

Diss. ETH NO. 22770

Synthesis and Application of Oxetanyl Peptides

A dissertation submitted to

ETH Zurich

For the degree of

Doctor of Sciences of ETH Zurich

(Dr. sc. ETH Zurich)

Presented by

Guido Patrick Möller

Dipl.-Chem., Westfälische Wilhelms-Universität Münster

Born August 14th 1987

Citizen of the Federal Republic of Germany

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Erick M. Carreira, examiner

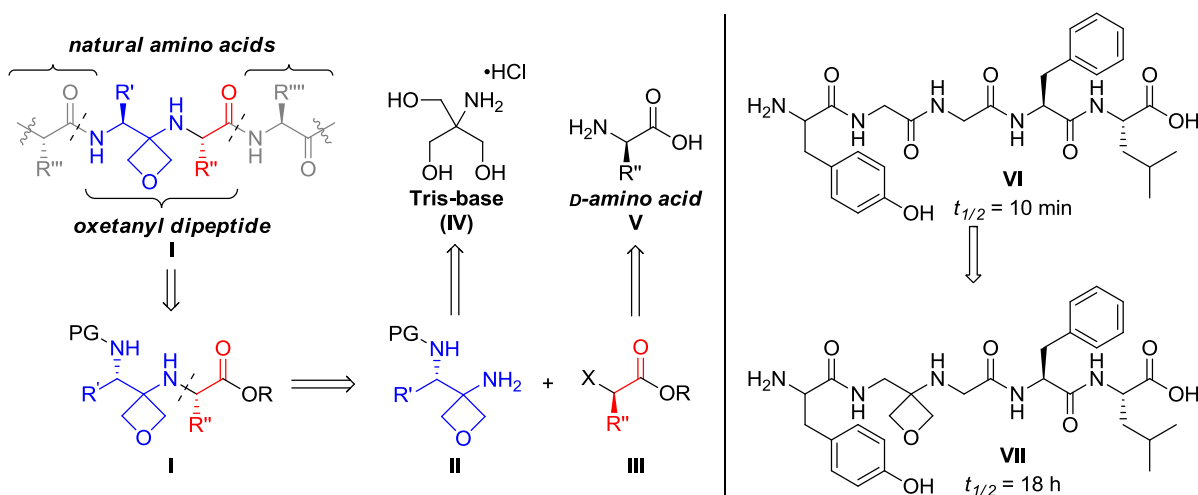
Prof. Dr. Karl-Heinz Altmann, co-examiner

Zürich, 2015

Abstract

This work extends the concept of oxetanes as *gem*-dimethyl and carbonyl mimics in drug development to peptides. Naturally occurring pharmaceutically active peptides are invaluable lead structures for the design of pharmaceuticals. However, the use of peptides as drugs suffers from some inherent limitations such as low metabolic stability and bioavailability. Hence, we decided to design building blocks containing oxetanes that would significantly enhance the stability of the parent compound and at the same time retain or improve its biological activity.

In the first part of the project a variety of backbone-modified dipeptide building blocks **I** was prepared, where the peptidic amide bond is replaced by a 3-amino oxetane moiety. The synthetic strategy is designed to allow the modular assembly of **I** containing a diversity of side chains by alkylation of **II** with **III**. In turn, **II** and **III** were traced back to inexpensive, readily available starting materials, Tris-base (**IV**) and D-amino acids **V**, respectively (Scheme I).



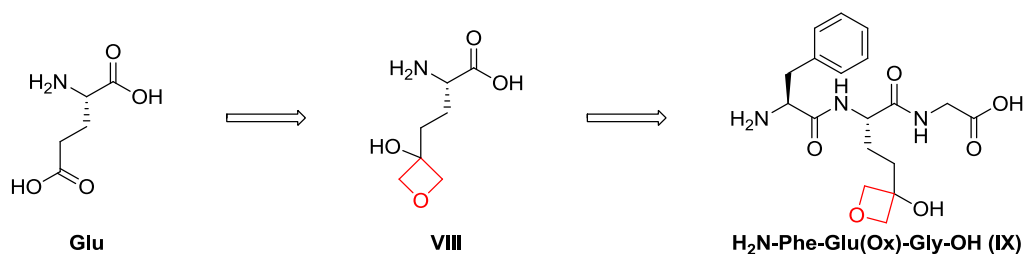
Scheme I Synthesis and Application of Oxetanyl Dipeptides **I**.

