

MASTERGRADSOPPGAVE I FARMASI

Design og syntese av cyklopentapeptidbaserte  
CXCR4 antagonister:  
Variasjon av essensiell aromatisk substituent

Av

Jon Åge Aune



Mai 2009

**Veileder Jon Våbenø**

**Avdeling for legemiddelkjemi**

**Institutt for farmasi**

**Det medisinske fakultet**

**Universitetet i Tromsø**



## FORORD

Masteroppgaven ble utført ved Avdeling for legemiddelkjemi, Institutt for farmasi ved Universitetet i Tromsø. Arbeidet ble påbegynt i oktober 2008 og avsluttet i mai 2009.

Jeg vil takke min veileder Jon Våbenø for god veiledning, interessante diskusjoner og et flott samarbeid. Hans bidrag har vært til uvurderlig nytte. Jeg vil også takke Johann Eksteen for gode råd, diskusjoner og opplæring i bruk av peptidsyntesemaskinen Tribute. Jeg vil takke Trude Andersen, Terkel Hansen og Veronika Tørfoss for veiledning i bruk av MS, HPLC og HPLC rensing.

Jeg vil også rette en stor takk til øvrige ansatte og mastergradsstudenter ved Avdeling for legemiddelkjemi IFA, for de faglige diskusjonene og et godt arbeidsmiljø.

Til slutt ønsker jeg å takke min mor og far for hyggelige brev, telefonsamtaler og støtte i studietiden.

Tromsø, mai 2009

Jon Åge Aune



## Innholdsfortegnelse

INTRODUKSJON .....	1
Peptider som legemidler .....	1
CXCR4 og terapeutisk potensial .....	1
CXCR4 antagonister i litteraturen .....	3
Struktur-aktivitets-studier for FC131 .....	5
Målet med oppgaven .....	7
RESULTATER OG DISKUSJON .....	9
Design av målforbindelse 1-6.....	9
Syntese av målforbindelse 1-6.....	11
Syntesestrategi .....	11
Syntese av lineære pentapeptider 7-12 .....	12
Resin .....	14
Linker .....	14
Kløyving fra resin .....	15
Beskyttelsesgrupper på sidekjedene.....	16
Koplingsreagens for syntese av lineært peptid .....	17
N-terminal beskyttelsesgruppe .....	19
Kaiser test .....	20
Head-to-tail cyclisering .....	23
Valg av aktivator til cycliseringen .....	23
Avbeskyttelse av forbindelse 13-18 .....	27
KONKLUSJON .....	31
EKSPERIMENTELT .....	33
Kjemikalieliste med forkortelser .....	33
Kaiser testløsning .....	34
Massespektrometri.....	34
Generell prosedyre for FFPS av 7-12.....	34
Generell prosedyre for cyclisering og avbeskytting.....	35
REFERANSER .....	37
VEDLEGG.....	41



## **SAMMENDRAG**

CXCR4 er en kjemokinreseptor som er involvert i en rekke biologiske prosesser i kroppen, blant annet angiogenese, neurogenese og dannelse av blodceller i embryostadiet. I voksne er CXCR4 funnet å være involvert i sykdommer som HIV, reumatoid artritt og kreft.

I litteraturen finnes det potente CXCR4 antagonister (AMD3100, KRH1636, FC131) som har vist effekt mot HIV-1, reumatoid artritt og kreft. Cyklopentapeptidet FC131 er av de mest potente og har vist høy anti-HIV-1 aktivitet. FC131 inneholder to aminosyrer (Arg<sup>3</sup> og 2-Nal<sup>4</sup>) som er helt avgjørende for antagonistisk aktivitet. I denne oppgaven har det blitt syntetisert analoger av FC131, der 2-Nal<sup>4</sup> har blitt byttet ut med andre aromatiske aminosyrer for å studere struktur-aktivitets-sammenhengen. Valg av nye aminosyrer har basert seg på egenskaper til den aromatiske naftylgruppen i KRH1636 og FC131.





## INTRODUKSJON

### Peptider som legemidler

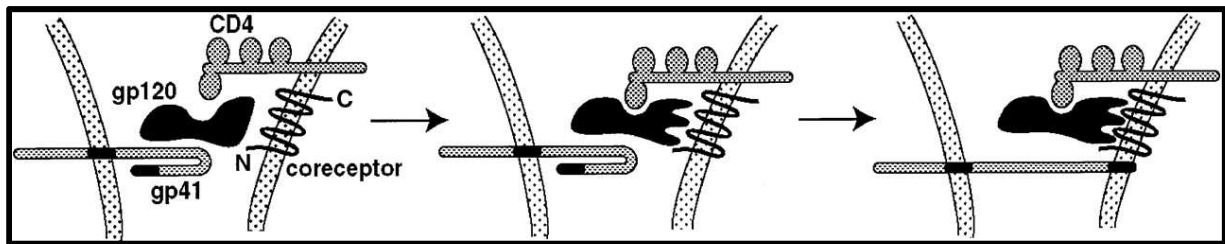
Endogene proteiner og peptider har en viktig rolle i regulering og samhandling av kroppsfunksjoner. De opptrer med høy spesifisitet og potens. Enzymer, hormoner, antistoffer, hemoglobin, myoglobin, hud, hår, brusk og muskler er alle peptider eller proteiner som er viktig for organismen.<sup>1</sup> En utfordring med peptider som legemidler er lav biotilgjengelighet på grunn av polaritet, stor molekylstørrelse og risiko for produksjon av antistoffer.<sup>1</sup> Peptider som legemidler eksisterer, men peptider i sin opprinnelige form er ustabile, da de brytes ned av peptidaser til aminosyrer i gastrointestinaltrakten. Administrering av peptider skjer i dag via injeksjon (intravenøst, intramuskulært og subkutant). Insulin administreres for eksempel subkutant. Utvikling av legemidler som kan administreres peroralt er viktig for å oppnå god compliance og dermed økt effekt av legemiddelet. Det er derfor ønskelig å lage legemidler som har egenskapene til et peptid, men som ikke har utfordringene nevnt ovenfor.

Peptidomimetika blir laget for å etterligne eksisterende peptider i den hensikt å forbedre stabilitet og biotilgjengelighet. Ofte utvikles de i fra peptider som har vist god effekt og har potensial som legemiddel. Syntese av peptidomimetika innebærer endringer av peptider som ikke ville skjedd naturlig, som for eksempel endring av backbone og bruk av unaturlige aminosyrer.

### CXCR4 og terapeutisk potensial

CXCR4 er en kjemokinreseptor som tilhører familien G-protein koplede reseptorer (GPCR). Reseptoren består av sju transmembrane alfaviklinger som er knyttet sammen av ekstra- og intracellulære looper. CXCR4 har en tilnærmet monogam ligand som heter CXCL12, også kalt stromal cell-derived factor (SDF-1).<sup>2</sup> CXCL12 induserer forskjellige fysiologiske funksjoner i embryostadiet som kjemotakse av leukocytter,<sup>3</sup> angiogenese<sup>4</sup> og neurogenese.<sup>5</sup> Det viser seg at CXCR4 reseptoren kan være et angrepspunkt i behandlingen av AIDS.<sup>6 2 7</sup>

Humant immunsviktvirus type 1 (HIV-1) har blitt studert og man vet i dag hvordan HIV-1 angriper immunforsvaret (fig.1). Ved binding til CD4 undergår kapselproteinet gp120 på HIV-1 en konformasjonsendring som eksponerer, danner og stabiliserer bindingen til koreseptoren CCR5 eller CXCR4. Bindingen mellom gp120 og en av koreseptorene fører til penetrering av en annen kapselenhet, gp41, som fester HIV-1-kapselen til membranen. Dette fører til dannelsen av en trimerstruktur som fører til membranfusjon og HIV-1 entrer vertscellen.<sup>8</sup>



**Figur 1.**<sup>9</sup> Skisse av HIV-1 fusjon. I den molekylære mekanismen til HIV-1 blir kapselproteinet gp120 på virusoverflaten bundet til overflateproteinet CD4 samt en koreseptor. Det fører til en membranfusjon hvor viruset trenger inn i cellen og infeksjonen kompletteres.

HIV-1 blir vanligvis overført av R5 stammer. Forkortelsen R5 kommer av at viruset bruker koreseptoren CCR5 som reseptor for å komme inn i cellen. I senere stadier ved utvikling av AIDS er det mer vanlig med X4 stammer som bruker CXCR4 som en koreseptor for å komme seg inn i T-cellene.<sup>9</sup> For en oversikt, se Tsutsumi o.a.<sup>8</sup> og Berger.<sup>9</sup> De nyeste anti-HIV-1 legemidler angriper koreseptoren CCR5. I dag finnes det CCR5-antagonister på markedet som for eksempel Vicriviroc® og Maraviroc®. Det finnes foreløpig ikke CXCR4-antagonister på markedet mot HIV.

CXCR4 er også involvert i kreftmetastaser.<sup>10 11</sup> Det er blitt rapportert at reseptoren CXCR4 uttrykkes på overflaten av flere typer kreftceller, og at det er høye nivåer av CXCL12 i indre organer som er primære mål for kreftmetastaser. For en oversikt, se Tsutsumi o.a. 2007.<sup>8</sup>

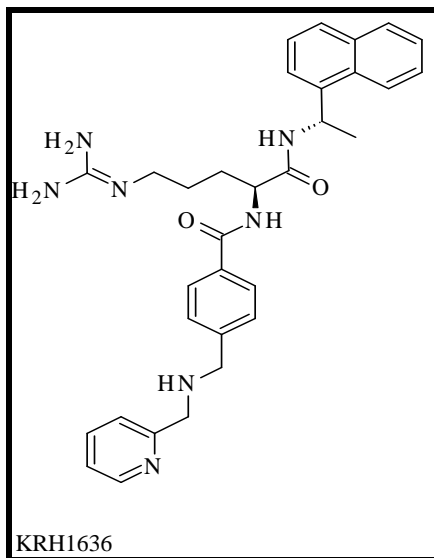
I tillegg er det litteratur som viser at CXCR4 kan være et angrepspunkt i behandling av reumatoid artritt (RA).<sup>12 13</sup> RA er hovedsaklig forårsaket av CD4+ T minneceller som hopper seg opp i betent synovium. CXCR4 er høyt uttrykt på overflaten av T minneceller og konsentrasjonen av CXCL12 er ekstremt forhøyet i synovium til RA pasienter. CXCL12 stimulerer migrering av T minneceller, og binding av ligand inhiberer i tillegg apoptose av T minneceller.<sup>14</sup>

Kjemokinreseptor CXCR4 er et viktig og attraktivt terapeutisk mål for behandling av sykdommene nevnt ovenfor. Cyklopentapeptider representerer et godt utgangspunkt for peptidomimetiske CXCR4 antagonister. Videre undersøkelser av struktur-aktivitets-sammenhenger for Xaa<sup>4</sup> i FC131, vil være et viktig bidrag for å utvikle peptidomimetiske CXCR4 antagonister.

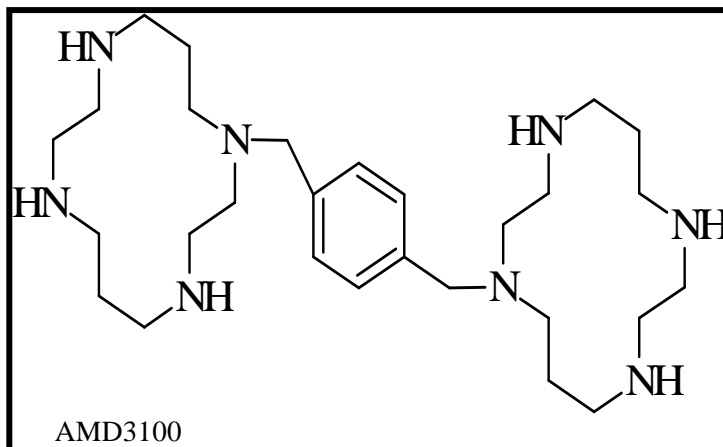
Det kan være risikabelt å blokkere CXCR4-CXCL12. CXCR4 uttrykkes ved utvikling av endotelceller i karsystemet. Forsøk viser at mus som mangler CXCR4-CXCL12 har defekt form på de store blodårene som forsyner gastrointestinaltrakten. I tillegg viser det seg at mus som mangler CXCR4 dør i livmoren og har defekter i blodåredannelse, defekt produksjon av blodceller (hematopoese) og utvikling av hjertet i embryo.<sup>15</sup>

### CXCR4 antagonister i litteraturen

Det har blitt utviklet flere potente CXCR4 antagonister.<sup>16</sup> To av dem er KRH1636<sup>17</sup> (fig.2) og AMD3100<sup>18, 19</sup> (fig.3). Disse lavmolekylære strukturene har vist seg å inhibere HIV-1 via CXCR4 antagonisme.

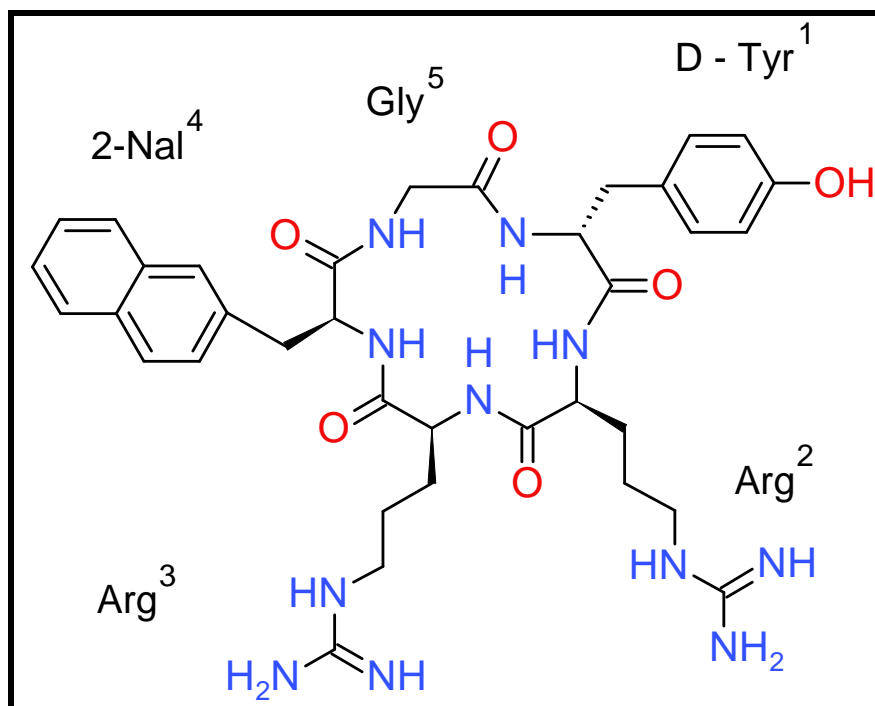


**Figur 2.** CXCR4 antagonisten KRH1636 har vist anti-HIV-1 egenskaper.



**Figur 3.** CXCR4 antagonisten AMD3100 har vist anti-HIV-1 egenskaper.

Utgangspunktet for FC131 var et cyklisk peptid på 18 aminosyrer isolert fra hesteskokrabbeartene (*Tachypleus tridentatus* og *Limulus polyphemus*).<sup>20</sup> Fra dette peptidet ble det optimalisert et  $\beta$ -sheet liknende peptid på 14 aminosyrer (T140) som viste god effekt mot HIV-1.<sup>21</sup> De strukturkrav som var nødvendig for å binde til CXCR4 viste seg å være fire aminosyresidekjeder. Det var Arg<sup>2</sup>, 2-Nal<sup>3</sup>, Tyr<sup>5</sup> og Arg<sup>14</sup>. I 2003 klarte Fujii o.a.<sup>22</sup> å redusere peptidet på 14 aminosyrer til et cyklopentapeptid. De oppdaget at cykliske sekvenser basert på Arg-Arg-2-Nal-Gly-Tyr viste anti-HIV-1 aktivitet. I forsøket på å forkorte peptidet ble det benyttet L/D-Arg, L/D-2-Nal og L/D-Tyr i tillegg til Gly som spacer. Av de ulike variantene som ble syntetisert, viste strukturen [cyclo-(Arg<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-2-Nal<sup>3</sup>-Gly<sup>4</sup>-D-Tyr<sup>5</sup>)], i dag kjent som FC131 (fig.4), å ha mest potent CXCR4 antagonistisk aktivitet. Per dags dato er FC131 (IC<sub>50</sub> = 4 nM) regnet som lead compound for peptidomimetisk CXCR4 antagonister og vil være utgangspunktet for denne mastergradsoppgaven.



