



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

Enzymatic tools for peptide ligation and cyclization

Development and applications

Schmidt, M.

Publication date

2019

Document Version

Other version

License

Other

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

Schmidt, M. (2019). *Enzymatic tools for peptide ligation and cyclization: Development and applications*.

General rights

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Disclaimer/Complaints regulations

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

Nederlandse Samenvatting

De ontwikkeling van peptiden als toekomstige geneesmiddel heeft het onderzoek van nieuwe strategieën voor hun synthese en modificatie bevorderd. Naast de ontwikkeling van nieuwe chemische ligatie methoden, heeft vooral het gebruik van enzymen als veelzijdige hulpmiddel veel aandacht gekregen. Tegenwoordig zijn enzymen waardevolle instrumenten in zowel academische als industriële laboratoria door hun voordelige eigenschappen, zoals regio- en chemoselectiviteit. Ondanks de voordelen, hebben veel ligases echter ook beperkingen, zoals een lage katalytische efficiëntie of een klein substraatbereik. Alhoewel bestaande technologieën al een uitgebreid scala aan toepassingen omvatten, toekomstige ontdekkingen en gerichte aanpassingen van nieuwe en verbeterde ligases zijn cruciaal om de reikwijdte van applicaties uit te breiden.

Hoofdstuk 1 geeft een beknopte inleiding over het gebruik van enzymen bij de ligatie van peptiden en eiwitten. Volgend op de introductie van het basisconcept van enzym-gecatalyseerde peptide ligatie, worden de belangrijkste enzymen die momenteel gebruikt worden samen met hun respectieve voor- en nadelen en hun mogelijke toepassingen beschreven.

Met deze basis, beschrijven we in **hoofdstuk 2** de ontwikkeling van een nieuwe, breed specifieke peptiligase variant, genaamd omniligase-I, om de gereedschapskist van bestaande enzymen uit te breiden en de beperkingen van peptiligase-gecatalyseerde ligatie te overwinnen. Omniligase-I is ontworpen om de efficiënte ligatie van verschillende peptiden mogelijk te maken, die ook onnatuurlijke en (zijketen) beschermde natuurlijke aminozuren kunnen bevatten. De brede toepasbaarheid wordt geïllustreerd door de synthese van verschillende lineaire peptiden, waaronder het anti-diabetisch peptide exenatide op gramschaal. In aanvulling hierop beschrijven we de N-tegen-N-fusie van peptiden met behulp van een dubbelkoppige Cam-esters en daarnaast de efficiënte cyclisatie van peptiden langer dan 12 aminozuren.

De ontwikkeling van de meer specifieke peptiligase variant thymologase wordt beschreven in **hoofdstuk 3**. Door structuur-geïnspireerd ontwerp kon thymologase specifiek worden afgestemd voor de kosteneffectieve productie van het moeilijk te synthetiseren therapeutisch peptide thymosine- α_1 . Dit peptide werd succesvol gesynthetiseerd op gram schaal. De synthese van thymosine- α_1 , een geacetyleerd therapeutische peptide met een lengte van 28 aminozuren, is uitzonderlijk uitdagend met behulp van conventionele chemische methoden. Door gebruik te maken van een convergente [14 + 14] chemo-enzymatische ligatie benadering, werd thymosine- α_1 verkregen met een twee keer verhoogde totale opbrengst vergeleken met de bestaande industriële processen. De kristalstructuur van thymologase werd opgelost om de verbeteringen van deze specifieke peptiligasevariant te rationaliseren.

Vanwege het gebrek aan methodologieën voor de efficiënte synthese van natuurlijk voorkomende disulfide-rijke multicyclische peptiden, zoals cyclotiden, werd de toepassing van peptiligase-varianten, o.a. omniligase-I, voor deze klasse van moleculen en conjugaten uitvoerig bestudeerd, zoals beschreven in **hoofdstuk 4**. De

prototypische cyclotiden MCoTII-II, kalata BI en de θ -defensin RTD-I werden efficiënt gecycliseerd en oxidatief opgevouwen in een één-pots procedure. De chemo-enzymatische één-pots cyclisatie-vouwing van MCoTI-II en de klinisch relevante kBI -variant [T20K] zijn aangetoond op multi gramschaal en vormen daarom een veelbelovende strategie voor hun productie op grotere schaal. Verschillende ligatiesites voor elke macrocycle maken deze benadering zeer flexibel. Dit hoofdstuk beschrijft ook de combinatie van twee verschillende peptiligasevarianten in een dubbele enzymatische benadering voor de bereiding van gemodificeerde cyclotiden of dimeer fusievarianten.

