

Samenvatting

Koen Buysse

Deze thesis handelt over de synthese en biologische applicaties van verstrakte analoga van de aromatische aminozuren fenylalanine, tryptofaan en histidine.

Het eerste deel van dit werk introduceert enkele algemene aspecten i.v.m. de ontwikkeling van peptidomimetica, gevolgd door een beschrijving van de verschillende doelstellingen voor deze thesis alsook een inleiding tot de biologische toepassingen van de ontwikkelde peptidomimetica.

Het tweede deel geeft een kort overzicht van de ontwikkeling van een verstrakt analoog van phenylalanine, namelijk de 4-amino-1,2,4,5-tetrahydro-2-benzazepin-3-on (Aba) verbinding. Door de aromatische zijketen van Phe via een methyleenbrug te verbinden met de amine functie van het volgende aminozuur kan fenylalanine verstrakt worden. Met de bespreking van de Aba synthese als achtergrond wordt vervolgens de ontwikkeling van een gelijkaardige tryptofaan verstrakking besproken. De synthese van de 4-amino-indolo-[2,3-c]azepin-3-on (Aia) verbinding werd ontwikkeld en geoptimaliseerd door een ex-medewerker van ons labo (D. Feytens). De synthese van Boc-2'-formyl-Trp was cruciaal voor de bereiding van de Aia verbinding en werd gesynthetiseerd vertrekkende van tryptofaan. Boc-2'-formyl-Trp kon gebruikt worden in reductieve amineringen met verschillende amines gevolgd door een cyclisatie reactie voor het bekomen van een brede waaier aan *N*-2 gesubstitueerde Aia's. Een methode om de Aia verbinding rechtsreeks op hars te synthetiseren werd ook ontwikkeld in ons labo. Dit maakte de introductie van de Aia verbinding in peptide sequenties gemakkelijker vergeleken met het introduceren van vooraf in oplossing gesynthetiseerde Aia dipeptiden (Aia-Xxx). Deze synthesemethoden in oplossing en op hars werden gebruikt in deze thesis voor de synthese van verschillende peptiden en peptidomimetica die de Aia verbinding bevatten. Twee NK₁ antagonisten werden met succes bereid, maar ze vertoonden helaas geen significante antagonistische activiteit. Twee cyclische urotensine II analoga H-Asp-c[Pen-Phe-*D*-Aia-Orn-Tyr-Cys]-Val-OH en H-Asp-c[Pen-Phe-*L*-Aia-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH, waarbij de Aia verbinding een Trp residu vervangt, werden bereid op hars en nadien gecycliseerd met behulp van CLEAR-OX™ voor het vormen van de disulfide brug. Voorlopige testresultaten tonen aan dat het invoeren van een tweede verstrakking (in dit geval Aia) nefast zou kunnen zijn voor het behoud van de biologische activiteit. Een serie van groeihormoon secretagogen (GHS) werden eveneens gemaakt. Hierbij werd één voor één een Trp residu op een verschillende plaats in de peptide sequenties vervangen door een Aia verbinding zodat we de invloed van deze verstrakking en positie ervan in de peptide sequenties op de biologische activiteit zouden kunnen nagaan. Enkel de Aib-*D*-Trp-*D*-Aia-NH₂ sequentie vertoonde een significante biologische activiteit die

gelijk was aan de activiteit van hexarelin. Gebaseerd op het melanocortine tetrapeptide Ac-His-*D*-Phe-Arg-Trp-NH₂ hebben we enkele sequenties bereid waarbij de His-*D*-Phe sequentie vervangen werd door Aia-*D*-Phe, Aia-*pF*-*D*-Phe, Aia-*pBr*-*D*-Phe, Aba-*D*-Phe, and Ata-*D*-Phe dipeptide mimetica. De Ata verbinding staat voor de 7-amino-7,8-dihydro-4*H*-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*][1,4]diazepin-6(5*H*)-on structuur die werd vooropgesteld als een potentiële His-mimic waarvan de ontwikkeling behandeld wordt in het derde deel van deze thesis. De biologische activiteit van de nieuwe melanocortine peptiden wordt momenteel nog onderzocht en we hopen deze resultaten zo snel mogelijk te verkrijgen.