**Figur 4.** Strukturformel til CXCR4 antagonisten FC131. Den regnes som lead compound for utvikling av peptidomimetiske antagonister for CXCR4.

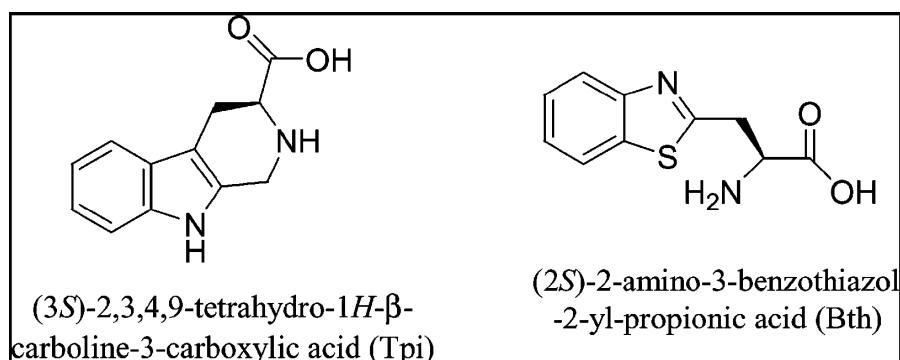
Fellestrekk for AMD3100, KRH1636 og FC131 er at alle tre strukturene innehar en kombinasjon av basiske sentre med positiv ladning og aromatiske benzenringer.

#### Struktur-aktivitets-studier for FC131

Studier har vist at når aminosyrene Xaa<sup>1,2,3,4</sup> ble byttet ut med alanin, ble det en signifikant lavere CXCR4 antagonistisk aktivitet og anti-HIV-1 aktivitet sammenlignet med FC131. Å erstatte aminosyre Arg<sup>2</sup> på FC131 med alanin gav ingen markant nedgang i effekt på antagonistisk aktivitet (Ala<sup>2</sup>FC131 IC<sub>50</sub> = 63 nM). Arg<sup>3</sup> og 2-Nal<sup>4</sup> ble vist å være absolutt nødvendig for CXCR4 antagonistisk aktivitet. Ved utbytting av de respektive aminosyrene forsvant aktiviteten totalt (IC<sub>50</sub> > 1000nM)<sup>23</sup> (tabell 1). I en studie av Ueada o.a. 2007<sup>16</sup> ble D-Tyr<sup>1</sup> byttet ut med D-Ala<sup>1</sup>. Det viste seg at forbindelsen fortsatt hadde moderat aktivitet (Ala<sup>1</sup>FC131 IC<sub>50</sub> = 130 nM). Det betyr at fenolgruppen på D-Tyr<sup>1</sup> og guanidingruppen på Arg<sup>2</sup> ikke spiller en kritisk rolle i reseptorbindingen.

Siden 2-Nal<sup>4</sup>, sammen med Arg<sup>3</sup>, er avgjørende for vesentlig aktivitet, har det blitt gjort noen forsøk på å optimalisere 2-Nal<sup>4</sup> med flere analoger. 2-Nal<sup>4</sup> har blitt erstattet med tryptofan (Trp) og (2*S*)-2-amino-3-benzothiazol-2-yl-propionic acid (Bth), hvor begge analogene viste sterk CXCR4 reseptoraffinitet, henholdsvis (Trp<sup>4</sup>FC131 IC<sub>50</sub>=13nM) og (Bth<sup>4</sup>FC131 IC<sub>50</sub>=18 nM), men fortsatt litt lavere enn lead compound (FC131 IC<sub>50</sub> = 4 nM (tabell 1).

Aminosyrer i posisjon Xaa<sup>4</sup> med D-konfigurasjon har vist lavere aktivitet enn L-konfigurasjon. For D-Bth var aktiviteten 14 ganger lavere enn for FC131 og for D-2-Nal var aktiviteten mer enn 20 ganger lavere enn for FC131.<sup>24</sup> (3*S*)-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid (Tpi) er kovalent bundet til backbone, noe som medfører begrensninger i konformasjonell frihet (fig.5). Her viste det seg ugunstig og ingen økt aktivitet (Tpi<sup>4</sup>FC131 IC<sub>50</sub> = >1000 nM).<sup>24</sup> Selv om 2-Nal<sup>4</sup> viser seg å være essensiell for aktivitet er det kun disse tre forsøkene litteraturen har å vise til. Med de seks nye forbindelsene syntetisert i denne mastergradsoppgaven vil det totalt være ni forbindelser.



**Figur 5.** Tpi: sidekjeden (indolringen, jfr. Trp) er kovalent bundet til backbone, noe som medfører en mer låst konformasjon sammenlignet med for eksempel Bth.

**Tabell 1.** Ala<sup>3</sup>- eller Ala<sup>4</sup>-substituerte analoger 3,4,7,8 viste signifikant mindre CXCR4 antagonistisk- og anti-HIV-1-aktivitet opp til 1000 nM. L/D-Ala<sup>2</sup>-substituerte analoger, 2 og 6, og D-Ala<sup>1</sup>-substituert analog 5 opprettholdt moderat effekt. Det viser at sidekjedene i Arg<sup>3</sup> og 2-Nal<sup>4</sup> er essensielle for CXCR4 antagonistisk aktivitet.

Peptid	Sekvens	IC <sub>50</sub> (nM)
1	cyclo(-D-Tyr-L-Arg-L-Arg-L-2-Nal-Gly-)	4
2	cyclo(-D-Tyr-L-Ala-L-Arg-L-2-Nal-Gly-)	63
3	cyclo(-D-Tyr-L-Arg-L-Ala-L-2-Nal-Gly-)	>1000
4	cyclo(-D-Tyr-L-Arg-L-Arg-L-Ala-Gly-)	>1000
5	cyclo(-D-Ala-L-Arg-L-Arg-L-2-Nal-Gly-)	130
6	cyclo(-D-Tyr-D-Ala-L-Arg-L-2-Nal-Gly-)	230
7	cyclo(-D-Tyr-D-Arg-L-Ala-L-2-Nal-Gly-)	>1000
8	cyclo(-D-Tyr-D-Arg-L-Arg-L-Ala-Gly-)	>1000
9	cyclo(-D-Tyr-L-Arg-L-Arg-L-Trp-Gly-)	13
10	cyclo(-D-Tyr-L-Arg-L-Arg-L-Bth-Gly-)	18
11	cyclo(-D-Tyr-L-Arg-L-Arg-L-Tpi-Gly-)	>1000

### Målet med oppgaven

Med utgangspunkt i det cycliske pentapeptidet FC131 vil det bli syntetisert seks nye FC131 analoger hvor aminosyren i posisjon 4 er endret, i den hensikt å undersøke struktur-aktivitets-sammenheng.

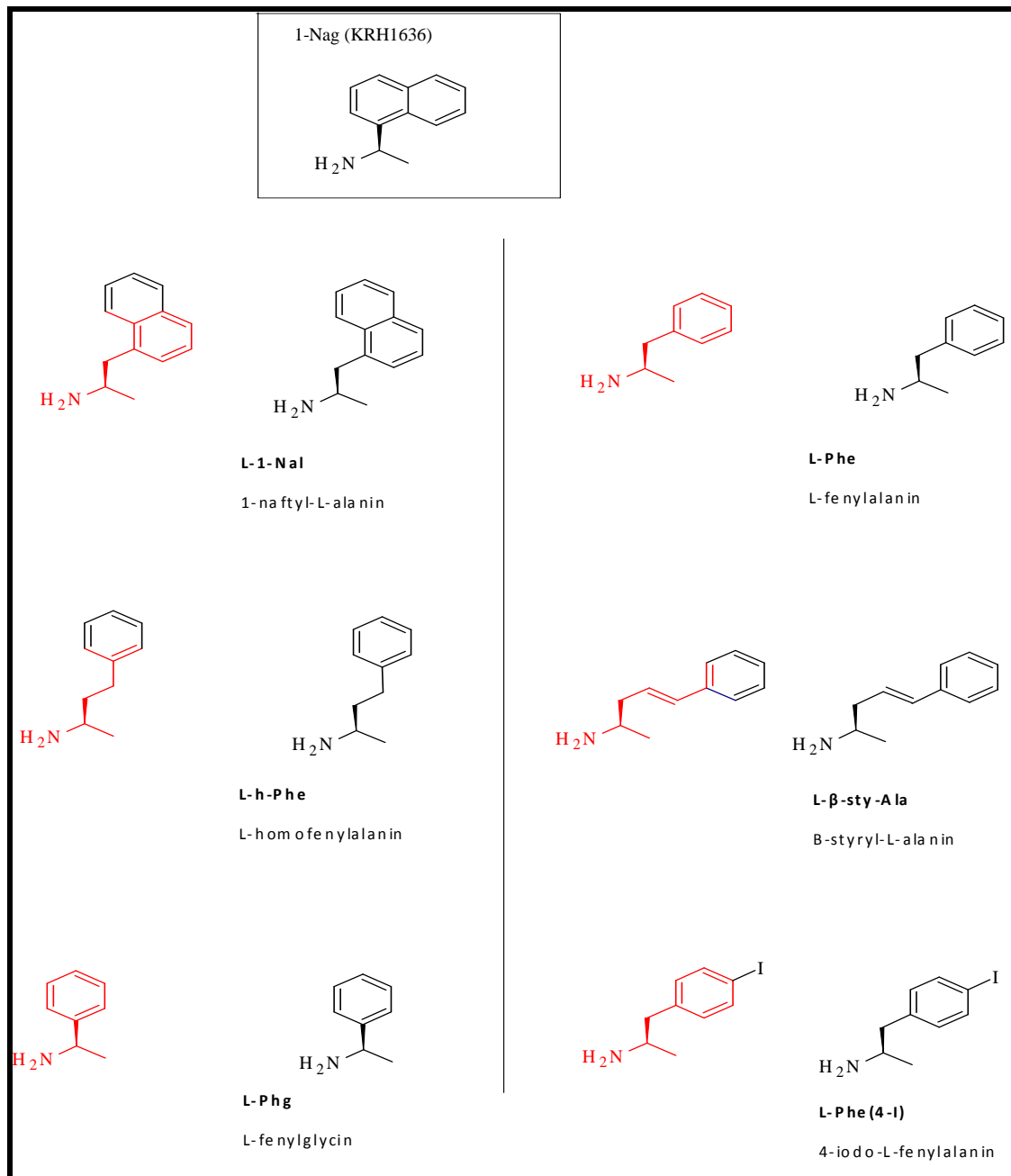




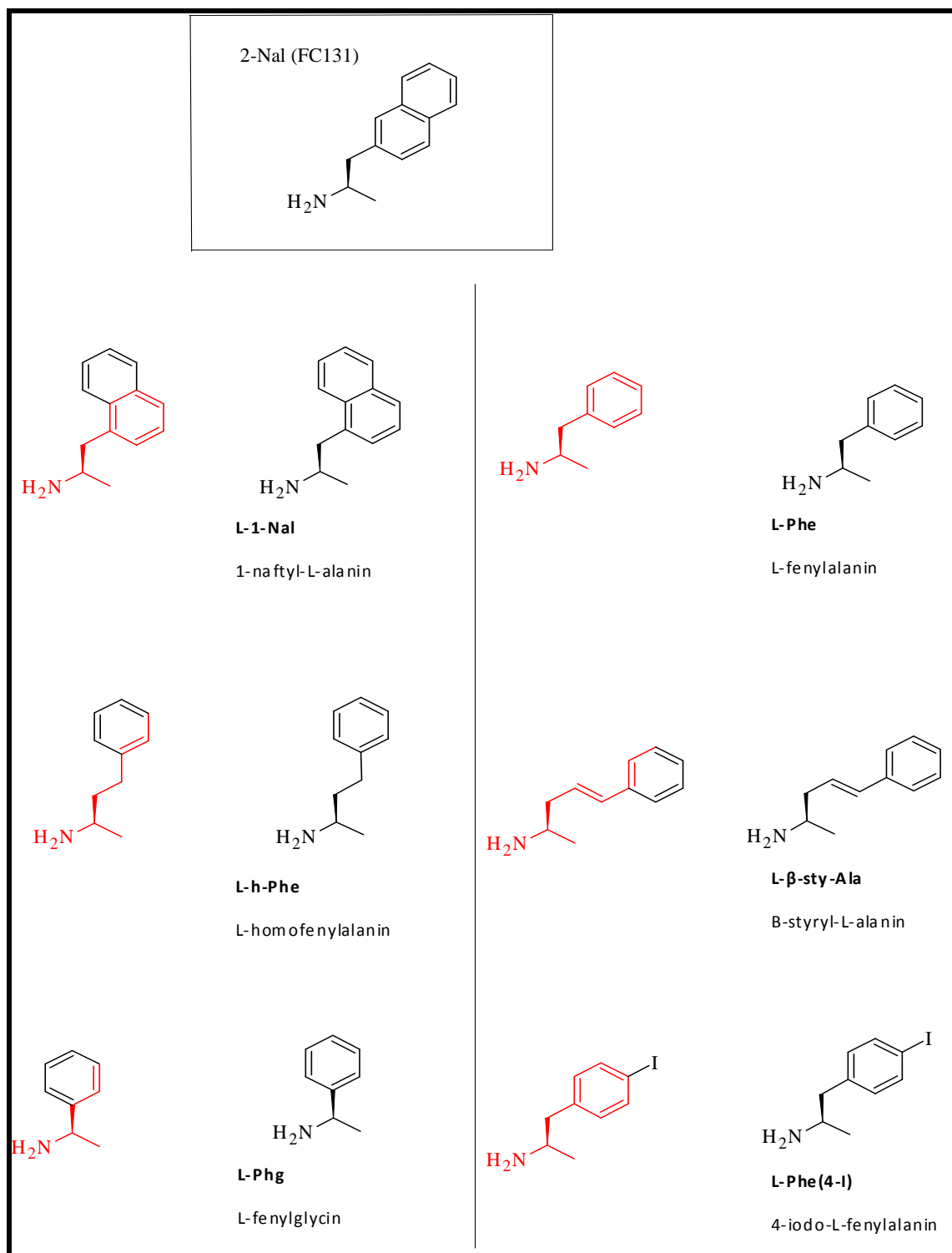
## RESULTATER OG DISKUSJON

### Design av målforbindelse 1-6

Aminosyrene er valgt på bakgrunn av naftylgruppen i de potente CXCR4 antagonistene KRH1636 og FC131. I fig.6 og fig.7 er de nye aminosyrene satt inn. De strukturtrekk de har til felles med 1-Nag og 2-Nal er farget rødt. En oversikt over aminosyresekvensen for målforbindelsene i denne oppgaven er gitt i tabell 2.



**Figur 6.** Struktursammenligning for naftylglycin i KRH1636 og de utvalgte aminosyrene i oppgaven. Rød struktur er det den utvalgte aminosyren har til felles med naftylglycin i KRH1636.