This approach relying on robust synthetic methods ensures the operationally simple formation of sufficient amounts of building blocks **I** for their incorporation into larger peptides. We chose the prominent endogenous neurotransmitter Leu-Enkephalin (**VI**) as our first target to evaluate the effect of

the oxetane modification on the properties of the parent peptide. In total, four analogues of **VI** were prepared. Indeed, the half-life time in human serum of the analogues was significantly increased to up to 18 h (for **VII**) compared to 10 min for the natural compound (Scheme I). Furthermore, two of the oxetanyl peptides still showed nanomolar affinity to the δ -opioid receptor. The most promising analog from the *in vitro* studies also showed analgesic activity in mice.

As a second target, we chose an inhibitor of the aggregation of α -synuclein. Fibrillation of α -synuclein is suspected to be the major cause of PARKINSON'S disease. Also in this case, four oxetanyl analogues were prepared. Studies on their *in vitro* activity are ongoing.

The second part of the project aimed at the synthesis of side-chain modified oxetanyl amino acids. This time, the oxetane surrogate was used to modify the intrinsic properties of natural and unnatural amino acid side chains. On one hand, oxetanes were incorporated as gem-dimethyl replacements in hydrophobic amino acids to reduce their lipophilicity. On the other hand, the side-chain carbonyl groups in Asn, Gln, Asp and Glu were replaced by oxetanes to alter their electrostatic properties. Finally, an azetidene derivative of lysine was designed. In total, nine oxetanyl and azetidyl amino acids were prepared employing well-established methodologies, i.e. asymmetric hydrogenation and ELLMAN auxiliary chemistry.



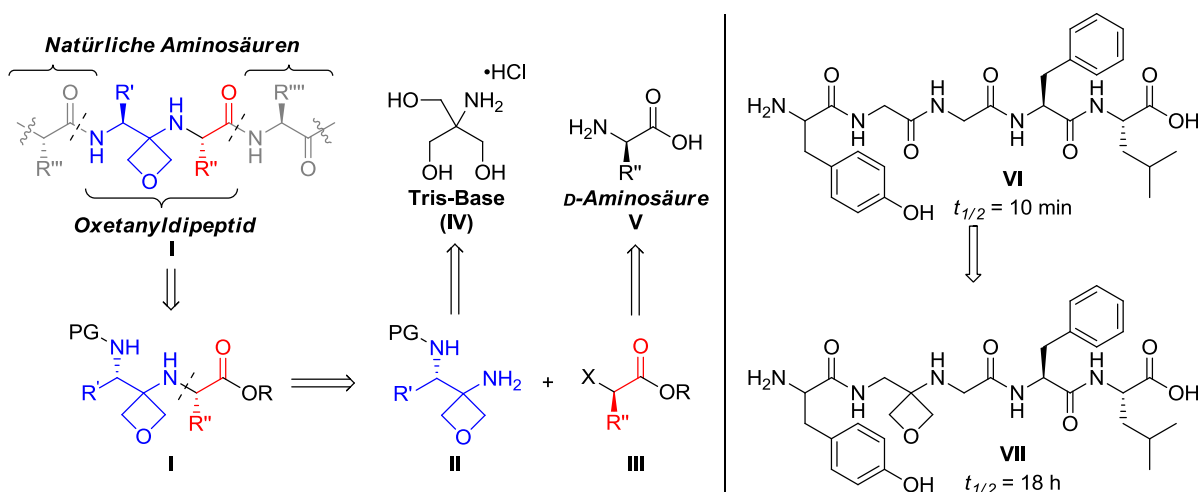
Scheme II Concept and Incorporation of VIII into IX.

Additionally, one of the novel oxetanyl amino acid building blocks (**VIII**) was incorporated into the anti-anaphylactic peptide FEG. Further studies to evaluate the activity of **IX** will be subject of future research (Scheme II).

Zusammenfassung

Diese Arbeit erweitert das Konzept, Oxetane als Ersatz für geminale Dimethyl- und Carbonylgruppen in der Wirkstoffentwicklung einzusetzen, auf Peptide. Natürlich vorkommende, pharmazeutisch aktive Peptide sind unersetzbare Leitstrukturen für das Design neuer Pharmazeutika. Jedoch sind Peptide aufgrund ihrer geringen metabolischen Stabilität und Bioverfügbarkeit nur bedingt als Wirkstoffe geeignet. Daher beschlossen wir, Oxetanbausteine zu entwickeln, die die Stabilität der ursprünglichen Verbindung erhöhen und zugleich ihre biologische Aktivität beibehalten oder verbessern.

