

Diss. ETH No. 14298

**Synthesis, Structure and  
Biological Investigations of  $\beta$ -Peptides**

A dissertation submitted to the  
EIDGENÖSSISCHE TECHNISCHE HOCHSCHULE  
ZÜRICH

for the degree of  
Doktor der Naturwissenschaften

Presented by

**Jürg Vital Schreiber**

Dipl. Chem. ETH  
born March 9, 1972  
from Kyburg / ZH

Accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Dieter Seebach, examiner  
Prof. Dr. Albert Eschenmoser, co-examiner

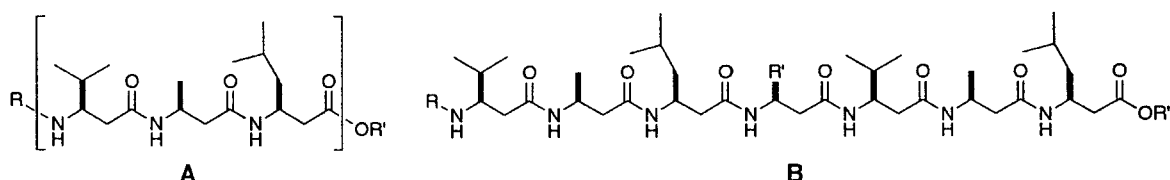
Zürich 2001

# 1 Zusammenfassung/Summary

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit handelt es sich um Untersuchungen von  $\beta$ -Peptiden (d.h. Oligomere von  $\beta$ -Aminosäuren). Es wurde gezeigt, dass  $\beta$ -Peptide verschiedene stabile Sekundärstrukturen wie z.B. Helices bilden, welche über H-Brücken verbundene 14-, 12- und 10-gliedrige Ringe enthalten. Die Herstellung von  $\beta$ -Aminosäuren sowie die Synthese und die Untersuchung der Sekundärstruktur von  $\beta$ -Peptiden mit verschiedenen Substitutionsmustern werden diskutiert. Zudem wird über biologische Untersuchungen von  $\beta$ -Peptiden berichtet.

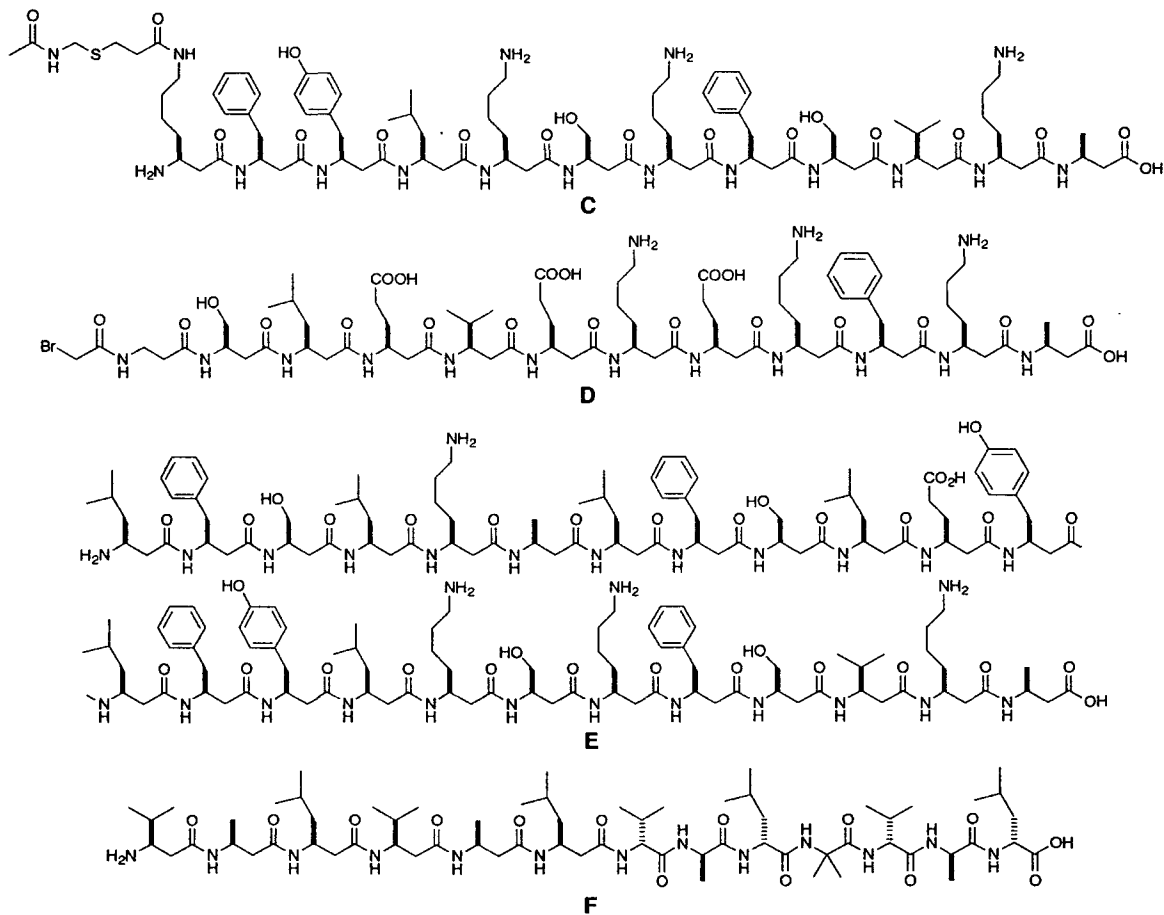
Die für den Aufbau der  $\beta$ -Peptide verwendeten  $\beta$ -Aminosäuren wurden stereoselektiv hergestellt. Die Struktur von diesen  $\beta$ -Peptiden wurde mit Hilfe von verschiedenen physikalischen Methoden untersucht.