Deel drie van deze thesis beschrijft de synthese van de 7-amino-7,8-dihydro-4*H*-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*][1,4]diazepin-6(5*H*)-on (Ata) verbinding als een nieuwe potentiële histidine mimic. Deze synthese werd ontwikkeld gebaseerd op twee verschillende strategieën die gebruik maken van een regioselectieve intermoleculaire en intramoleculaire Huisgen cycloadditie reactie. De intermoleculaire route genereert de 1,5-gesubstitueerde triazool met behulp van een ruthenium katalysator vóór de finale lactamisatie waarbij de Boc-Ata verbinding verkregen wordt. De intramoleculaire route maakt gebruik van een thermische Huisgen cycloadditie reactie waarbij de triazool en de lactam ring simultaan gevormd worden. Een 1,5-triazolo-pyrazinon en een 1,5-triazolo-diazepinon verbinding werden gesynthetiseerd om de haalbaarheid van de intermoleculaire strategie en het gebruik van de ruthenium katalysator te testen. Na het bekomen van deze resultaten konden we overgaan tot de synthese van de Boc-Ata verbinding. De intermoleculaire route werd gestart met de bescherming van het carbonzuur van serine onder de vorm van een hydroxamaat, gevolgd door een substitutie reactie voor de omzetting van de hydroxyl zijketen in een azide functie. De azide verbinding werd vervolgens gereageerd met Fmoc-beschermd propargylamine in een cycloadditie reactie met Cp*RuCl(COD) in dioxaan bij reflux voor het bekomen van de 1,5-gesubstitueerde triazool verbinding. Na simultane ontscherming van de Fmoc en hydroxamaat beschermgroepen, werd Boc-Ata verkregen d.m.v. een lactamisatie met EDC en HOBT. Voor het invoeren van aminozuur-gebaseerde substituenten op de *N*-2 positie van de Boc-Ata verbinding vertoonde deze strategie enkele tekortkomingen. Hoewel het product van de cycloadditie bekomen werd met 80% opbrengst gebruik makend van *N*-propargyl-Phe methyl ester, werden er geen condities gevonden om de hydroxamaat groep selectief te hydrolyseren in het bijzijn van het methyl ester. Om dit probleem te omzeilen werd Boc-β-azido-Ala-OBn bereid, dat vervolgens gereageerd werd met *N*-propargyl-Phe methyl ester om zo het gewenste triazool te bekomen met goede opbrengsten. De volgende lactamisatie reactie werd geoptimaliseerd voor het verkrijgen van goede opbrengsten en het vermijden van epimerisatie. Deze strategie werd gebruikt voor de synthese van Boc-Ata-*D*-Phe en Boc-Ata-Gly producten. De ruthenium gekatalyseerde Huisgen cycloadditie reactie van Boc-β-azido-Ala-OAllyl en *N*-propargyl-(Cbz)Lys-OME gaf echter een complex mengsel dat enkel een kleine fractie van het gewenste product bevatte.