**Figur 7.** Struktursammenligning for 2-naftyl i FC131 og de utvalgte aminosyrene i oppgaven. Rød struktur er det den utvalgte aminosyren har til felles med 2-naftyl i FC131.

**Tabell 2.** Oversikt over målforbindelsene som vil bli syntetisert, cyclisert og avbeskyttet.

Forbindelse	Forkortelse	Sekvens
<b>1</b>	L-1-Nal <sup>4</sup> FC131	Cyclo(D-Tyr <sup>1</sup> -Arg <sup>2</sup> -Arg <sup>3</sup> -1-Nal <sup>4</sup> -Gly <sup>5</sup> )
<b>2</b>	L-Phe <sup>4</sup> FC131	Cyclo(D-Tyr <sup>1</sup> -Arg <sup>2</sup> -Arg <sup>3</sup> -Phe <sup>4</sup> -Gly <sup>5</sup> )
<b>3</b>	L-h-Phe <sup>4</sup> FC131	Cyclo(D-Tyr <sup>1</sup> -Arg <sup>2</sup> -Arg <sup>3</sup> -h-Phe <sup>4</sup> -Gly <sup>5</sup> )
<b>4</b>	L-β-sty-Ala <sup>4</sup> FC131	Cyclo(D-Tyr <sup>1</sup> -Arg <sup>2</sup> -Arg <sup>3</sup> -β-sty-Ala <sup>4</sup> -Gly <sup>5</sup> )
<b>5</b>	L-Phg <sup>4</sup> FC131	Cyclo(D-Tyr <sup>1</sup> -Arg <sup>2</sup> -Arg <sup>3</sup> -Phg <sup>4</sup> -Gly <sup>5</sup> )
<b>6</b>	L-Phe(4-I) <sup>4</sup> FC131	Cyclo(D-Tyr <sup>1</sup> -Arg <sup>2</sup> -Arg <sup>3</sup> -Phe(4-I) <sup>4</sup> -Gly <sup>5</sup> )

## Syntese av målforbindelse 1-6

### Syntesestrategi

Den overordnede strategien for syntese av **1-6**:

1. syntetisere lineære pentapeptider (**7-12**) ved hjelp av fast-fase peptidsyntese
2. head-to-tail cyclisering i løsning (**13-18**)
3. avbeskyttelse av sidekjeder
4. rensing

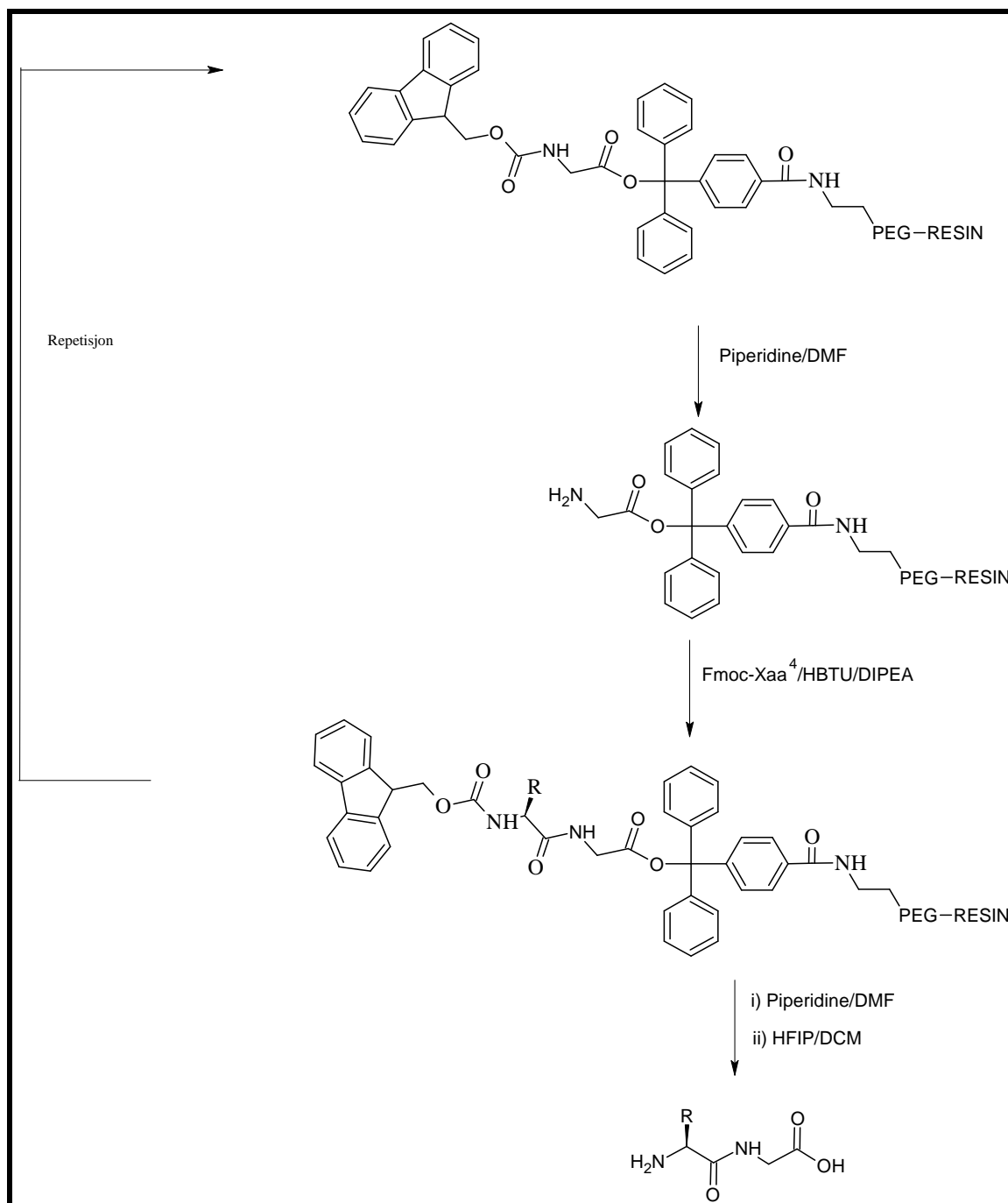
Peptidene er nummerert etter hvilket syntesetrinn de er i. Det betyr for eksempel at peptid 1,7,13 har samme peptidsekvens, hvor 1 er målforbindelsen.

## **Syntese av lineære pentapeptider 7-12**

Fast-fase peptidsyntese (FFPS) ble først beskrevet av Merrifield.<sup>25</sup> FFPS er en synteseteknikk hvor den C-terminale enden blir bundet til et resin, og kopling av aminosyrer skjer i fra C-terminal til N-terminal retning. Den generelle prosedyren er repeterende sykluser med kopling og avbeskyttelse. Aminosyren som koples på det voksende peptidet er beskyttet på N-terminal ende og eventuelt sidekjeden for å hindre sidereaksjon. Syntese av en peptidkjede på et uløselig fast stoff har åpenbare fordeler. Separasjon av midlertidig peptid fra reagenser og løsningsmiddel kan effektivt gjøres ved filtrering og vasking. Det kan brukes et overskudd av reagenser for å sikre at reaksjonen blir fullstendig og tap av produkt kan bli minimalisert ved at peptidet forblir festet til resinet under hele syntesen. Synteseteknikken lar seg automatisere og i denne oppgaven er alle lineære peptider syntetisert ved bruk av en halvautomatisk syntesemaskin, PTA Tribute.

Prinsippet for synteseteknikken FFPS er vist i fig.8.

Strukturen til de lineære beskyttede pentapeptidene er vist i fig.12 side 21.



**Figur 8.** Den C-terminale aminosyren er festet til en syrelabil link, her 4-carboxytrityl. De reaktive sidekjedene er beskyttet med syrelabile beskyttelsesgrupper. En base, 20 % piperidine i DMF, blir tilsatt for å avbeskytte Fmoc på den N-terminale enden av aminosyren. Kopling av neste aminosyre skjer i en løsning av DMF med koplingsreagens. Når alle koplignene er utført fjernes produktet fra resinet med en syre, for eksempel TFA eller den sure alkoholen HFIP.

## **Resin**

Resin er det uløselige faste stoffet som den C-terminale enden er festet i. Resinet svelles med diklormetan (DCM) og koplingen av aminosyrer foregår inne i den polymere matrisen. Det finnes forskjellige resiner som polystyren, polyamid og polyetylenglykol. I dag er polyetylenglykol foretrukket, da de andre har vist tendenser til nedbrytning og ujevn fordeling av reagenser i resinet.<sup>26</sup> I denne oppgaven ble det brukt Fmoc-Gly NovaSyn TGT som er basert på polyetylenglykol. Fmoc-Gly NovaSyn TGT har en syrelabil trityllinker som i denne oppgaven er utmerket ved kløyving.

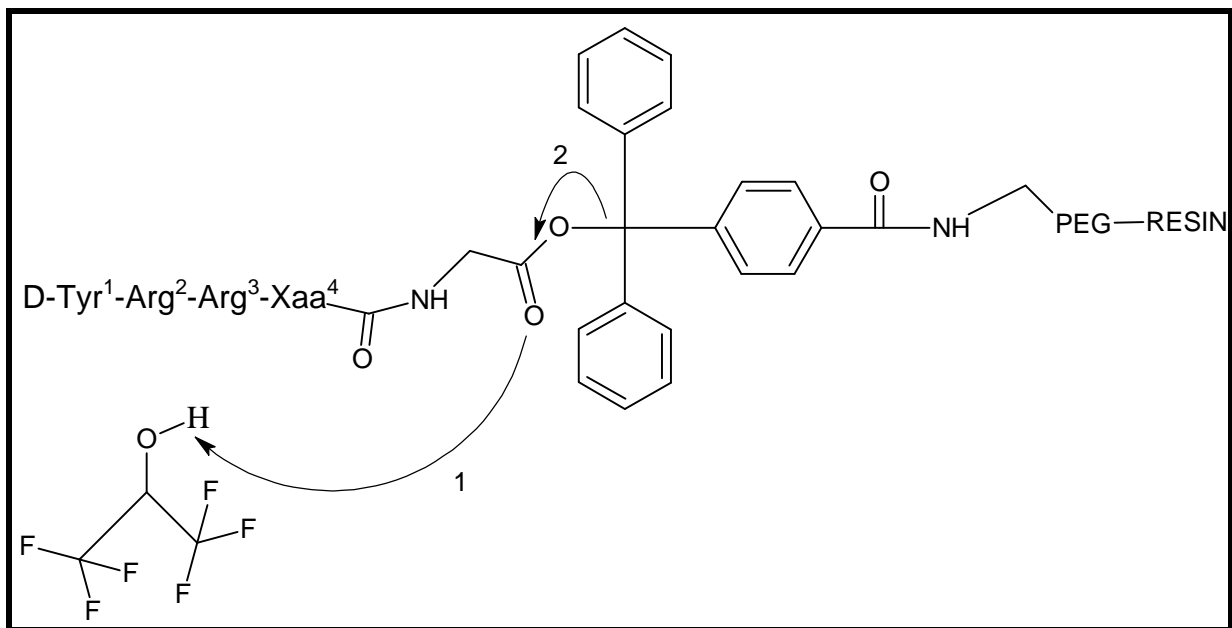
## **Linker**

Til resinet er det koplet en syrelabil linker. Den fungerer som et bindeledd mellom resinet og C-terminale enden glycin. Det gjør at man har en reversibel kopling mellom peptidet og resinet, i tillegg oppnår man beskyttelse av den C-terminale enden av glycin. Valg av linker er viktig med tanke på kløyving. Det er ønskelig at den syrelabile linkerens skal bli kløyvd og samtidig beholde de syrelabile beskyttelsesgruppene på sidegruppene intakt. Det er derfor valgt en linker som er mer syrelabil enn sidegruppens beskyttelsesgrupper. I denne oppgaven er det valgt 4-carboxytrityllinker som kløyves med den sure alkoholen hexafluoro-2-propanol (HFIP).<sup>27</sup>

## Kløyving fra resin

Til kløyving av resin ble det brukt HFIP/DCM i forholdet 1:3. HFIP er en sur alkohol som kløyver av den syrelabile linkerens (fig.9) og som ikke avbeskytter beskyttelsesgruppene på sidekjedene. Resinet blandes med HFIP/DCM i tre minutter og filtreres. Under kløyvingen dannes det kationer og det er nødvendig å filtrere for å unngå mulige sideraksjoner. Prosessen blir gjentatt to ganger.

Kløyving med AcOH:TFE:DCM (1:1:3), som er anbefalt av produsent, gir peptider som ikke er egnet for cyclisering.<sup>28</sup>



**Figur 9.** Kløyving fra resin. Karbonylgruppen protoneres av HFIP (1) og 4-carboxytrityllinkerens kløyves av(2).

## Beskyttelsesgrupper på sidekjedene

De aminosyrene som har reaktive sidegrupper må beskyttes for å hindre at de funksjonelle gruppene binder seg til det voksende peptidet. Det finnes flere beskyttelsesgrupper og valget avhenger av funksjonell sidegruppe og hvor syrelabil beskyttelsesgruppe som ønskes. I denne oppgaven er det behov for beskyttelsesgrupper på sidekjedene til tyrosin (Tyr) og arginin (Arg). For Arg finnes det flere beskyttelsesgrupper å velge mellom. 2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl (Pmc)<sup>29</sup> brukes i FFPS i dag, men erstattes oftere av Pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf). Pbf<sup>30</sup> er den mest syrelabile beskyttelsesgruppa og et førstevalg. For Tyr finnes *tert*-Butyl (*t*Bu), trityl (Trt), *tert*-butyldimethylsilyl (TBDMS). *t*Bu anbefales i rutinesyntese.<sup>31</sup>

Pbf og *t*Bu avbeskyttes begge med bruk av TFA i 30 minutter. I denne oppgaven er beskyttelsesgruppen *t*Bu benyttet for Tyr. For Arg er det benyttet Pbf. De er ofte anvendte beskyttelsesgrupper for de respektive aminosyrer og gir god beskyttelse. De blir ikke kløyvd av HFIP.