Es wurde eine sorgfältige Analyse der CD-Spektren von  $\beta$ -Oligopeptiden mit den in A und B vorliegenden Substitutionsmustern durchgeführt. Geringfügige strukturelle Änderungen bewirken einen Übergang vom CD-Muster, welches mit einer  $3_{14}$ -Helix assoziiert wird, zu einem CD-Muster, das als typisch für eine 12/10-helikale Struktur erachtet wird oder auch bei einem  $\beta$ -Peptid auftritt, welches eine Haarnadelkonformation mit einem über H-Brücken verbundenen 10-gliedrigen Ring als Schleifenmotiv einnimmt. Ein Vergleich dieser CD-Spektren mit denjenigen der Oligomere aus *trans*-2-Aminocyclohexan-carbonsäure, welche nur einen Cotton-Effekt bei längerer Wellenlänge verursachen, deutet darauf hin, dass nicht nur die ganze Helix, sondern auch die einzelnen über H-Brücken verbundenen 14-, 12- und 10-gliedrigen Ringe der  $\beta$ -Peptide einen Beitrag zum Cotton-Effekt leisten. Um diese Vermutung zu erhärten, wurde eine statistische Analyse von zwei  $\beta$ -peptidischen Konformationen, welche aus molekulardynamischen Berechnungen (GROMOS 96) erhalten wurden, durchgeführt. Als Modellverbindungen dienen ein  $\beta$ -Hexa- und ein  $\beta$ -Heptapeptid, die gemäss 2D-