De intramoleculaire strategie werd eerst toegepast voor de bereiding van de niet-gesubstitueerde Boc-Ata verbinding. Boc- β -azido-Ala, dat bereid werd vanaf commercieel verkrijgbaar Boc- β -amido-Ala, werd gebruikt in een koppelingsreactie met propargylamine m.b.v. EDC.HCl en HOBt in DMF. De simultane vorming van het triazool en lactam werd bekomen door het product van de koppelingsreactie te roeren in DMF bij 110 °C. Gelijkaardige resultaten werden bekomen met en zonder het gebruik van een ruthenium katalysator. Dit bevestigde de idee dat een katalysator in dit geval niet nodig zou zijn omdat het enige mogelijke regiochemische resultaat een 1,5-gesubstitueerde triazool ring is. Een Boc-Ata analoog met een benzyl substituent werd bereid om de invloed van de conformatie van de amide binding te bestuderen. Secundaire amides vertonen namelijk een cis-trans evenwicht. De koppelingsreactie tussen Boc- β -azido-Ala en *N*-benzyl propargylamine verliep echter moeizaam en enkel lage opbrengsten werden verkregen, dit waarschijnlijk door sterische hindering. De daaropvolgende cycloadditie daarentegen, gaf quantitative opbrengsten. Om de lage opbrengsten over deze twee stappen te verbeteren, werden de koppelingsreactie en de cycloadditie reactie in een '1 pot reactie' uitgevoerd. De koppelingsreactie werd overnacht uitgevoerd gevolgd door 1 uur roeren in DMF bij 110 °C. De opbrengst werd verhoogd van 25% voor de reacties in twee stappen tot 42% voor de '1 pot' methode. Voor het bereiden van Boc-Ata-Xxx verbindingen (Xxx = Gly, Ala, Phe) die geschikt zijn voor peptide synthese op hars, werden *N*-propargyl Boc-Xxx-OMe derivaten gebruikt samen met Boc- β -azido-Ala in de '1 pot' strategie. De beste resultaten werden verkregen wanneer EDC.HCl en HOAt in DMF werden gebruikt als reagentia. Een opbrengst van 40% werd bekomen voor het Gly analoog en er werd geen epimerisatie waargenomen. Lagere opbrengsten werden echter bekomen voor de Ala (12%) en Phe (10%) analoga en in beide gevallen werd daarenboven epimerisatie waargenomen.

Voor het vergelijken van de intermoleculaire route en de intramoleculaire route werden de totale opbrengsten berekend vanaf Boc- β -azido-Ala voor beide reactiewegen. De Boc-Ata-H en Boc-Ata-Gly analoga werden met een betere opbrengst bekomen via de intramoleculaire route, waaruit we zouden kunnen besluiten dat deze route de beste resultaten geeft. Wanneer we echter de Boc-Ata-Ala en Boc-Ata-Phe analoga vergelijken, zien we een lagere opbrengst alsook epimerisatie voor de intramoleculaire route t.o.v. de intermoleculaire route die voor deze analoga een goede opbrengst oplevert zonder epimerisatie waardoor voor de synthese van deze analoga de intermoleculaire route de voorkeur geniet.

Om de Ata verbinding als een potentiële His-mimic te kunnen valideren, werd ze ingebouwd in de angiotensine IV peptide sequentie (H-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-OH). De gezuiverde H-Val-Tyr-Ile-Ata-Gly-Phe-OH sequentie vertoonde een activiteit gelijk aan die van het natuurlijke angiotensine IV. De Ata-Gly verbinding werd ingebouwd in het dermorphine tetrapeptide H-Dmt-D-Arg-Phe-Gly-NH₂ waarbij het Phe-Gly dipeptide werd vervangen door de verstrakte Ata-Gly verbinding. Voorlopige testresultaten gaven een lage nanomolaire binding en *in vitro* activiteit, maar toonde geen verbetering in vergelijking met het Phe analoog.

Summary

This thesis deals with the synthesis and biological applications of constrained analogues of the aromatic amino acid residues phenylalanine, tryptophan and histidine.

The first part introduces some general aspects of peptidomimetic development, followed by a description of the goals set out for this work as well as an introduction to the biological applications of the developed peptidomimetics.