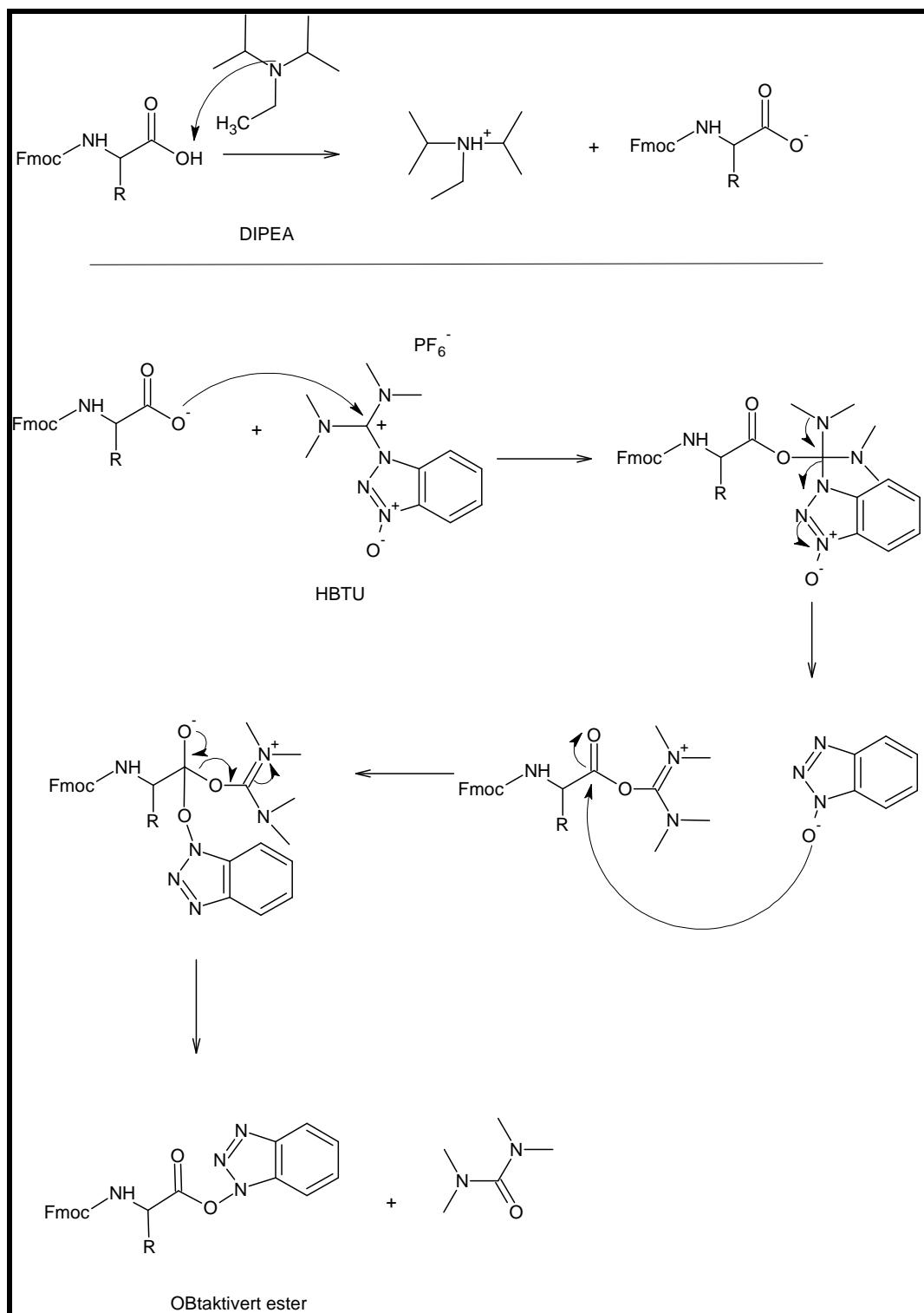


## Koplingsreagens for syntese av lineært peptid

For å få dannet den ønskede amidbindingen er det nødvendig å aktivere karboksylsyregruppen ved hjelp av en koplingsreagens. Det finnes flere ulike typer reagenser, blant annet 1-H-Benzotriazolium,1-[bis(dimethylamino)methylene]-, 3-oxide, hexafluorophosphate(1-) (HBTU), 2-(7-Aza-1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HATU), Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate (PyBOP) og diisopropylcarbodiimide (DIC).

HATU danner 9-azabenzotriazolylester og har gode egenskaper ved vanskelige koplinger. HBTU og PyBOP danner en benzotriazolylester. En fordel med disse to reagensene er at de har en ekstremt rask aktiveringsprosess. Alle disse forbindelsene er svake aktivatorer noe som er viktig for å bevare selektivitet. En for sterk aktivering av karboksylsyregruppen kan gi overaktiverte intermediater som gir sidereaksjoner. I denne oppgaven ble det brukt HBTU, som gir en aktivert Obt-ester (fig.10).

For å aktivere karboksylgruppen på Fmoc-beskyttet aminosyrer under kopling og cyclisering, er det nødvendig å bruke en base. Basen må være sterisk hindret for å unngå kløyving av Fmoc. For alle koplinger i denne oppgaven ble den sterisk hindrede basen diisopropyletylamin (DIPEA) valgt (fig.10).



**Figur 10.** Reaksjonsmekanisme for HBTU som resulterer i OBtaktivert ester.

## N-terminal beskyttelsesgruppe

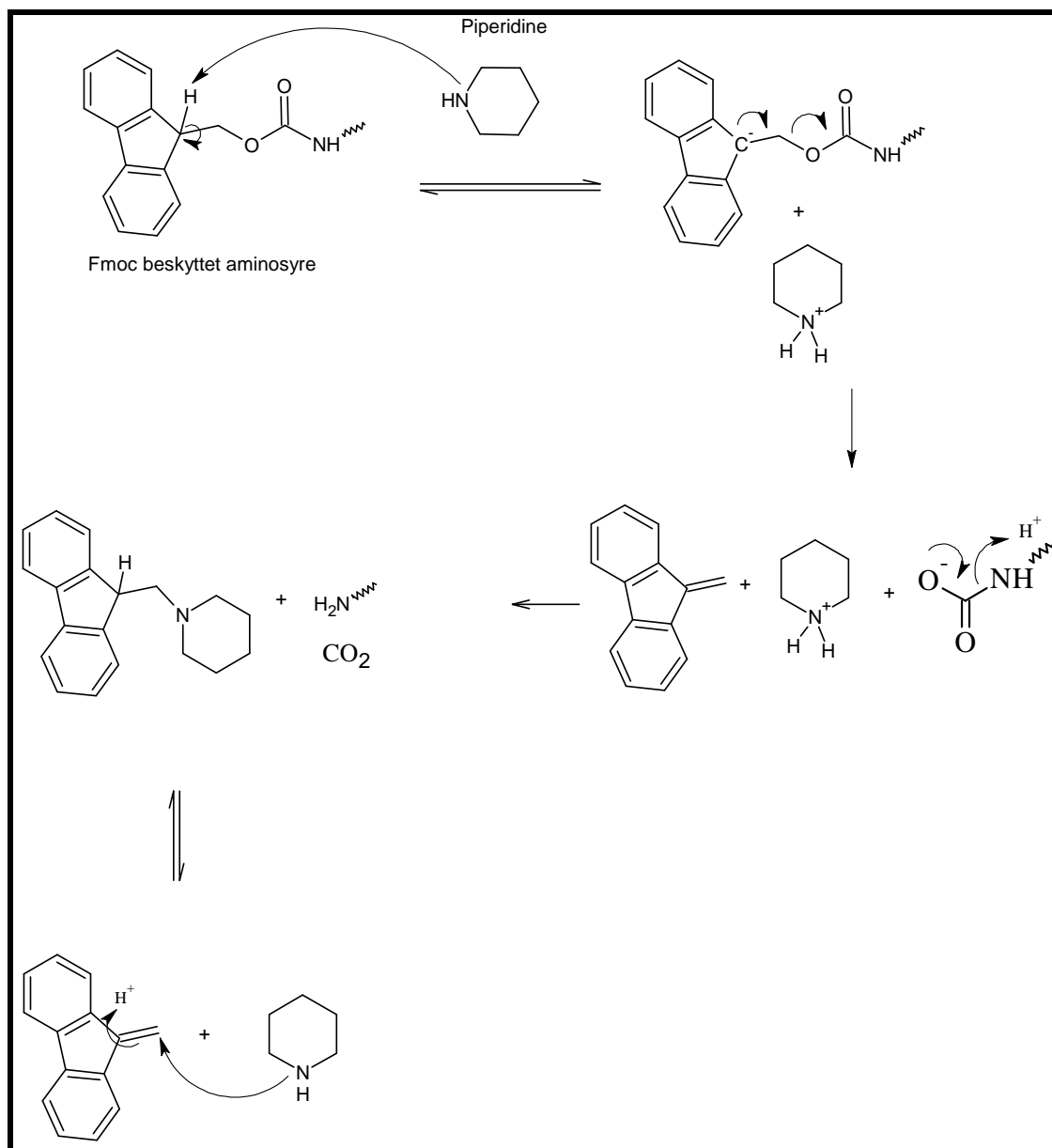
I den originale artikkelen til Merrifield<sup>25</sup> blir det brukt aktiverte aminosyrer med N $\alpha$ -t-butoxycarbonyl (Boc) beskyttelse under syntesen. For hver aminosyre som blir koplet på innebærer det avbeskyttelse av Boc med en svak syre som for eksempel TFA. Dette medfører at beskyttelsesgruppene på sidekjedene og koplingen mellom aminosyre og resin er nødt til å være mer syrestabile. For å fjerne disse beskyttelsesgruppene brukes hydrogenfluorid (HF). Det er en syre som det kan være risikofylt å jobbe med, da den er etsende.

Fmoc/*t*Bu FFPS<sup>32</sup> er en parallell syntesestrategi til Merrifield. Den er basert på en strategi hvor man benytter baselabile N $\alpha$ -Fmoc aminosyrer. På de funksjonelle sidekjedene og mellom resin og første aminosyre bruker man syrelabile grupper. Ved å anvende syre- og baselabile reagenser på respektive steder oppnås selektivitet. Det gjør at man kan fjerne en midlertidig beskyttelsesgruppe (Fmoc) med en base uten å forstyrre de syrelabile beskyttelsesgruppene. Det er også en fordel å slippe bruk av HF, som kan være farlig i bruk.

Det finnes i dag linkere som frigjør peptidet ved bruk av svært svak syre eller fluoridion.<sup>33</sup> Det er nyttig hvis man ønsker å beholde beskyttelsesgruppene på sidekjedene inntakt ved frigjøring av peptid fra resin, som i dette arbeidet.

I denne oppgaven er det valgt Fmoc (9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl). Det er en N-terminal beskyttelsesgruppe som kan bli kløvt med en base. Det fører til at de syrelabile beskyttelsesgruppene på sidekjedene og den kovalente koplingen til linker holdes intakt. Fmoc blir kløvt med 20 % piperidine i DMF (fig.11).

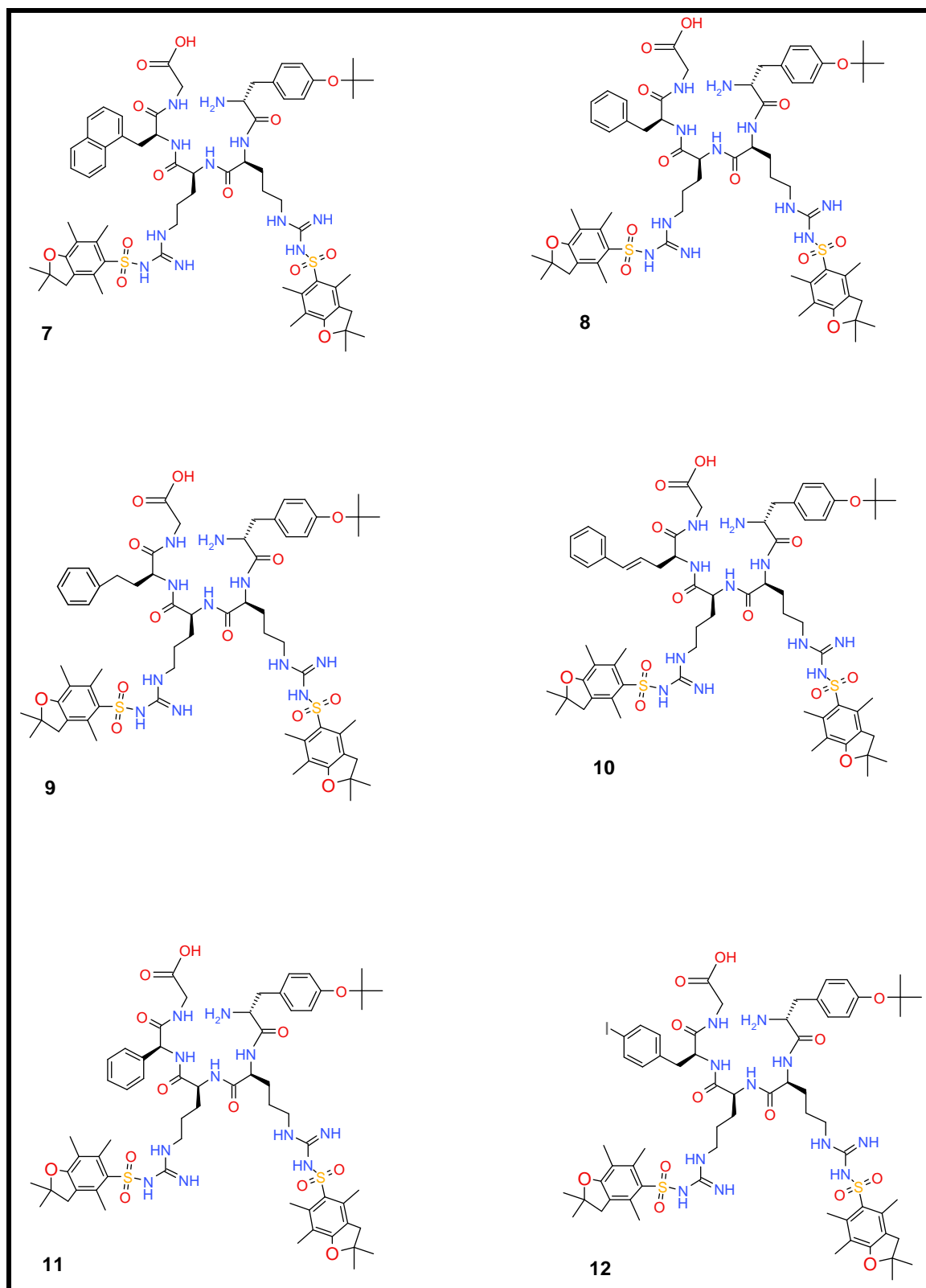
Det er kjent at i lengre peptider kan avbeskyttelse av Fmoc være ufullstendig, selv med høye konsentrasjoner av piperidine. 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) er en sterkere base og kan være et alternativ, da den har vist rask avbeskyttelse. Tilsetning av 2 % piperidine vil være nyttig for å fange opp dibenzofulvene.



**Figur 11.** Avbeskyttelse av Fmoc fra en aminosyre. Piperidine plukker opp et proton og det dannes et carbanion, dibenzocyclopentadienide anion. Elektronparet slår ut og danner dibenzofulvene. Det er et sideprodukt som blir bundet opp av piperidine. Mekanismen for kløyving er en E1cb (elimination conjugate base).

### Kaiser test

Kaiser test er en sensitiv testmetode for å teste om det er frie aminer tilstede under koplingsprosessen i Fmoc fast-fase peptidsyntese.



**Figur 12.** En oversigt over de syntetiserede lineære pentapeptidene. Forbindelse 7-12 er: **7)** L-1-Nal<sup>4</sup>FC131, **8)** L-Phe<sup>4</sup>FC131, **9)** L-h-Phe<sup>4</sup>FC131, **10)** L-β-sty-Ala<sup>4</sup>FC131, **11)** L-Phg<sup>4</sup>FC131 og **12)** L-Phe(4-I)<sup>4</sup>FC131.

Etter syntese av de lineære peptidene ble det utført massespektrometri (MS). Resultatene er samlet i tabell 3 og unntak i forbindelse med syntesen er kommentert under.

**Tabell 3.** Oversikt over teoretisk beregnet masse og den observerte masse til de lineære beskyttede pentapeptidene ved bruk av MS

Peptid	Beregnet masse (g/mol)	Observert masse [M+H] <sup>+</sup> (g/mol)	Vedlegg
7) L-1-Nal <sup>4</sup> FC131	1307,6	1252,7	1
8) L-Phe <sup>4</sup> FC131	1257,6	1258,7	2
9) L-h-Phe <sup>4</sup> FC131	1271,6	1272,8	3
10) L-β-sty-Ala <sup>4</sup> FC131	1283,6	1284,4	4
11) L-Phg <sup>4</sup> FC131	1243,6	1244,5	5
12) L-Phe(4-I) <sup>4</sup> FC131	1383,4	1384,5	6

#### Peptid 7

MS-spekter (vedlegg 1) viste en molekylmasse på 1252,7 g/mol for peptid 7. Det var ikke teoretisk beregnet vekt for pentapeptidet (tabell 3). Peptidprøven ble liggende fire dager i prøveglasset, hvor det var tilsatt 0,1M maursyre (HCOOH) i metanol. Det antas at beskyttelsesgruppen *tert*-butyl (57 g/mol) på tyrosin har blitt spaltet av før det ble kjørt MS.