Im ersten Teil des Projekts stellten wir eine Vielfalt Rückgrat-modifizierter Dipeptidbausteine **I** her, in denen die peptidische Amidbindung durch ein 3-Aminooxetan ersetzt ist. Die ausgewählte Synthesestrategie über die Alkylierung von **II** mit **III** erlaubte die modulare Synthese von **I** mit einer Vielzahl verschiedener Seitenketten. Die Bausteine **II** und **III** wiederum wurden auf die günstigen, kommerziell verfügbaren Startmaterialien Tris-Base (**IV**) und D-Aminosäuren **V** zurückgeführt (Schema I).



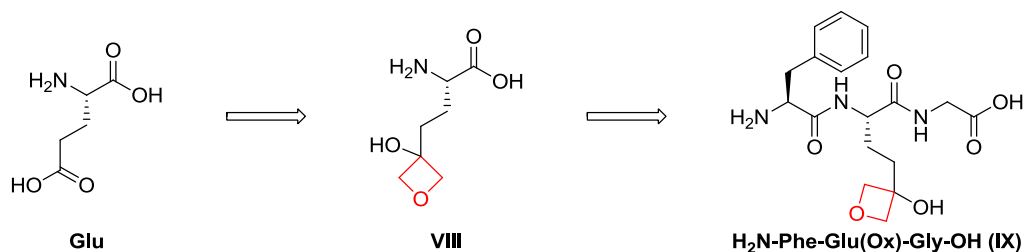
Schema I Synthese und Anwendung von Oxetanyldipeptiden I.

Der auf robusten synthetischen Methoden basierende Zugang zu **I** stellt die Verfügbarkeit ausreichender Mengen für die Herstellung grösserer Peptide

sicher. Als erste Anwendung, zur Bestimmung des Effekts vom Einbau von Oxetanen auf die Eigenschaften des ursprünglichen Peptids, wählten wir den bekannten endogenen Neurotransmitter Leu-Enkephalin (VI). Insgesamt wurden vier Analoga von VI hergestellt. Die Halbwertszeit in humanem Serum erhöht sich durch die Verwendung von Oxetanylpeptiden von 10 min für die natürliche Verbindung (VI) auf bis zu 18 h für VII. Zudem haben zwei der Analoga eine nanomolare Bindungsaffinität zum δ -Opioidrezeptor. Die vielversprechendste Verbindung aus den *in vitro* Studien zeigte außerdem analgetische Aktivität in Mäusen.

Als zweite Zielverbindung wählten wir einen Inhibitor der Aggregation von α -Synuclein. Die Fibrillation von α -Synuclein wird als einer der Hauptgründe für die PARKINSON'SCHE Krankheit angesehen. Auch hier wurden vier Analoga des natürlichen Peptids hergestellt. Studien zu ihrer *in vitro* Aktivität sind geplant.

Der zweite Teil des Projekts befasste sich mit der Synthese von Seitenkettenmodifizierten Oxetanylaminosäuren. Diesmal sollten durch die Verwendung von Oxetanen die intrinsischen Eigenschaften von Seitenketten natürlicher und unnatürlicher Aminosäuren verändert werden. Einerseits wurde Oxetane anstelle von geminalen Dimethylgruppen eingesetzt, um die Lipophilie hydrophober Aminosäuren zu mildern. Andererseits, wurden die Carbonylgruppen in den Seitenketten von Asn, Gln, Asp und Glu durch Oxetane ersetzt, um deren elektrostatische Eigenschaften zu verändern. Schließlich wurde ein Azetidinderivat von Lysin entwickelt.



Schema II Konzept und Einbau von VIII in IX.

Insgesamt wurden neun Oxetanyl- und Azetidinylamino-säuren durch die Verwendung etablierter Methoden, d.h. asymmetrischer Hydrierung und ELLMAN Auxiliarchemie, hergestellt. Weiterhin wurde einer der neuen Oxetanylbausteine **VIII** in das anti-anaphylaktische Peptid FEG eingebaut. Weitere Studien zur Aktivität von **IX** sind noch im Gange.