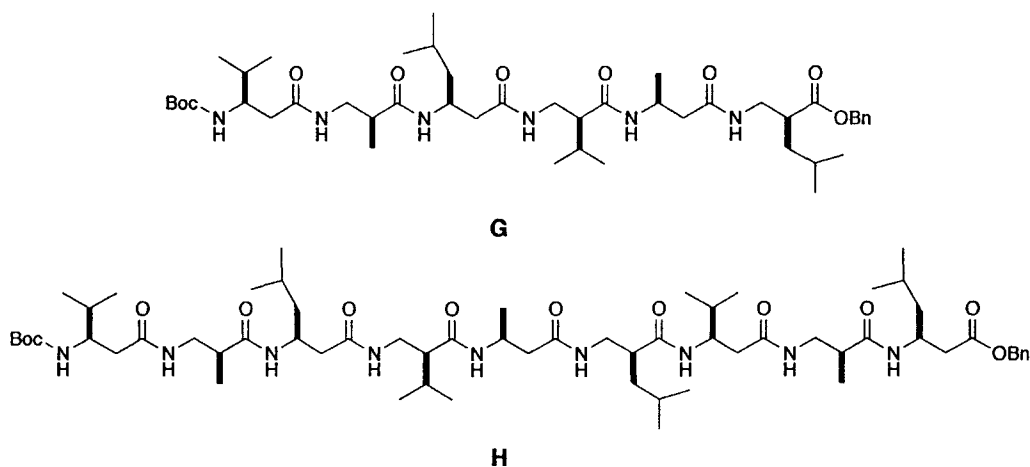
NMR Spektroskopie in methanolischer Lösung in einer 12/10- beziehungsweise in einer  $3_{14}$ -helikalen Struktur vorliegen. Die Analyse ergab eine Koexistenz der verschiedenen über H-Brücken verbundenen Ringe.

Die vollständig aus  $\beta^3$ -Aminosäuren aufgebauten  $\beta$ -Dodeca- und  $\beta$ -Tetracosapeptide C–E mit funktionalisierten Seitenketten wurden in *multi*-mg Mengen an einer festen Phase hergestellt. Dabei wurde eine stärkere Base für die *N*-Entschützung und längere Reaktionszeiten für die Kupplung verwendet als bei der Synthese von  $\alpha$ -Peptiden üblich. Das  $\beta$ -Dodecapeptid A zeigt in methanolischer Lösung das erwartete, für eine  $3_{14}$  (*M*)-Helix typische CD-Muster. In wässriger Lösung jedoch fehlt das charakteristische Minimum bei *ca.* 215 nm und das CD-Spektrum zeigt nur ein stark positiver Cotton-Effekt bei 202 nm. Strukturuntersuchungen von C in methanolischer und in wässriger Lösung mittels homonuklearer NMR-Spektroskopie ergaben, dass das Peptid in MeOH eine gut definierte  $3_{14}$  (*M*)-Helix einnimmt, in Wasser jedoch mehrheitlich unstrukturiert vorliegt. Das  $\beta$ -Tetracosapeptid E zeigt ein noch nie bei einem  $\beta$ -Peptid beobachtetes CD-Muster (in methanolischer und in wässriger Lösung), was vielleicht auf eine unbekannte Sekundärstruktur oder aber auf eine ungeordnete Konformation hinweist.

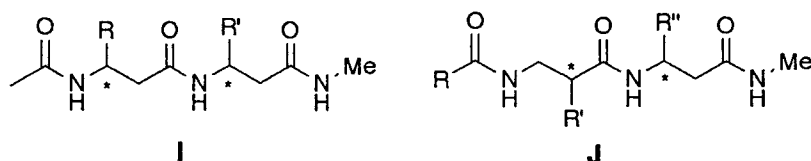


Gemäss CD-Analyse des Dodecapeptids **F** in methanolischer Lösung nimmt der  $\beta$ -peptidische Teil eine  $3_{14}$ -Helix ein, wohingegen der  $\alpha$ -peptidische Teil in einer  $3.6_{13}$ -helikalen Struktur vorliegt.

Zur Untersuchung der Stabilität der 12/10-helikalen Struktur wurden die 'gemischten'  $\beta$ -Peptide **G** und **H** hergestellt. Die  $\beta$ -Peptide **G** und **H** zeigen die für eine 12/10-Helix typische CD-Kurve mit einem einzigen Maximum. Die Struktur von Verbindung **G** wurde mittels 2D-NMR-Spektroskopie in methanolischer Lösung untersucht. Überraschenderweise ist die C=O der Boc-Gruppe im ersten über H-Brücken verbundenen 12-gliedrigen Ring der 12/10-helikalen Struktur von **H** beteiligt.  $\beta$ -Peptide mit 12/10-helikaler Struktur sind unpolar: das  $\beta$ -Nonapeptid **H** läuft auf  $\text{SiO}_2$  schneller als das entsprechende 'gemischte'  $\beta$ -Hexapeptid **G**, welches die gleichen Seitenketten trägt.