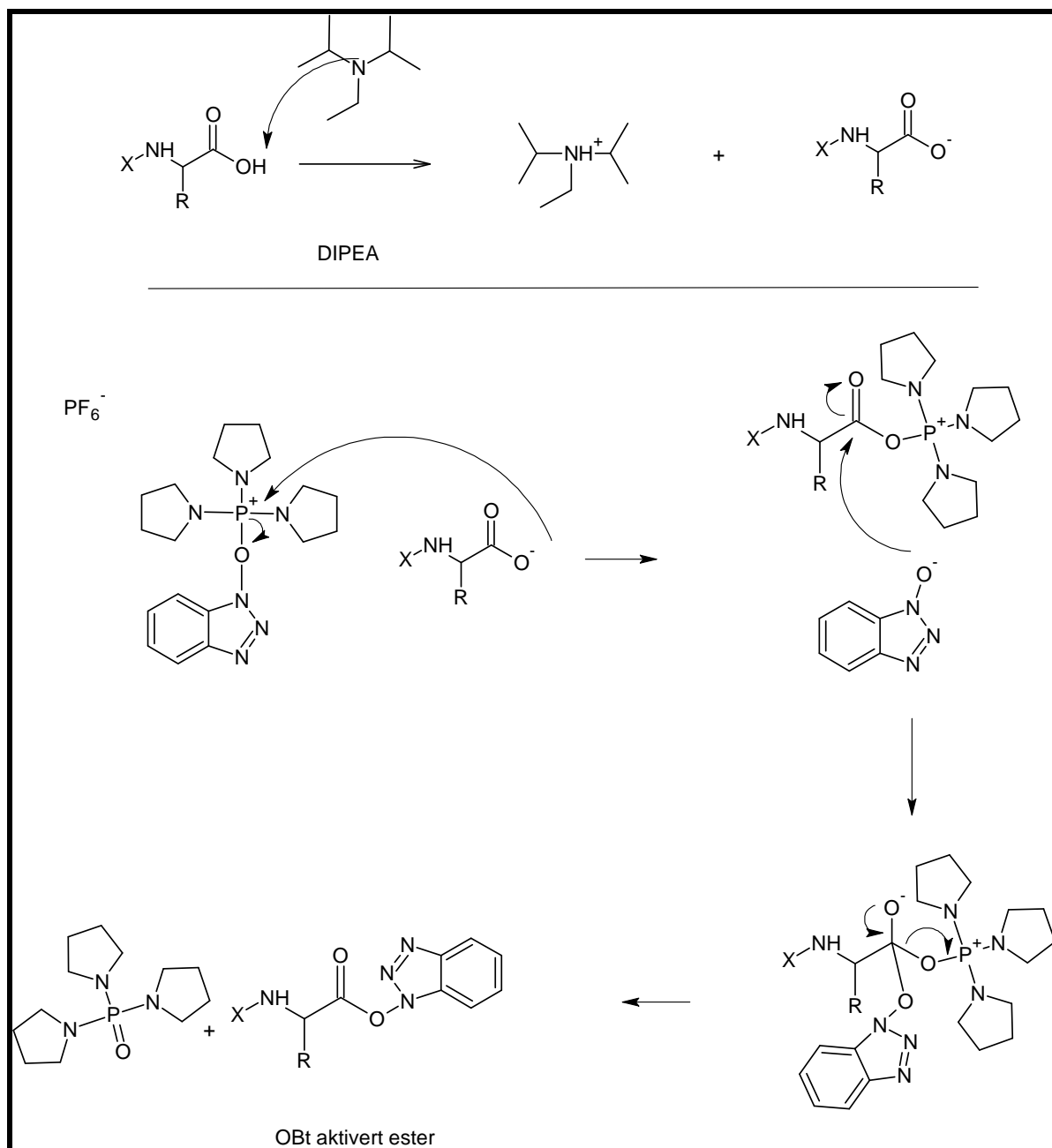
## Head-to-tail cyclisering

I cycliske pentapeptider vil ringspenningen være større sammenlignet med cyklopeptider med flere aminosyrer. Dette gjør det vanskeligere å danne head-to-tail amidbinding.

Cyklodimerisering til et cyclodecapeptid kan inntreffe. En effektiv måte å unngå det er å ha fortynnet løsning. Det vil gi større avstand mellom hvert peptid og intermolekulære reaksjoner unngås. Sterisk hindring har betydning for den C-terminale aminosyren. Det viser seg at de peptidene med små C-terminale aminosyrer er enklere å cyclisere. For N-terminale aminosyrer er orientering av sidekjeden i N-terminale aminosyren (konfigurasjon) en dominerende faktor for å oppnå god cyclisering og ikke størrelsen på sidekjeden. Det er holdepunkter for at cycliske pentapeptider som inneholder bare en D-aminosyresidekjede er enklere å syntetisere enn de som inneholdt to eller tre nærliggende D-aminosyresidekjer. <sup>34</sup> Cyclisering vil skje mellom D-Tyr<sup>1</sup> og Gly<sup>5</sup>. Fordelen med å ha Gly som startaminosyre er at den ikke har noen sidegruppe og er akiral. Det gjør at man unngår rasemisering. Biologisk effekt av proteiner og peptider endogent avhenger av konfigurasjonen til backbone. Det er viktig å unngå rasemisering i peptidsyntese, noe som kan skje i alle de 19 optisk aktive aminosyrene. Det finnes ulike mekanismer for rasemisering. Protonet på  $\alpha$ -karbonet blir ekstra surt når karboksylgruppen er aktivert. En deprotonering av  $\alpha$ -karbonet fører til at carbanion-intermediatet kan reprotonere. Fjerning og kopling av det sure protonet rett etterpå, er en mekanisme for rasemisering. Gly er en liten aminosyre og derfor gunstig å ha på den C-terminale enden. D-Tyr har en konfigurasjon som er gunstig for N-terminale enden. En cyclisering mellom de to aminosyrene vil på bakgrunn av dette være gunstig.

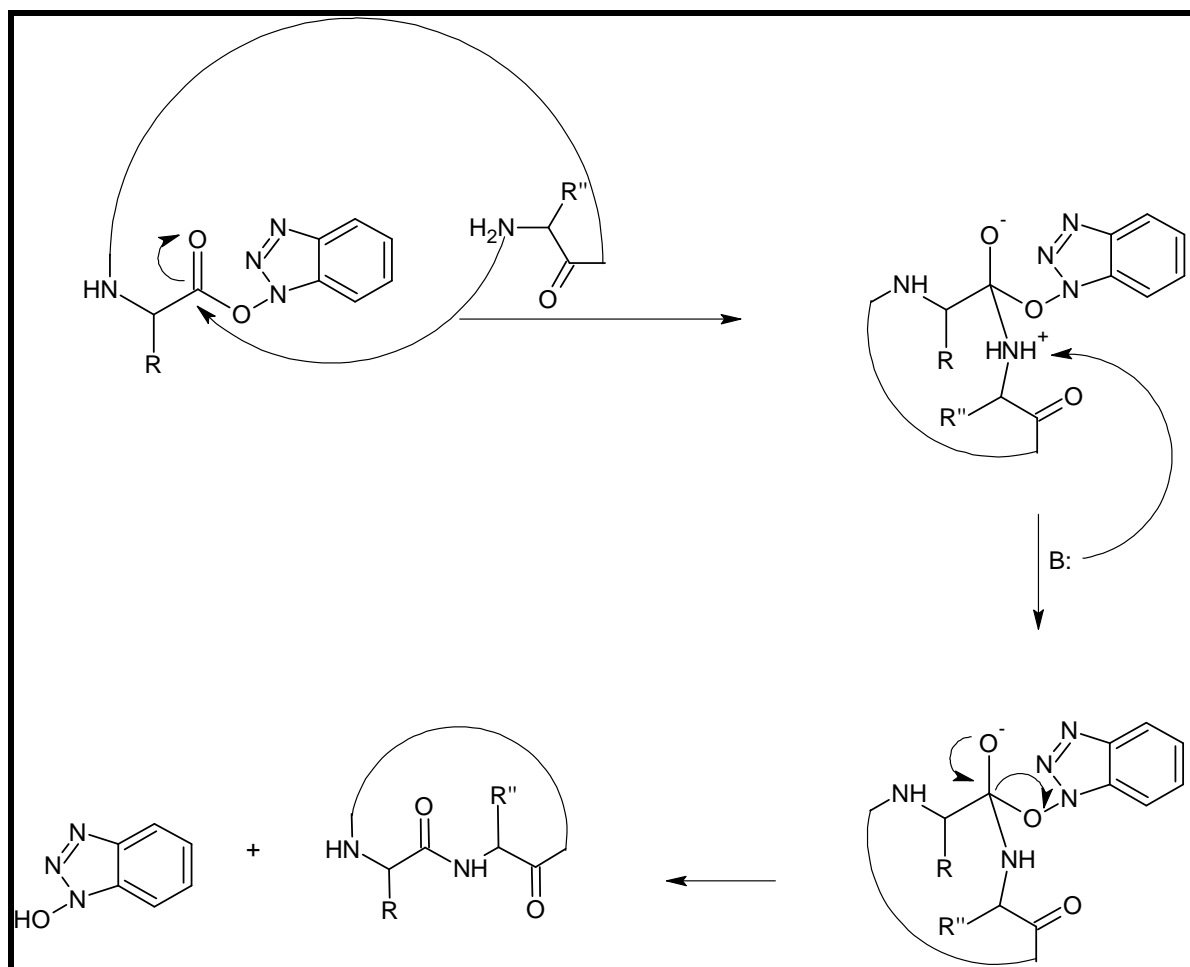
## Valg av aktivator til cycliseringen

I cycliseringen ønsker man å få dannet en amidbinding mellom den N-terminale og C-terminale enden av pentapeptidet. En slik intramolekylær amidbinding vil ikke dannes uten aktivator tilstede (fig.14). Tidligere har det blitt omtalt flere ulike aktivatorer. Det har vist seg at PyBOP <sup>35</sup> har gitt høyt utbytte ved cyclisering <sup>36, 37</sup>, spesielt med C-terminal glycin, <sup>38</sup> og er derfor valgt som aktivator. PyBOP aktiverer koplingen ved dannelsen av benzotriazol-ester (Obt-ester) (fig.13).



**Figur 13.** Reaksjonsmekanisme for PyBOP som resulterer i OBtaktivert ester.





**Figur 14.** Reaksjonsmekanisme for dannelse av amidbinding med aktivert OBt-ester

Etter cyclisering i 24 timer ble det utført MS. Alle spektrene viste et nytt tydelig signal, som var det cycliske peptidet. Signalet fra de lineære peptidene var borte. Det betyr at det ikke var noe utgangsstoff tilstede og reaksjonen var ferdig. Tabell 4 gir en oversikt over beregnet og observert masse. Peptid 13 viser lavere observert masse enn beregnet, noe som skyldes at *tert*-butylgruppen var blitt spaltet av før prøvetaking.

**Tabell 4.** Oversikt over teoretisk beregnet masse og den observerte masse til de cycliske beskyttede pentapeptidene ved bruk av MS.

<b>Peptid</b>	<b>Beregnet masse (g/mol)</b>	<b>Observert masse [M+H]<sup>+</sup> (g/mol)</b>	<b>Vedlegg</b>
<b>13)</b> L-1-Nal <sup>4</sup> FC131	<b>1289,6</b>	<b>1234,8</b>	<b>7</b>
<b>14)</b> L-Phe <sup>4</sup> FC131	<b>1241,6</b>	<b>1240,6</b>	<b>8</b>
<b>15)</b> L-h-Phe <sup>4</sup> FC131	<b>1253,6</b>	<b>1254,8</b>	<b>9</b>
<b>16)</b> L-β-sty-Ala <sup>4</sup> FC131	<b>1265,6</b>	<b>1266,8</b>	<b>10</b>
<b>17)</b> L-Phg <sup>4</sup> FC131	<b>1225,6</b>	<b>1226,7</b>	<b>11</b>
<b>18)</b> L-Phe(4-I) <sup>4</sup> FC131	<b>1366,4</b>	<b>1367,6</b>	<b>12</b>

### Avbeskyttelse av forbindelse 13-18

TFA har vist seg effektiv ved kløyving av beskyttelsesgruppene Pbf og *t*Bu. Ved kløyving av beskyttelsesgruppene dannes det kationer som kan reagere med det ubeskyttede peptidet sine sidekjeder. Det er derfor viktig å fange opp disse kationene. Triisopropylsilan (TIS) og H<sub>2</sub>O har vist seg effektiv i fange opp henholdsvis Pbf- og *t*Bu-kationer.<sup>39</sup> Det ble benyttet en blanding av TFA/TIS/H<sub>2</sub>O i forholdet (95:2,5:2,5). Etter avbeskyttelse ble det utført MS, se tabell 5. Unntak fra synteseprotokollen er kommentert under.

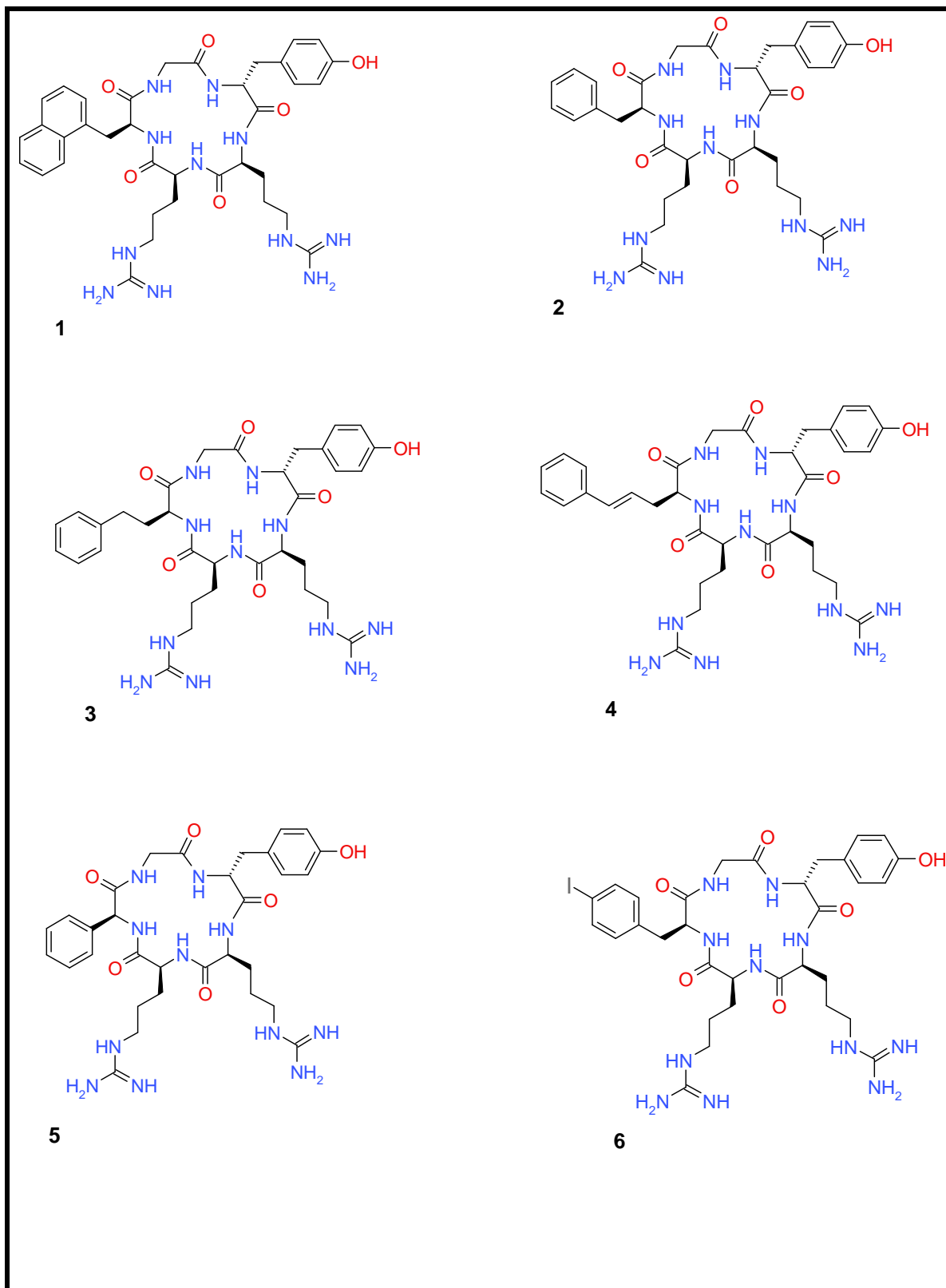
**Tabell 5.** Oversikt over teoretisk beregnet masse og den observerte masse til de cyklisk ubeskyttede pentapeptidene (målforbindelsene) ved bruk av MS.