The second part gives a short overview of the development of the 4-amino-1,2,4,5-tetrahydro-2-benzazepin-3-one (Aba) scaffold as a constraint of phenylalanine. The constraint is established by anchoring the aromatic side chain of Phe to the amine function of the next amino acid residue. With the discussion of the developments in the Aba synthesis by our lab serving as a background, the synthetic development of an analogous tryptophan constraint is described. The synthesis of the 4-amino-indolo-[2,3-c]azepin-3-one (Aia) scaffold was recently developed and optimized by a former member of our lab (D. Feytens). The key intermediate for the synthesis of the Aia scaffold was Boc-2'-formyl-Trp, which was prepared starting from tryptophan. When using Boc-2'-formyl-Trp with different amines in a reductive amination reaction and a subsequent cyclization, a wide array of substituents could be added on the *N*-2 position of the Aia scaffold. A method for the direct incorporation of the Aia scaffold in peptide sequences using solid phase peptide synthesis (SPPS) was also developed by our lab. This facilitated the introduction of the Aia scaffold in peptide sequences compared to incorporating different Aia dipeptide mimetics as a building block in SPPS. The available strategies and methods were applied in this thesis for the synthesis of several Aia containing peptides and peptidomimetics. Two NK₁ antagonists were successfully prepared, but unfortunately they did not show any significant antagonistic activity. Two cyclic urotensin II analogues H-Asp-c[Pen-Phe-*D*-Aia-Orn-Tyr-Cys]-Val-OH and H-Asp-c[Pen-Phe-*L*-Aia-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH, containing the Aia scaffold to replace a Trp residue, were obtained using SPPS and were cyclized using CLEAR-OX™ to form the desired disulfide bridge. Preliminary test results indicated that the addition of a second constraint could be deleterious for the biological activity. A series of growth hormone secretagogues (GHS) were also prepared, replacing the Trp residues at various positions in the peptide sequences with an Aia scaffold. In this manner we could investigate the influence of the Aia constraint and its place within the sequence on the biological activity. The only Aia containing GHS analogue showing significant biological activity was Aib-*D*-Trp-*D*-Aia-NH₂, which showed an activity equal to that of Hexarelin. Based on the melanocortin tetrapeptide Ac-His-*D*-Phe-Arg-Trp-NH₂, we replaced the His-*D*-Phe sequence in this tetrapeptide with Aia-*D*-Phe, Aia-*pF*-*D*-Phe, Aia-*pBr*-*D*-Phe, Aba-*D*-Phe, and Ata-*D*-Phe dipeptide mimetics. The three-letter abbreviation Ata stands for the 7-amino-7,8-dihydro-4*H*-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*][1,4]diazepin-6(5*H*)-one scaffold, which was proposed as a potential His-mimic of which the development is discussed in the third part of this thesis. The biological activity of the new melanocortin peptide sequences is currently being evaluated and the results are expected to arrive in the near future.

As mentioned above, the third part of this thesis deals with the synthesis of the 7-amino-7,8-dihydro-4*H*-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*][1,4]diazepin-6(5*H*)-one (Ata) scaffold as a new potential histidine mimic. We developed a synthesis based on two different synthetic strategies employing regioselective intermolecular and intramolecular Huisgen cycloaddition reactions in order to construct the Boc-protected Ata scaffold suitable for peptide synthesis. The intermolecular route generates the 1,5-substituted triazole using a ruthenium catalyst prior to the final lactamization, to finally produce the desired Boc-Ata scaffold. The intramolecular route however generates the 1,5-substituted triazole and the lactam ring simultaneously using a thermal Huisgen cycloaddition reaction. The synthesis of a 1,5-triazolo pyrazinone and a 1,5-triazolo diazepinone compound served as test cases for the feasibility of the intermolecular pathway using a ruthenium catalyst to obtain the 1,5-substituted 1,2,3-triazole moieties. Based on these results we proceeded to the synthesis of the actual Boc-Ata scaffold. The intermolecular pathway commenced with the protection of the carboxylic acid function of Boc-Ser with a hydroxamate group followed by a diazotransfer reaction to change the hydroxyl group of the serine side chain into an azide function. The azide compound was reacted with Fmoc-protected propargylamine in a cycloaddition reaction using Cp**RuCl*(COD) in refluxing dioxane and presented the desired 1,5-substituted triazole. After simultaneous deprotection of the Fmoc and hydroxamate protections, the following lactamization using EDC.HCl and HOBt yielded the desired Boc-Ata scaffold. However, applying this strategy for introducing amino acid-based substituents on the Boc-Ata *N*-2 position using *N*-propargyl-Phe methyl ester was not successful. Although the cycloaddition product was obtained in 80% yield, no conditions were found to selectively hydrolyze the Weinreb amide in the presence of the methyl ester. To overcome this problem we prepared Boc- β -azido-Ala-OBn, which was reacted with *N*-propargyl-Phe methyl ester, delivering the 1,5-substituted triazole compound in excellent yields. Subsequent selective benzyl ester deprotection did not present any unwanted deprotection of the methyl ester of the Phe residue. The following lactamization was optimized producing excellent yields and no epimerization. The same approach was applied for the preparation of Boc-Ata analogues bearing *D*-Phe- and Gly-based substituents. However, the RuAAC with Boc- β -azido-Ala-OAllyl and *N*-propargyl-(Cbz)Lys-OMe yielded a complex mixture with only a small fraction of the desired product.

