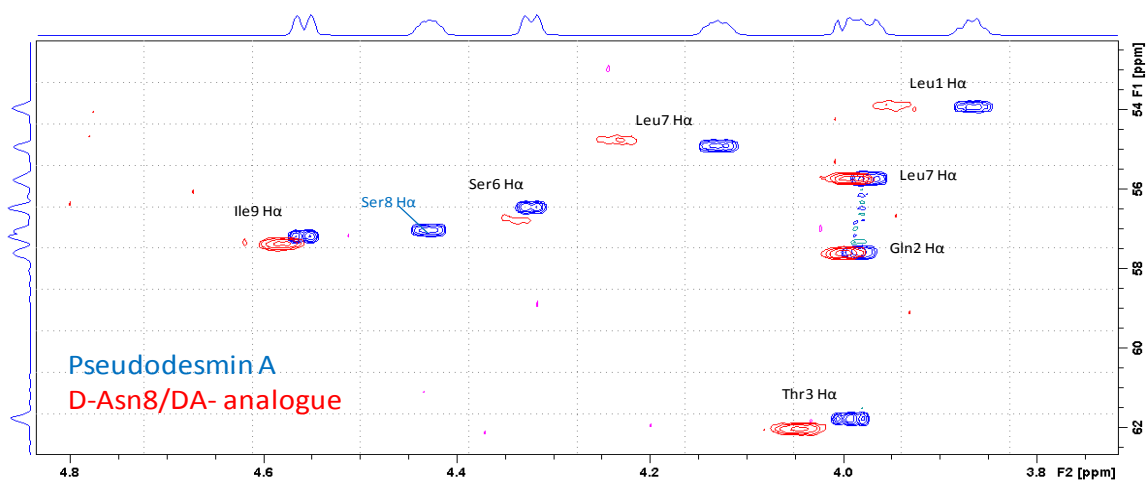


Figure 3. 2D ^1H - ^{13}C HSQC spectrum of pseudodesmin and analogue in CD_3CN solution, recorded at 16.4 T, 298K, CH^α -region.

The behavior of the variant in polar (acetonitrile) and apolar (1,4-dioxane) solvent conditions is investigated by measuring the translational diffusion coefficient D using NMR techniques. [11] The hydrodynamic radius r_H can be calculated using the Stokes-Einstein relation (1) and the known viscosity η of each solvent.

$$D = \frac{k_b T}{6\pi\eta r_H} \quad (1)$$

In a polar environment, the dimensions of the molecule are found to be almost equal to $1(7.2 \text{ \AA})$ [2] In apolar dioxane, the r_H only increases very slightly even at concentrations of 70 mM (Table 1), while for pseudodesmin A an r_H of over 30 \AA was already found at 10 mM. [12]

TABLE I. Translational diffusion coefficients and hydrodynamic radii of the synthetic variant.

Solvent	D [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	r_H [\AA]
acetonitrile: 87 mM	816.0	7.25
dioxane: 70 mM	175.0	11.17

Discussion

A viable synthesis strategy for pseudodesmin A analogues was developed, based on side-chain attachment of the first amino acid to the solid support, followed by stepwise Fmoc solid-phase synthesis of the linear peptide precursor and on-resin head-to-tail cyclisation. NMR study confirmed the molecular structure and thus the development of an efficient and successful synthesis of this type of CLP's.

Unlike pseudodesmine A, no self-association occurs in apolar solvents. This can possibly be attributed to the D-Asn8/D-Ser8 modification. Like for other members of the viscosin group a D-Ser8 residue is always conserved. The results of this work suggest therefore that Ser8 is required to stabilize the molecular conformation and to induce self-association behavior in apolar environment. The future aim is to synthesize and examine variants that do contain Ser8, in order to further understand the structure-function relationship of this group of compounds.

Acknowledgements

Jan Goeman is gratefully thanked for the LC-MS analysis of my compounds. Tim Courtin is gratefully acknowledged for performing the ¹⁹F-NMR measurements.

References

1. Sinnaeve, D., et al., *Structure and X-ray conformation of pseudodesmins A and B, two new cyclic lipodepsipeptides from Pseudomonas bacteria*. Tetrahedron, 2009. **65**(21): p. 4173-4181.
2. Sinnaeve, D., et al., *The Solution Structure and Self-Association Properties of the Cyclic Lipodepsipeptide Pseudodesmin A Support Its Pore-Forming Potential*. Chemistry-a European Journal, 2009. **15**(46): p. 12653-12662.
3. Dennison, S.R., et al., *Amphiphilic alpha-helical antimicrobial peptides and their structure/function relationships*. Protein and Peptide Letters, 2005. **12**(1): p. 31-39.
4. Burke, T.R., M. Knight, and B. Chandrasekhar, *Solid-phase synthesis of viscosin, a cyclic depsipeptide with antibacterial and antiviral properties*. Tetrahedron Letters, 1989. **30**(5): p. 519-522.
5. Burke, T.R. and B. Chandrasekhar, *Preparative reversed-phase high-performance liquid-chromatography in the synthesis of viscosin, a cyclic depsipeptide*. Journal of Chromatography, 1989. **484**: p. 293-298.
6. Stawikowski, M. and P. Cudic, *A novel strategy for the solid-phase synthesis of cyclic lipodepsipeptides*. Tetrahedron Letters, 2006. **47**(48): p. 8587-8590.
7. Mous, L., et al., *O-N-Acyl migration in N-terminal serine-containing peptides: mass spectrometric elucidation and subsequent development of site-directed acylation protocols*. Tetrahedron Letters, 2004. **45**(6): p. 1173-1178.
8. Mager, A.B. and O.A. Stuart, *Slow O,N-acyl shift in an actinomycin-related peptide lactone*. International Journal of Peptide and Protein Research, 1987. **30**(4): p. 481-488.
9. Verzele, D., *Development of Miniature b(-HLH-)ZIP Peptidosteroid Conjugates as New Transcription Factor Models*. 2009, PhD thesis, universiteit Gent.
10. Seo, H. and D. Lim, *Total Synthesis of Halicylindramide A*. Journal of Organic Chemistry, 2009. **74**(2): p. 906-909.

11. Johnson, C.S., *Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications*. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 1999. **34**(3-4): p. 203-256.
12. Sinnaeve, D., *Characterisation of the structure and self-assembly of a small cyclic peptide. An analysis using NMR spectroscopy, diffusion and heteronuclear relaxation measurements*. 2010, PhD thesis, Universiteit Gent.