Peptid	Beregnet masse (g/mol)	Observert masse [M+H] <sup>+</sup> (g/mol)	Vedlegg
1) L-1-Nal <sup>4</sup> FC131	729,4	730,3	13
2) L-Phe <sup>4</sup> FC131	679,4	680,3	14
3) L-h-Phe <sup>4</sup> FC131	693,4	694,4	15
4) L-β-sty-Ala <sup>4</sup> FC131	705,4	706,2	16
5) L-Phg <sup>4</sup> FC131	665,3	666,3	17
6) L-Phe(4-I) <sup>4</sup> FC131	805,7	806,3	18

### Peptid 3

Ved avbeskyttelse ble det tilsatt 28,5 ml triisopropylsilan (TIS) i stedet for TFA. Det ble nødvendig å fordampe bort TIS på rotavapor før riktige reagenser ble tilsatt.

De cyklisk avbeskyttede pentapeptidene er vist i fig.15.



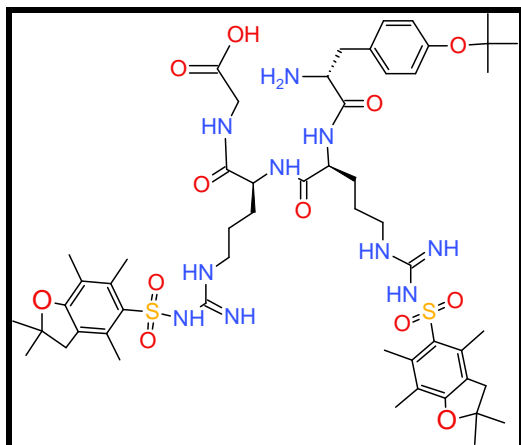
**Figur 15.** Oversikt over målforbindelsene etter cyclisering og avbeskytning. Forbindelse 1-6 er: **1)** L-1-Nal<sup>4</sup>FC131, **2)** L-Phe<sup>4</sup>FC131, **3)** L-h-Phe<sup>4</sup>FC131, **4)** L-β-sty-Ala<sup>4</sup>FC131, **5)** L-Phg<sup>4</sup>FC131 og **6)** L-Phe(4-I)<sup>4</sup>FC131.

## Syntese av H<sub>2</sub>N-D-Tyr<sup>1</sup>(tBu)-Arg<sup>2</sup>(Pbf)-Arg<sup>3</sup>(Pbf)-Phg<sup>4</sup>-Gly<sup>5</sup>-OH

Første forsøk på å syntetisere Phg<sup>4</sup>FC131 resulterte hovedsakelig i et tetrapeptid (fig.16). MS viste ikke teoretisk beregnet molekylvekt for Phg<sup>4</sup>FC131. MS viste at Phg<sup>4</sup>FC131 var tilstede, men med lav intensitet. Det var aminosyren phenylglycin som ikke koplet til glysin.

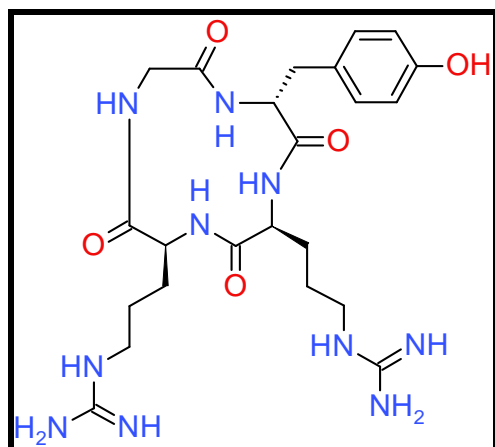
Phenylglycin er mer sterisk hindret enn de andre aminosyrene ved at benzenringen er koplet til C $\alpha$  karbonet. Det kan være årsaken til at koplingen ikke ble utført i stor nok grad. Det lineære pentapeptidet ble syntetisert på nytt og er vist i tabell 5.

Det ble besluttet å cyclisere tetrapeptidet. Det var av interesse å se om det var mulig å cyclisere et så kort peptid. Cykliske tetrapeptider er utfordrende å cyclisere på grunn av den korte peptidkjeden som fører til en høy ringspenning i molekylet.



**Figur 16. Struktur av lineært beskyttet tetrapeptid T1.**

MS indikerte at det cycliske tetrapeptidet (fig.17) hadde blitt dannet (tabell 6).



**Figur 17.** Cyclisk tetrapeptid bestående av D-Tyr-Arg-Arg-Gly (T1.3)

**Tabell 6.** Oversikt over lineært beskyttet (T1), cyclisk beskyttet (T1.2) og cyclisk avbeskyttet (T1.3) tetrapeptid.

Peptid	Beregnet masse g/mol	Observert masse [M+H] <sup>+</sup> g/mol	Vedlegg
T1	1111,4	1112,4	19
T1.2	1093,4	1094,3	20
T1.3	532,6	533,3	21

#### Videre arbeid.

I arbeidet videre bør det syntetiseres peptidomimetika hvor man bytter ut backbone med en struktur som ikke blir brutt ned av peptidaser, for eksempel  $\beta$ -aminosyrer. Det bør forskes mer på de essensielle aminosyrene i FC131 og deres struktur-aktivitets-sammenheng. De mest aktive aminosyrene bør syntetiseres i ett molekyl, der hvor man tar vare på sidegruppene og syntetiserer et backbone som er stabilt endogent.

#### 4 Rensing

Da det har vært umulig å skaffe til veie acetonitril, har det ikke vært mulig å kjøre HPLC eller HPLC rensing, slik at pentapeptidene er ikke renses. Planen var å renses sluttproduktene og finne utbytte av det rene stoffet, noe som ikke lot seg gjøre. Da det ikke har vært behov for å renses noen mellomprodukt, er det ikke samlet noe data fra utbytte eller renhet underveis.

## KONKLUSJON

Det har blitt syntetisert seks lineære pentapeptider etterfulgt av cyclisering. MS-spektrene viser at målforbindelsene er laget. Synteseprotokollen som er blitt brukt fungerer og valg av reagenser har vært riktig.

Struktur-aktivitets-sammenhengen vil ikke være tilgjengelig før peptidene er rensset og testet på HIV-1-cellekulturer. Resultatene vil være viktige i videre utvikling av et legemiddel mot HIV-1, da det er publisert få resultat hvor det er utført endringer i Xaa<sup>4</sup>.

Det har vist seg mulig å syntetisere og cyclisere tetrapeptider ved bruk av samme metode som for pentapeptider.





## EKSPERIMENTELT

### Kjemikalieliste med forkortelser

Kjemikalie	Forkortelse	%	Produsent
Metanol		99,9	Merck KGaA
Dimethylformamide	DMF	99,8	Malinchrodt Baker – B.V. Deventer
Dietyleter		99,7	Merck KgaA
Trifluoracetic acid	TFA	99,0	Sigma-Aldrich CH
Triisopropylsilane	TIS	99,0	Sigma-Aldrich CH
N-N-Diisopropylethyl amine	DIPEA	99,5	Sigma-Aldrich
Dichlormethane	DCM		VWR International
Fmoc-3-(1-naphthyl)-L-alanine	L-1-Nal	98	Fluka Analytical
Fmoc-4-iodo-L-phenylalanine	L-Phe(4-I)	97	Fluka Analytical
Fmoc-L-homophenylalanine	L-h-Phe	98	Fluka Analytical
Fmoc- $\beta$ -styryl-L-alanine	L- $\beta$ -sty-Ala	98	Fluka Analytical
Fmoc-L- $\alpha$ -phenylglycine	L-Phg	98	Fluka Analytical
Fmoc-L-phenylalanine	L-Phe	98	Fluka Analytical
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	Arg		Fluka Analytical
Fmoc-D-Tyr(tBu)-OH	Tyr	98	Fluka Analytical
Fmoc-Gly-Novasyn TGT			Novabiochem
Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate	PyBOP		Sigma-Aldrich
1-H-Benzotriazolium, 1-[bis(dimethylamino)methylene]-, 3-oxide, hexafluorophosphate(1-)	HBTU		Sigma-Aldrich
1,1,1,3,3,3 – hexafluor-2-propanol	HFIP		Fluka analytical

### Kaiser testløsning

Testen består av tre løsninger som oppbevares på små flasker med dråpeteller.

Løsning A – 5 % (w/v) ninhydrin i etanol

Løsning B – 4 g/ml fenol i etanol

Løsning C - 0,02 mM kaliumcyanid i pyridin

Testen utføres ved å ta ut noen korn resin og legge det i et lite testrør. Så tilsettes tre dråper av løsning A, B og C. Deretter settes testrøret på vannbad 100 °C i 4-6 minutter. Løsningen vil ha en gul farge. Hvis det er frie resinbundne aminer tilstede, vil løsningen skifte farge til mørk blå.<sup>31</sup>

### Massespektrometri

Massespekter ble utført på Waters Maldi micro MS ved bruk av MassLynx V 4.0 SCN534 programvare.

### Generell prosedyre for FFPS av 7-12

Alle de lineære peptidene ble syntetisert på PTA Tribute. Fmoc-Gly-NovaSyn TGT resin ble benyttet for alle forbindelsene. Det ble brukt 0,15 mmol resin ved alle syntesene, som tilsvarer 652 mg resin. De Fmoc-beskyttede aminosyrene ble tilsatt i et overskudd på fire molekvivalenter.

Liste over aminosyrer

Fmoc-1-Nal-OH	(263 mg, 0,6 mmol)
Fmoc-L-Phe	(232 mg, 0,6 mmol)
Fmoc-L-h-Phe	(241 mg, 0,6 mmol)
Fmoc-β-Sty-Ala	(248 mg, 0,6 mmol)
Fmoc-L-Phg	(224 mg, 0,6 mmol)
Fmoc-Phe(4-I)	(308 mg, 0,6 mmol)
Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	(389 mg, 0,6 mmol)
Fmoc-D-Tyr(tBu)-OH	(276 mg, 0,6 mmol)

Programvaren som fulgte med syntesemaskinen ble brukt til å utføre de fleste operasjoner. Kopling av den første aminosyren ble utført manuelt. Resinet ble festet i maskinen og svellet med DCM 6x30 sekunder. Deretter ble aminosyren med HBTU og DIPEA/NMP tilsatt resinet. Maskinen ble satt til å riste i 60 minutter. Deretter ble det utført Kaiser test. De andre aminosyrene ble koplet på automatisk ved bruk av et forhåndsprogrammert oppsett, kalt "extended cycle". Det innebar pumping av 20 % piperidine, vask med DMF, oppløsning av Fmoc aminosyrer (4 ekvivalenter overskudd), HBTU (4 ekvivalenter overskudd) og DIPEA (4 ekvivalenter overskudd). Så ble det utført kopling i 60 minutter og tilslutt vasket med DMF. Syklusen ble repetert for alle de tre resterende aminosyrene. Siste Fmoc ble kløvyt og resinet vasket med DMF. Resinet ble manuelt svellet tre ganger i DCM og filtrert. Det ble tilsatt HFIP (5 ml, 33 % i DCM) til resinet og rørt i tre minutter og filtrert. Prosessen ble gjentatt to ganger. HFIP ble fjernet fra peptidet ved bruk av rotavapor. Peptidet ble bunnfelt i kald eter i 30 minutter. Videre ble eteren dekantert og det bunnfelte stoffet ble lufttørket over natt.<sup>40</sup>

### Generell prosedyre for cyclisering og avbeskytting

Generell prosedyre for syntese av cycliske peptider fra lineære forbindelser.<sup>40</sup>

De lineære forbindelsene (**7-12**) ble løst i 500 ml DMF/DCM (1:1) og tilsatt 0,06 ml DIPEA og 0,19 g PyBOP (2-3 molekvivalenter overskudd). Løsningen ble satt på magnetrører og cyclisert i 24 timer. Etter cyclisering ble det kjørt MS for å bekrefte at cyclisering har funnet sted. Deretter ble løsningen med peptidet satt på rotavapor hvor løsemiddel og reagenser ble fordampet. Det ble så tilsatt 30 ml TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (95:2,5:2,5) som stod på røring i 2 timer. Det avbeskyttede cycliske peptidet ble så bunnfelt i 100 ml kald dietyleter. Etter to timer ble eteren dekantert og operasjonen gjentatt. Peptidet fikk lufttørke over natt og deretter lagret. Produktene (**1-6**) ble bekreftet med MS.



## REFERANSER

1. Shaji, J.; Patole, V. *Protein and peptide drug delivery: Oral approaches*. 2008; Vol. 70, p 269-277.
2. Oberlin, E.; Amara, A.; Bachelier, F.; Bessia, C.; Virelizier, J.-L.; Arenzana-Seisdedos, F.; Schwartz, O.; Heard, J.-M.; Clark-Lewis, I.; Legler, D. F.; Loetscher, M.; Baggiolini, M.; Moser, B. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* **1996**, 382, 833-835.
3. Bleul, C.; Fuhlbrigge, R.; Casasnovas, J.; Aiuti, A.; Springer, T. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J. Exp. Med.* **1996**, 184, 1101-1109.
4. Kazunobu Tachibana, S. H., Hisashi Iizasa, Hisahiro Yoshida, et al. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* **1998**, 393(6685).
5. Zhu, Y. Y., Tao; Zhang, Xiao-Chun; Nagasawa, Takashi; Wu, Jane Y.; Rao, Yi. Role of the chemokine SDF-1 as the meningeal attractant for embryonic cerebellar neuron. *Nature Neuroscience* **2002**, 719-720.
6. Feng, Y. Y. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **1996**, 272, 5263.
7. Tamamura, H.; Xu, Y.; Hattori, T.; Zhang, X.; Arakaki, R.; Kanbara, K.; Omagari, A.; Otaka, A.; Ibuka, T.; Yamamoto, N.; Nakashima, H.; Fujii, N. A Low-Molecular-Weight Inhibitor against the Chemokine Receptor CXCR4: A Strong Anti-HIV Peptide T140. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1998**, 253, 877-882.
8. Hiroshi Tsutsumi, T. T., Nami Ohashi, Hiroyuki Masuno, Hirokazu Tamamura, Kenichi Hiramatsu, Takanobu Araki, Satoshi Ueda, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii. Therapeutic potential of the chemokine receptor CXCR4 antagonists as multifunctional agents. *Peptide Science* **2007**, 88, 279-289.
9. Berger, E. A.; Murphy, P. M.; Farber, J. M. CHEMOKINE RECEPTORS AS HIV-1 CORECEPTORS: Roles in Viral Entry, Tropism, and Disease. *Annual Review of Immunology* **1999**, 17, 657-700.
10. Muller, A.; Homey, B.; Soto, H.; Ge, N.; Catron, D.; Buchanan, M. E.; McClanahan, T.; Murphy, E.; Yuan, W.; Wagner, S. N.; Barrera, J. L.; Mohar, A.; Verastegui, E.; Zlotnik, A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* **2001**, 410, 50-56.
11. Takenaga, M.; Tamamura, H.; Hiramatsu, K.; Nakamura, N.; Yamaguchi, Y.; Kitagawa, A.; Kawai, S.; Nakashima, H.; Fujii, N.; Igarashi, R. A single treatment with microcapsules containing a CXCR4 antagonist suppresses pulmonary metastasis of murine melanoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2004**, 320, 226-232.
12. Burger, J. A.; Burger, M.; Kipps, T. J. Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells Express Functional CXCR4 Chemokine Receptors That Mediate Spontaneous Migration Beneath Bone Marrow Stromal Cells. *Blood* **1999**, 94, 3658-3667.
13. Tamamura, H.; Fujisawa, M.; Hiramatsu, K.; Mizumoto, M.; Nakashima, H.; Yamamoto, N.; Otaka, A.; Fujii, N. Identification of a CXCR4 antagonist, a T140 analog, as an anti-rheumatoid arthritis agent. *FEBS Letters* **2004**, 569, 99-104.
14. Nanki, T.; Hayashida, K.; El-Gabalawy, H. S.; Suson, S.; Shi, K.; Girschick, H. J.; Yavuz, S.; Lipsky, P. E. Stromal Cell-Derived Factor-1-CXC Chemokine Receptor 4 Interactions Play a Central Role in CD4+ T Cell Accumulation in Rheumatoid Arthritis Synovium. *J Immunol* **2000**, 165, 6590-6598.
15. Tachibana, K.; Hirota, S.; Iizasa, H.; Yoshida, H.; Kawabata, K.; Kataoka, Y.; Kitamura, Y.; Matsushima, K.; Yoshida, N.; Nishikawa, S.-i.; Kishimoto, T.; Nagasawa, T. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* **1998**, 393, 591-594.
16. Ueda, S.; Oishi, S.; Wang, Z.-x.; Araki, T.; Tamamura, H.; Cluzet, J.; Ohno, H.; Kusano, S.; Nakashima, H.; Trent, J. O.; Peiper, S. C.; Fujii, N. Structure-Activity Relationships of Cyclic Peptide-Based Chemokine Receptor CXCR4 Antagonists: Disclosing the Importance of Side-Chain and Backbone Functionalities. *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, 50, 192-198.