Durch CD-Untersuchungen und theoretischen Berechnungen der Konformation einer Serie von  $\beta$ -Dipeptid-Derivaten mit den in **I** und **J** vorliegenden Substitutionsmuster wurde gezeigt, dass schon derartige Dipeptide eine intrinsische Neigung haben, über H-Brücken verbundene 10- und/oder 12-gliedrige Ringe zu bilden.



Weiter wurde eine Methode zur Sequenzierung von  $\beta$ -Peptiden entwickelt. Die  $\beta$ -Peptide wurden mittels ESI-Tandem Massenspektrometrie untersucht. Durch die entstandenen Fragment-Ionen der freien  $\beta$ -Peptide als auch der entsprechenden Methylester und *N*-Acetylderivate konnte die bekannte Sequenz der  $\beta$ -Aminosäuren

bestätigt werden. Die allgemein verwendete MS-Sequenzprozedur für  $\alpha$ -Peptide kann ohne Modifikation auf  $\beta$ -Peptide angewendet werden. Es gibt jedoch hervorzuhebende Unterschiede der Fragmentmuster der zwei Peptidtypen: durch Elimination von Ammoniak am *N*-Terminus und durch das Auftreten einer retro-*Mannich* Spaltung 'verraten' die  $\beta$ -Peptide ihre Verwandtschaft zu *Mannich*-Basen.

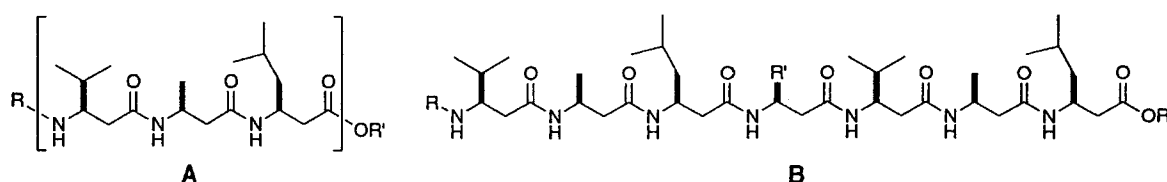
In einem zweiten Teil wurden biologische Studien mit  $\beta$ -Peptiden durchgeführt. Interaktionen und Spaltungsreaktionen von  $\beta$ -Aminosäuren und  $\beta$ -Oligopeptiden mit biologischen Systemen wie z.B. den stärksten Peptidasen (Pronase, Proteinase K, 20S Proteasom) und mit Mikroorganismen wurden untersucht und mit  $\alpha$ -Peptiden verglichen. Die Resultate sind: *i*) Weder eine Spaltung durch proteolytische Enzyme noch eine Inhibition der Enzyme durch  $\beta$ -Peptide wurde beobachtet; *ii*) mit Ausnahme gewisser 3-Aminobutansäure( $\beta$ -HAla)-Derivaten, führten weder freie, noch *N*-Acetyl  $\beta$ -Aminosäuren (angeboten als *N*- und *C*-Quelle) zu Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* oder *Pseudomonas putida*. Unter Umweltbedingungen jedoch wurden die getesteten  $\beta$ -Peptide und  $\beta$ -Aminosäuren vollständig metabolisiert.

Zur Untersuchung, wie ein  $\alpha$ -peptidisches globuläres Protein mit der spezifischen 'Erkennung' eines  $\beta$ -Peptids fertig wird, wurde mit einem  $\beta$ -Peptidkonjugat eine Immunantwort in einem Säugetier hervorgerufen. Das  $\beta$ -Dodecapeptid **D** wurde mit Rinderserumalbumin (BSA) und Thyroglobulin (TG) konjugiert, und Mäuse wurden mit dem TG-Konjugat immunisiert. Der Antikörpertiter in den Seren wurde mittels ELISA und dem entsprechenden BSA-Konjugat abgeschätzt. Der Titer in den Seren war hoch, ein Antikörper mit einer hohen Affinität zu **D** muss aber noch identifiziert werden.