Nieuwe strategieën voor de synthese van disulfide-rijke peptiden maakten de weg vrij voor enzymatische ligatie met behulp van peptiligase varianten om multicyclische peptiden die kleine steiger moleculen bevatten te maken. In **hoofdstuk 5** wordt de combinatie van enzymatische ligatie en CLIPS (Chemical Linkage of Peptides onto Scaffolds) alkylering beschreven voor de bereiding van tricyclische peptiden in een één-pots reactie in minder dan één uur.

Een uitbreiding van het tricyclische peptidenconcept wordt beschreven in **hoofdstuk 6**. Een unieke combinatie van enzymatisch ligatie en CLIPS met koper-gekatalyseerde alkynazide cycloadditie (CuAAC), genaamd "triple-C" peptide vergrendeling, en T4 kleine steiger moleculen werden gebruikt voor het maken van tetracyclische peptiden in een één-potreactie. We laten de toepassing van dit concept zien door de bereiding van homo- en hetero-bifunctionele peptiden, die remmende activiteit vertoonden tegen twee verschillende eiwitten, urokinase plasminogeenactivator (uPA) en coagulatie factor XIIa (FXIIa).

In **hoofdstuk 7** wordt een soortgelijk concept beschreven voor de synthese van tetracyclische peptiden. Er wordt een gedetailleerde studie gepresenteerd over de combinatie van enzymatische cyclisatie, CLIPS-alkylering en oxime-ligatie voor de bereiding van tetracyclische peptiden met behulp van drie nieuw ontworpen kleine moleculaire steigers en modelpeptiden van verschillende groottes.

Naast de combinatie met chemische ligatietechnieken, beschrijft **hoofdstuk 8** de combinatie van twee verschillende peptiligasevarianten, namelijk omniligase-I en thymoligase, voor de modulaire N-naar-C-peptidesynthese van het therapeutische peptide exenatide uit drie fragmenten en daarnaast ook de synthese en cyclisatie van MCoTI-II uit twee fragmenten. Hiervoor is een enzym gebruikt dat peptide-hydraziden genereert, namelijk peptide amidase (PAM). PAM maakt C-terminale peptide-hydraziden toegankelijk, uitgaande van onbeschermde peptide carboxyamiden. Peptide-hydraziden staan bekend als bruikbare tussenproducten in chemo-enzymatische peptide synthese. Wanneer deze, met behulp van gevestigde methodologieën, worden omgezet in hun overeenkomstige thioesters kunnen ze worden gebruikt in enzymligaties, gekatalyseerd door peptiligase varianten. Naast de genoemde toepassingen, beschrijft dit hoofdstuk een gedetailleerde studie over hydrazinolyse gekatalyseerd door PAM.

Samengevat, leidt dit onderzoek tot significante vooruitgang in enzym-gemedieerde ligatietechnologieën. Er zijn nieuwe waardevolle peptiligase varianten ontwikkeld en hun gebruik biedt een algemene eenvoudige route voor de (modulaire) synthese van zowel lineaire als cyclische peptiden, die gunstig zijn voor de wetenschap en voor de productie van therapeutische peptiden. Wij geloven dat het potentieel van enzymatische strategieën veel hoger kan zijn dan die van chemische strategieën, zodat een verdere toename van het gebruik van enzymatische ligatietechnologieën kan worden overwogen. Hierbij zullen nieuwe computermodellen het ontwerp van enzymen als synthetische hulpmiddelen faciliteren en zal de toekomstige ontwikkeling van enzymen versnellen.