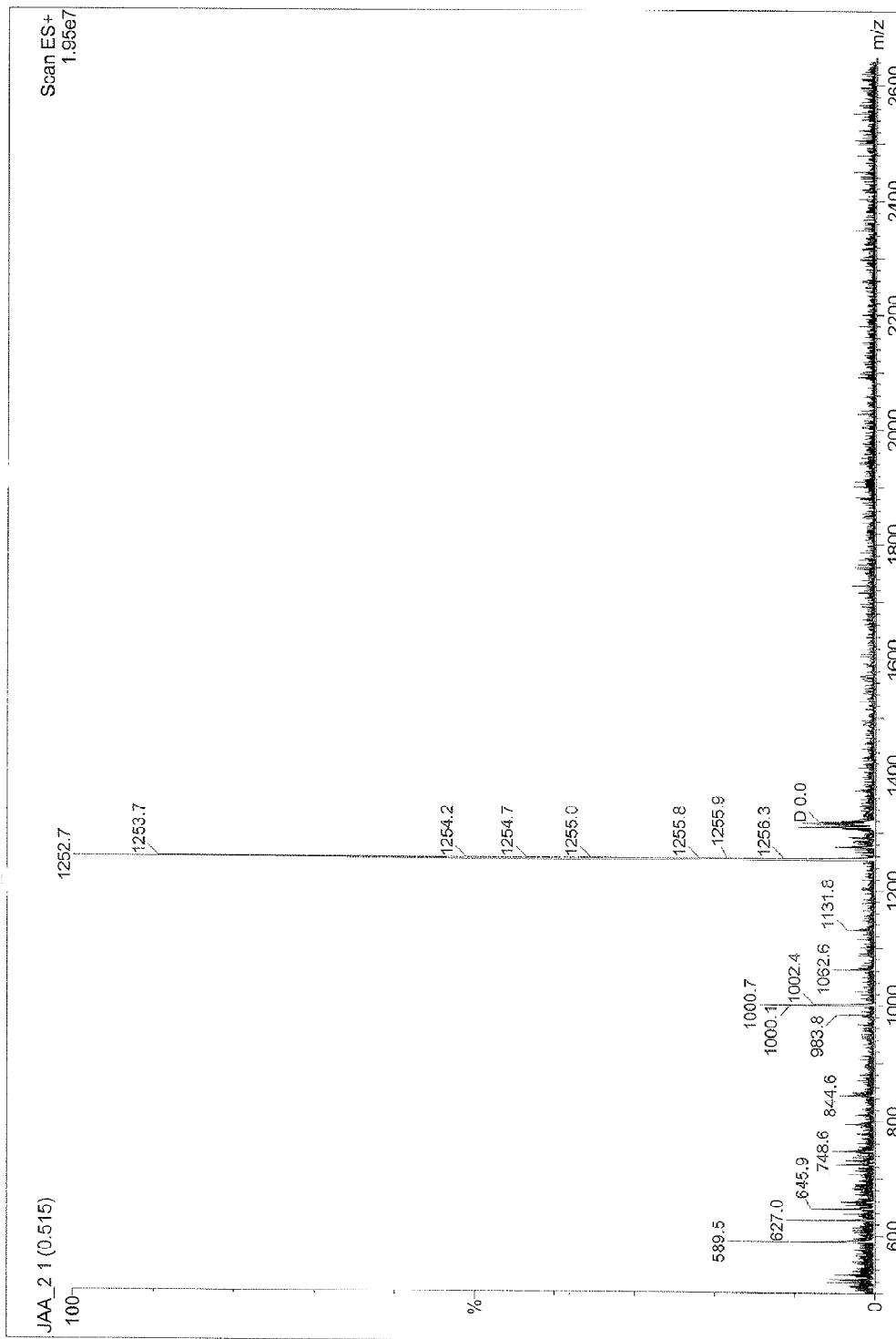
17. Ichiyama, K.; Yokoyama-Kumakura, S.; Tanaka, Y.; Tanaka, R.; Hirose, K.; Bannai, K.; Edamatsu, T.; Yanaka, M.; Niitani, Y.; Miyano-Kurosaki, N.; Takaku, H.; Koyanagi, Y.; Yamamoto, N. A duodenally absorbable CXC chemokine receptor 4 antagonist, KRH-1636, exhibits a potent and selective anti-HIV-1 activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, *100*, 4185-4190.
18. Schols, D.; Struyf, S.; Damme, J. V.; Este, J. A.; Henson, G.; Clercq, E. D. Inhibition of T-tropic HIV Strains by Selective Antagonization of the Chemokine Receptor CXCR4. *J. Exp. Med.* **1997**, *186*, 1383-1388.
19. De Clercq, E. The bicyclam AMD3100 story. *Nat Rev Drug Discov* **2003**, *2*, 581-587.
20. Masuda, M.; Nakashima, H.; Ueda, T.; Naba, H.; Ikoma, R.; Otaka, A.; Terakawa, Y.; Tamamura, H.; Ibuka, T.; Murakami, T.; al, e. A novel anti-HIV synthetic peptide, T-22 ([Tyr5,12,Lys7]-polyphemusin II). *Biochem Biophys Res Commun.* **1992**, *189*(2), 845-50.
21. Tamamura, H.; Sugioka, M.; Odagaki, Y.; Omagari, A.; Kan, Y.; Oishi, S.; Nakashima, H.; Yamamoto, N.; Peiper, S. C.; Hamanaka, N.; Otaka, A.; Fujii, N. Conformational study of a highly specific CXCR4 inhibitor, T140, disclosing the close proximity of its intrinsic pharmacophores associated with strong anti-HIV activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2001**, *11*, 359-362.
22. Nobutaka Fujii, S. O., Kenichi Hiramatsu, Takanobu Araki, Satoshi Ueda, Hirokazu Tamamura, Akira Otaka, Shuichi Kusano, Shigemi Terakubo, Hideki Nakashima, James A. Broach, John O. Trent, Zi-xuan Wang, Stephen C. Peiper,. Molecular-Size Reduction of a Potent CXCR4-Chemokine Antagonist Using Orthogonal Combination of Conformation- and Sequence-Based Libraries13. *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, *42*, 3251-3253.
23. Tamamura, H.; Araki, T.; Ueda, S.; Wang, Z.; Oishi, S.; Esaka, A.; Trent, J. O.; Nakashima, H.; Yamamoto, N.; Peiper, S. C.; Otaka, A.; Fujii, N. Identification of Novel Low Molecular Weight CXCR4 Antagonists by Structural Tuning of Cyclic Tetrapeptide Scaffolds. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *48*, 3280-3289.
24. Tamamura, H.; Esaka, A.; Ogawa, T.; Araki, T.; Ueda, S.; Wang, Z.; Trent, J. O.; Tsutsumi, H.; Masuno, H.; Nakashima, H.; Yamamoto, N.; Peiper, S. C.; Otaka, A.; Fujii, N. Structure-activity relationship studies on CXCR4 antagonists having cyclic pentapeptide scaffolds. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2005**, *3*, 4392-4394.
25. Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, *85*, 2149-2154.
26. Chan, W. C.; White, P. D. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*. 2000.
27. Bollhagen, R.; Schmiedberger, M.; Barlos, K.; Grell, E. A new reagent for the cleavage of fully protected peptides synthesised on 2-chlorotrityl chloride resin. *Journal of the Chemical Society. Chemical communications* **1994**, *22*, 2.
28. Eriksen, Ø. *Design and synthesis of novel cyclopentapeptide antagonist for the chemokine receptor CXCR4*; 2008; p 57.
29. Ramage, R.; Green, J.; Blake, A. J. An acid labile arginine derivative for peptide synthesis: NG-2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulphonyl-L-arginine. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 6353-6370.
30. Carpino, L. A.; Shroff, H.; Triolo, S. A.; Mansour, E.-S. M. E.; Wenschuh, H.; Albericio, F. The 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl group (Pbf) as arginine side chain protectant. *Tetrahedron Letters* **1993**, *34*, 7829-7832.
31. Chan, W. C.; White, P. D. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. A practical approach*. 2000.
32. Carpino, L. A.; Han, G. Y. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. *The Journal of Organic Chemistry* **1972**, *37*, 3404-3409.
33. Sheppard, R. C.; Williams, B. J. ACID-LABILE RESIN LINKAGE AGENTS FOR USE IN SOLID-PHASE PEPTIDE-SYNTHESIS. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1982**, *20*, 451-454.

34. XING-MING GAO, Y.-H. Y., MICHAEL BERND and BERNHARD KUTSCHER. Studies on the Synthesis of Cyclic Pentapeptides as LHRH Antagonists and the Factors that Influence Cyclization Yield  
*Journal of Peptide Science*  
**2002**, *8*, 418–430
35. Coste, J.; Le-Nguyen, D.; Castro, B. PyBOP®: A new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product. *Tetrahedron Letters* **1990**, *31*, 205-208.
36. Rückle, T.; de Lavallaz, P.; Keller, M.; Dumy, P.; Mutter, M. Pseudo-prolines in cyclic peptides: Conformational stabilisation of cyclo[Pro-Thr([psi]Me,Mepro)-Pro]. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 11281-11288.
37. Albericio, F.; Cases, M.; Alsina, J.; Triolo, S. A.; Carpino, L. A.; Kates, S. A. On the use of PyAOP, a phosphonium salt derived from HOAt, in solid-phase peptide synthesis. *Tetrahedron Letters* **1997**, *38*, 4853-4856.
38. Sowemimo, V.; Scanlon, D.; al., e. Synthesis of Cyclic Penta- and Hexapeptides: A General Synthetic Strategy on DAS Resin  
*Journal of Protein Chemistry*,  
**1994**, *13*  
339-346.
39. Pearson, D. A.; Blanchette, M.; Baker, M. L.; Guindon, C. A. Trialkylsilanes as scavengers for the trifluoroacetic acid deblocking of protecting groups in peptide synthesis. *Tetrahedron Letters* **1989**, *30*, 2739-2742.
40. Eriksen, Ø. *Design and synthesis of novel cyclopentapeptide antagonist for the chemokine receptor CXCR4*; 2008; p 81;83.