## Summary

In this thesis studies in the field of  $\beta$ -peptides (*i.e.* oligomers of  $\beta$ -amino acids) are described.  $\beta$ -Peptides have been shown to adopt various stable secondary structures, *e.g.* helices containing 14-, 12- and 10-membered H-bonded rings. The preparation of  $\beta$ -amino acids and the synthesis as well as structural investigations of  $\beta$ -peptides with different substitution patterns are presented. Moreover, the results of biological studies with  $\beta$ -peptides are presented.

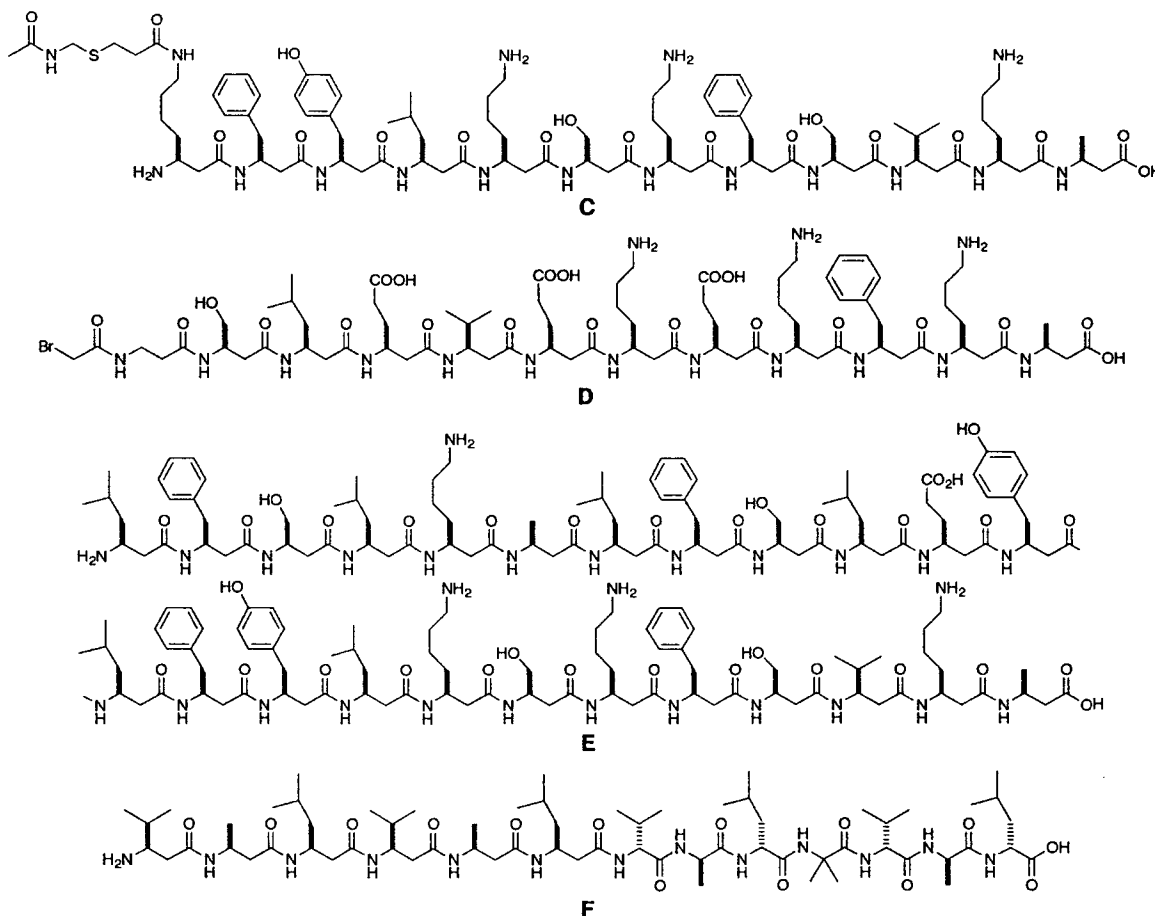
$\beta$ -Amino acids were stereoselectively prepared and used for the construction of  $\beta$ -peptides. The structure of these  $\beta$ -peptides was analyzed by various physical methods.