The intramolecular approach was first performed preparing the Boc-Ata scaffold without *N*-2-substituent. Boc- β -azido-Ala, which was prepared from commercial Boc- β -amino-Ala, was reacted with propargylamine in a coupling reaction using EDC.HCl and HOBt in DMF. Simultaneous formation of both triazole and lactam cycles was achieved by heating the product from the coupling reaction in DMF. Similar results were obtained for reactions performed with and without Ru catalyst. This confirmed the idea that the use for a catalyst for the intramolecular RuAAC is unnecessary because the only possible regiochemical outcome is the formation of the 1,5-substituted triazole. Since secondary amides exhibit a *cis-trans* equilibrium, a benzyl substituted Ata analogue (Boc-Ata-Bn) was prepared to investigate the influence of the amide bond isomerism. The coupling reaction between Boc- β -azido-Ala and *N*-benzyl propargylamine proceeded only in low yields, probably due to steric encumbrance. The following cycloaddition reaction on the other hand, gave quantitative yields. A

manner to circumvent the low overall yields over these two steps was found by performing a one pot reaction. The coupling reaction was performed overnight using the same coupling procedure, and the mixture was subsequently stirred for 1h at 110 °C. Yields were improved from 25% for the stepwise procedure to 42% for the one pot method. Introduction of amino acid-based substituents to prepare Boc-Ata-Xxx compounds suitable for peptide synthesis was performed using *N*-propargyl Boc-Xxx-OMe derivatives (Xxx = Gly, Ala, Phe) together with Boc- β -azido-Ala in the one pot procedure. The best results were obtained using EDC.HCl and HOAt in DMF. A 40% yield was obtained for the Gly analogue and no epimerization was noted. Unfortunately low yields were observed for the Ata-Ala (12%) and Ata-Phe (10%) analogues and both cases showed substantial epimerization.

When comparing the intermolecular pathway to the intramolecular route overall yields were calculated from Boc- β -azido-Ala for both pathways. This indicated that the intramolecular route is preferred over the intermolecular pathway for the Boc-Ata-H and Boc-Ata-Gly analogues. Conversely, for the Boc-Ata-Ala and Boc-Ata-Phe analogues the intramolecular route gave lower yields and showed substantial epimerization, making the intermolecular pathway preferable over the intramolecular route.

In order to validate the Ata scaffold as a histidine mimic, it was introduced in the angiotensin IV (H-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-OH) peptide sequence via SPPS. The purified H-Val-Tyr-Ile-Ata-Gly-Phe-OH sequence was evaluated for its biological activity and showed an equipotency to the native Ang IV sequence. The Ata-Gly dipeptide mimetic was also introduced in the dermorphin tetrapeptide H-Dmt-*D*-Arg-Phe-Gly-NH₂ by replacing the Phe-Gly dipeptide. Preliminary test results showed a low nanomolar binding and in vitro activity, but not an improvement as compared to the Phe analogue.