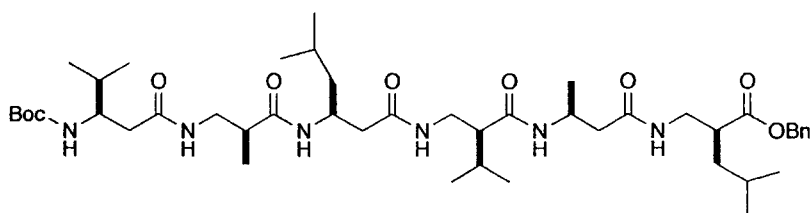
A careful CD analysis of  $\beta$ -oligopeptides with the substitution patterns shown in **A** and **B** reveals that seemingly small structural changes cause a switch from the CD pattern associated with a  $3_{14}$ -helical structure to the CD pattern considered characteristic of a so-called 12/10-helical structure, but also exhibited by a  $\beta$ -peptide adopting a hair-pin conformation with a 10-membered H-bonded ring as the turn motif. Comparison of these CD spectra with those of the *trans*-2-amino-cyclohexane carboxamide oligomers, which give rise to the long-wavelength *Cotton* effect only, suggest that the H-bonded 14-, 12-, and 10-membered ring conformations of the  $\beta$ -peptides and not just the entire helix structures might actually generate the *Cotton* effects. In order to further substantiate this suggestion, a statistical analysis of the  $\beta$ -peptidic conformations generated by molecular dynamics calculations (GROMOS 96) was performed for a  $\beta$ -hexapeptide which was shown to adopt the 12/10 helix and for a  $3_{14}$ -helical  $\beta$ -heptapeptide in MeOH. The analysis reveals the coexistence of the various H-bonded rings.

The *all*- $\beta$ <sup>3</sup>-dodeca- and -tetracosapeptides **C–E** with functionalized side chains have been synthesized in *multi*-mg quantities on a solid support using a stronger base for *N*-deprotection and longer reaction times for coupling than are usually employed in  $\alpha$ -peptide solid-phase synthesis. In MeOH solution the  $\beta$ -dodecapeptide **A** exhibits the expected CD pattern typical of an  $3_{14}$  (*M*)-helical secondary structure. In H<sub>2</sub>O, however, the characteristic trough near 215 nm is missing from the CD spectrum, with only a strong positive *Cotton* effect at 202 nm remaining. Investigation of the solution structures of **C** in MeOH, and in H<sub>2</sub>O by elaborate homonuclear NMR spectroscopy revealed that the

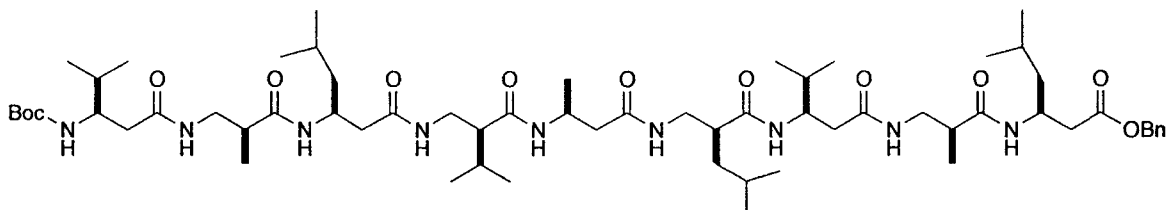
peptide folds into a well-defined  $3_{14}$  (*M*)-helix in MeOH, but adopts a predominantly unordered conformation in H<sub>2</sub>O. The  $\beta$ -tetracosapeptide **E** exhibits an unprecedented CD pattern (in MeOH and in H<sub>2</sub>O solution) that may arise from a new type of secondary structure or from an unordered conformation. Peptide **F** was prepared in solution. According to CD analysis, the  $\beta$ -peptidic part of peptide **F** forms a  $3_{14}$ -helical structure whereas the  $\alpha$ -peptidic part adopts a  $3.6_{13}$ -helical structure.



To learn more about the stability of the 12/10-helical structure, the 'mixed'  $\beta$ -peptides **G** and **H** were prepared.  $\beta$ -Peptides **G** and **H** show the single maximum CD curve typical of a 12/10-helical structure. Compound **G** was subjected to a detailed NMR analysis in MeOH solution. Surprisingly, the C=O of the Boc group is involved in the first 12-membered H-bonded ring of the 12/10-helical structure of **H**.  $\beta$ -Peptides with 12/10-helical structure are non-polar: the  $\beta$ -nonapeptide **H** runs faster on SiO<sub>2</sub> than the corresponding 'mixed'  $\beta$ -hexapeptide **G** carrying the same side chains.

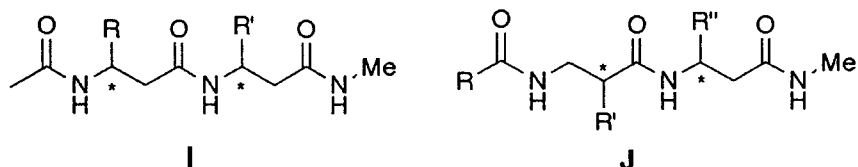


G



H

$\beta$ -Dipeptides have an intrinsic propensity to form 10- and/or 12-membered H-bonded rings, as shown by CD, and computational investigations of a series of compounds with the substitution pattern shown in I and J.



I

J

A method for sequencing  $\beta$ -peptides by mass spectrometry has been developed.  $\beta$ -Peptides were subjected to ESI-tandem mass spectrometry. From the fragment ions generated from the free  $\beta$ -peptides, as well as from the corresponding methyl esters and *N*-acetyl derivatives, the known sequences of  $\beta$ -amino acids could be confirmed unambiguously. Thus, the MS-sequencing procedure commonly used for  $\alpha$ -peptides can be applied to  $\beta$ -peptides without modification. However, there are pronounced differences in the fragmentation patterns of the two types of peptides: the  $\beta$ -peptides disclose their relationship to *Mannich* bases in the mass-spectroscopic experiment by elimination of ammonia from the *N*-terminus and by occurrence of retro-*Mannich* cleavage.

In the second part of the thesis work, biological studies with  $\beta$ -peptides were performed. Interactions and cleavage reactions of  $\beta$ -amino acids and  $\beta$ -oligopeptides with biological systems, such as the most potent peptidases (pronase, proteinase K, 20S proteasome) and microorganisms, have been investigated and compared with  $\alpha$ -peptides. The results are: *i*) neither a cleavage of  $\beta$ -peptides by the proteolytic enzymes tested nor an inhibition of an enzyme by  $\beta$ -peptides was observed; *ii*) except for certain 3-amino-



butanoic acid ( $\beta$ -HAla) derivatives, neither free, nor *N*-acetyl  $\beta$ -amino acids, nor  $\beta$ -peptides (offered as sole N and C source) led to growth of *Pseudomonas aeruginosa* or *Pseudomonas putida*. However, under environmental conditions, the tested  $\beta$ -peptides and  $\beta$ -amino acids were fully metabolized.

To see how an  $\alpha$ -peptidic globular protein such as an antibody copes with the challenge of specifically binding a  $\beta$ -peptide,  $\beta$ -dodecapeptide **D** was conjugated to bovine serum albumin (BSA), and to thyroglobulin (TG). Mice were immunized with the TG conjugate and the antibody titer in sera was estimated by ELISA with the corresponding BSA conjugate. The titer in sera was high, however, a high affinity against **D** antibody is yet to be identified.