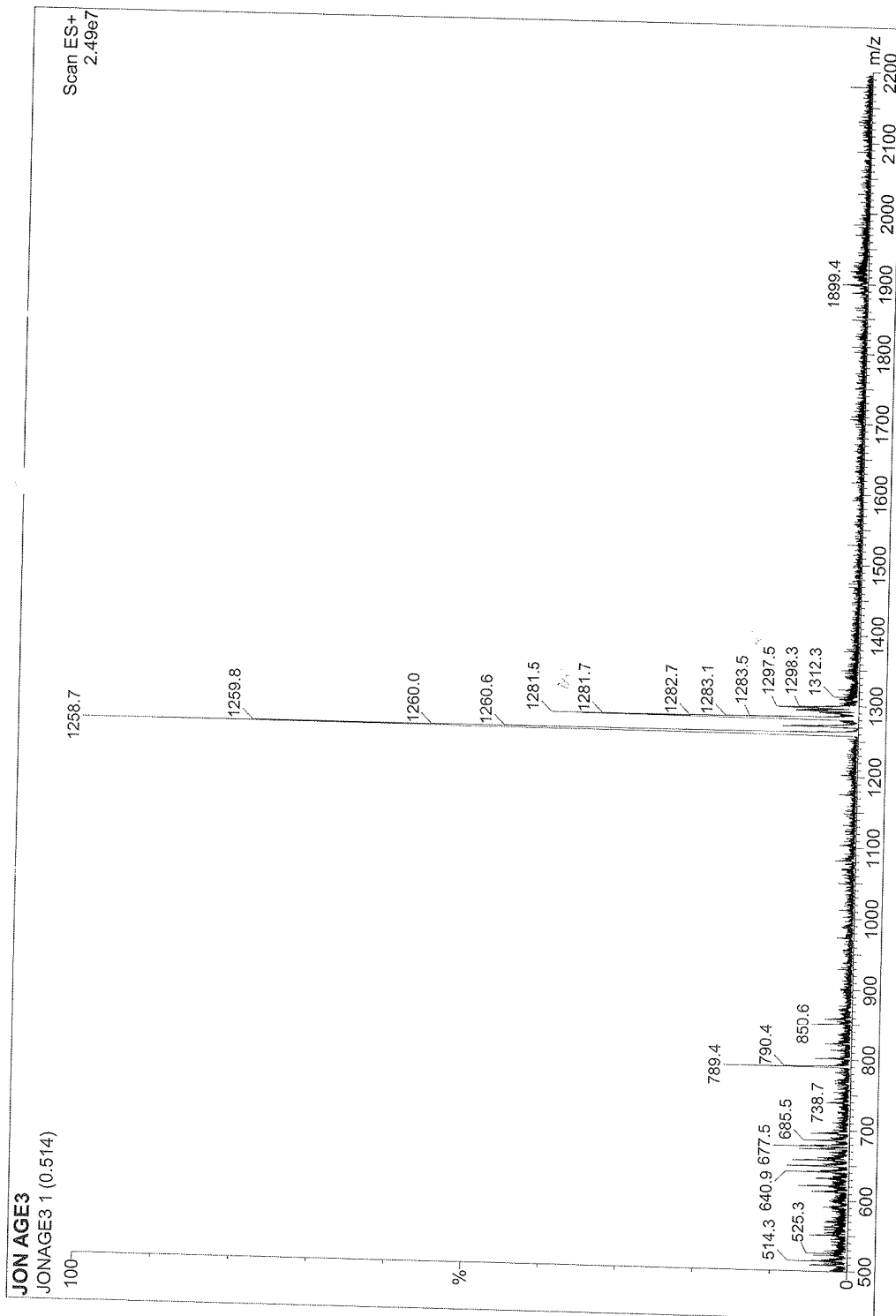


# VEDLEGG



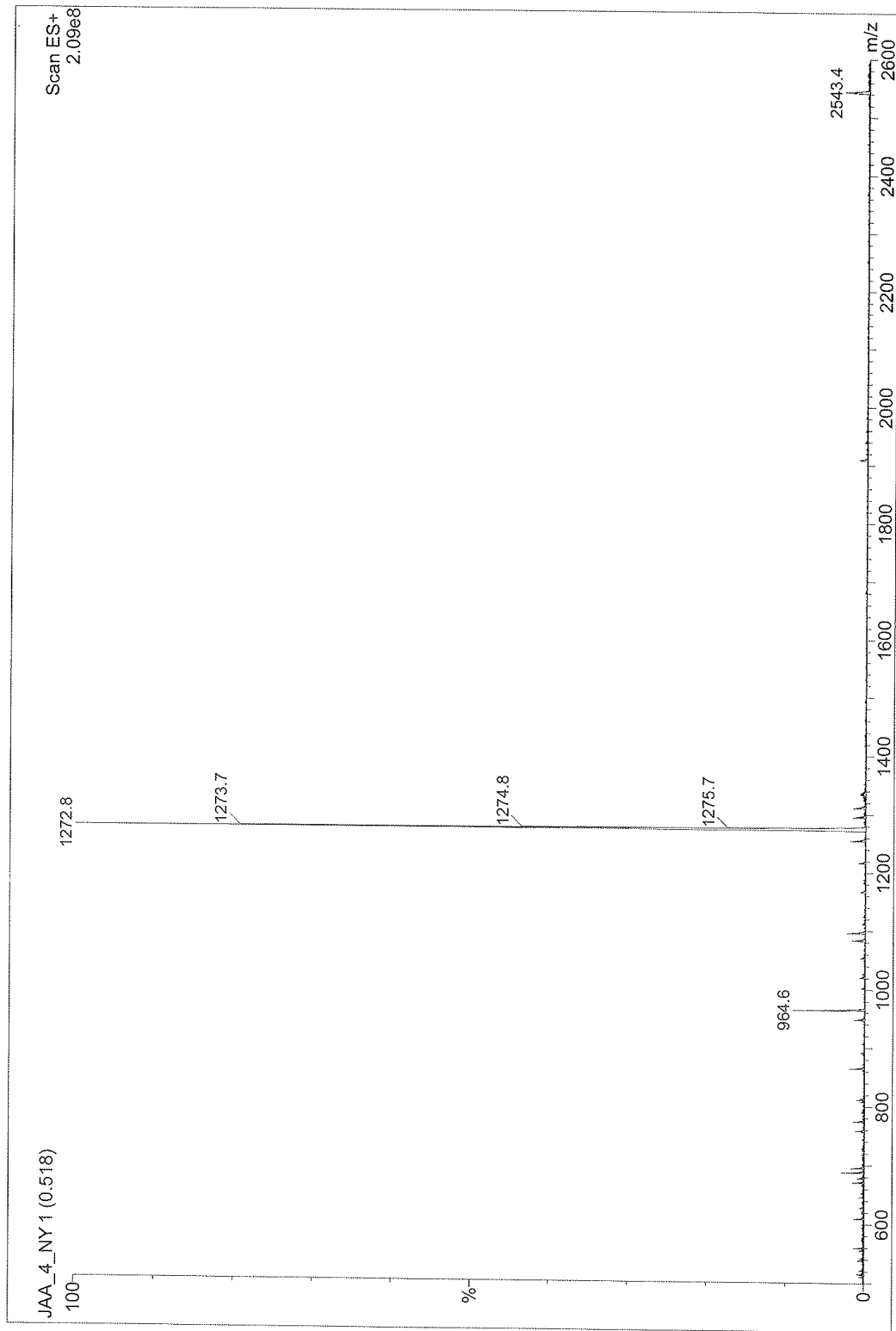
7

Vedlegg 1. Lineært beskyttet pentapeptid 7) L-1-Nal<sup>4</sup>FC131



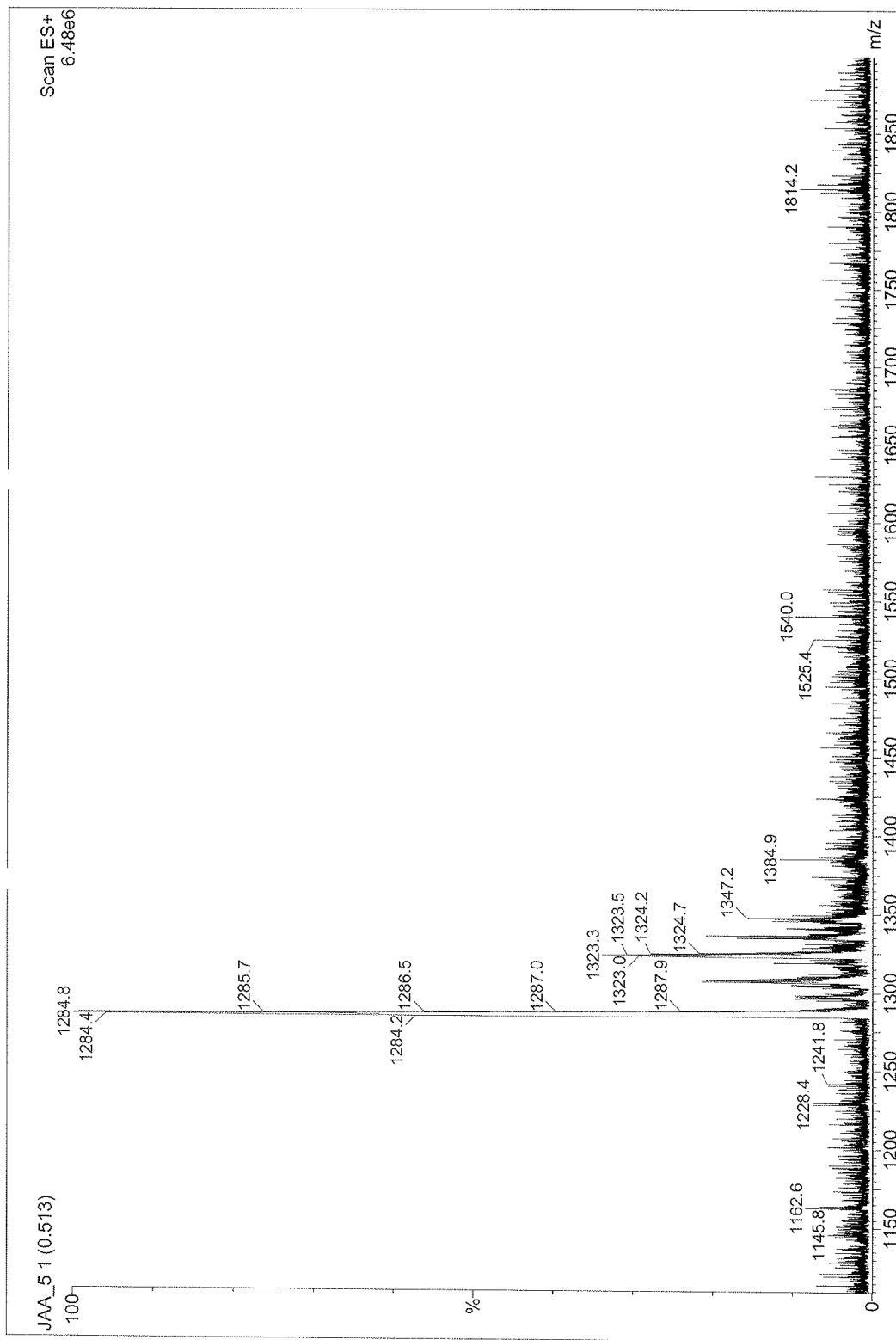
8

Vedlegg 2. Lineært beskyttet pentapeptid 8) L-Phe<sup>4</sup>FC131

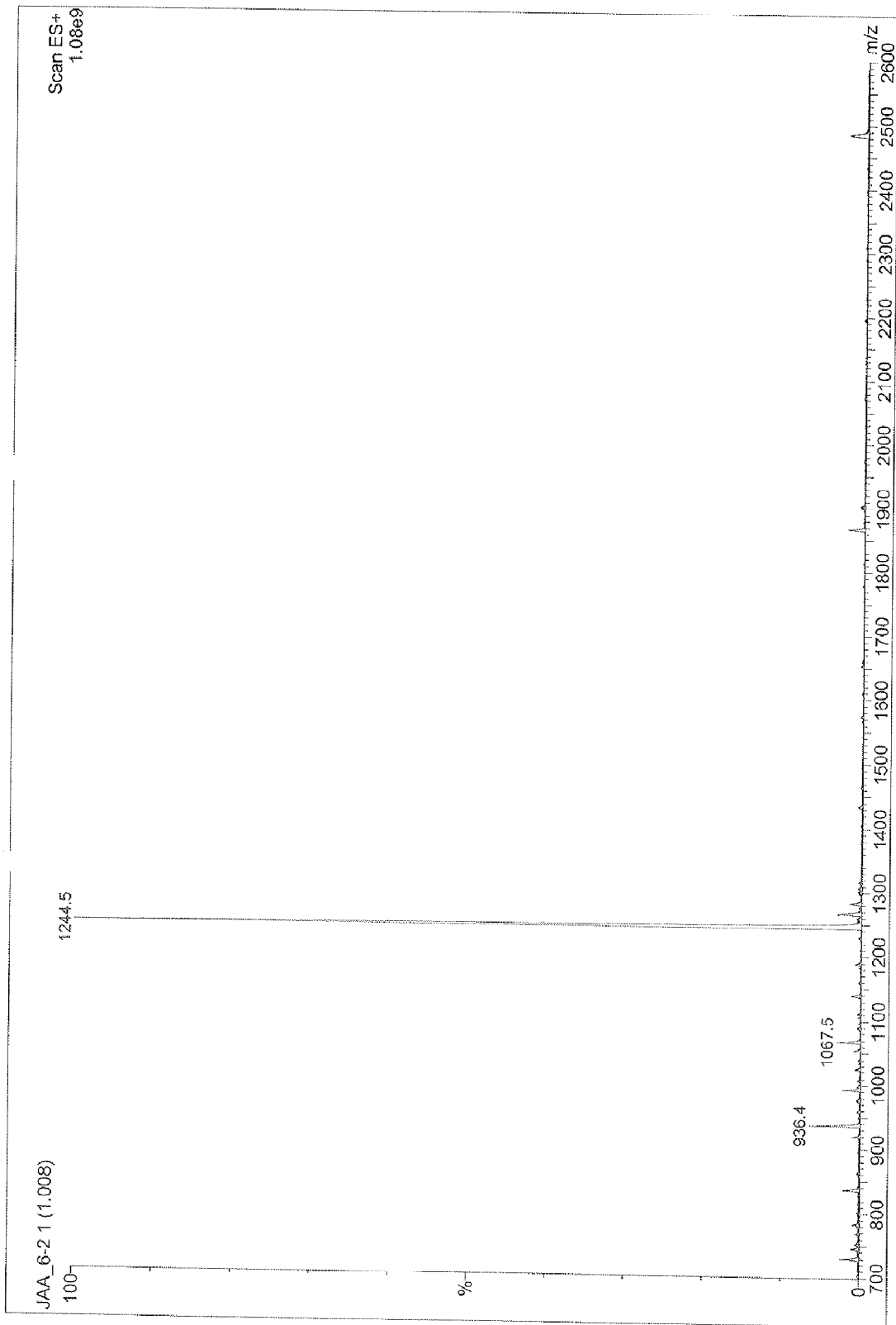


9

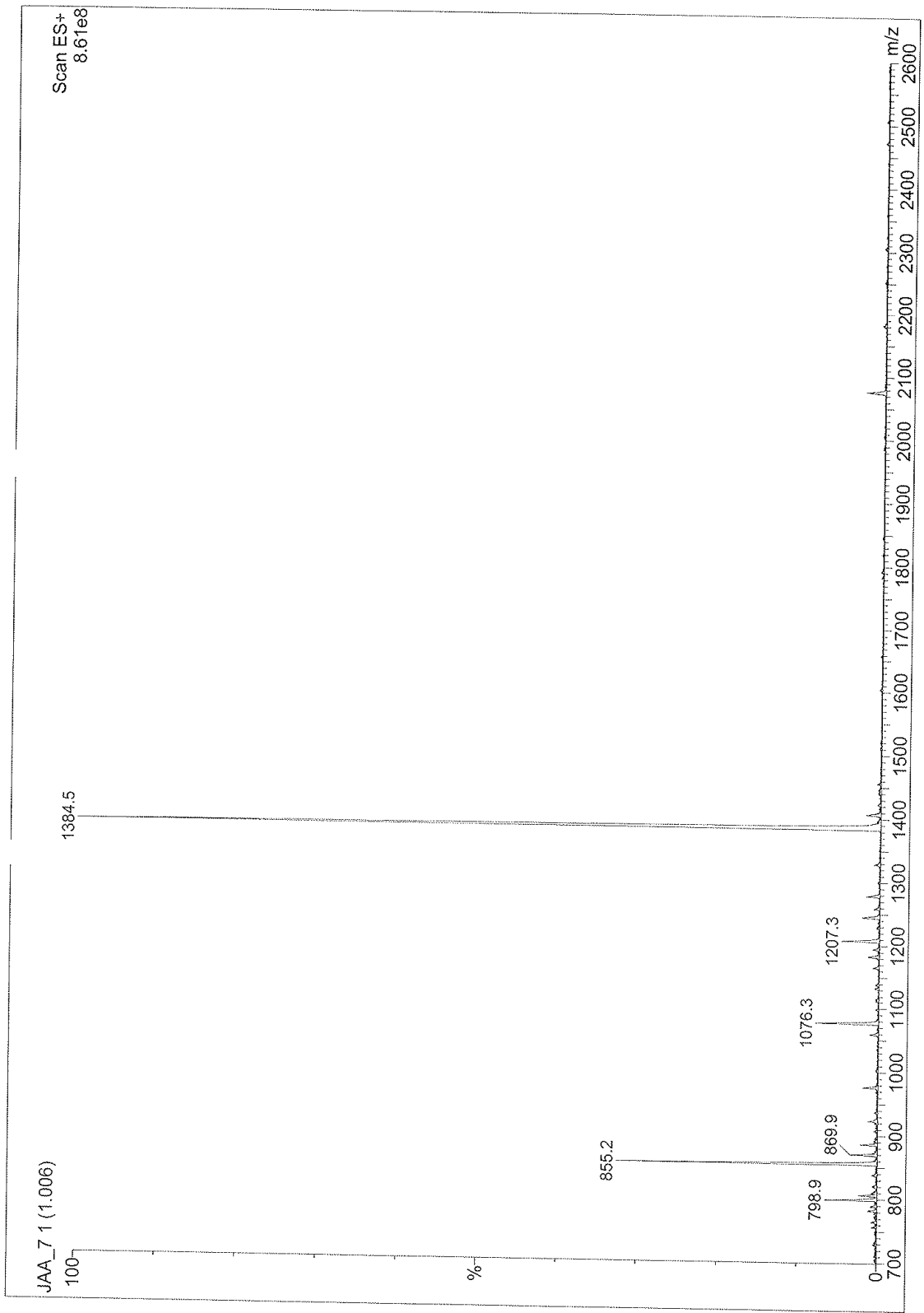
Vedlegg 3. Lineært beskyttet pentapeptid 9) L-h-Phe<sup>4</sup>FC131



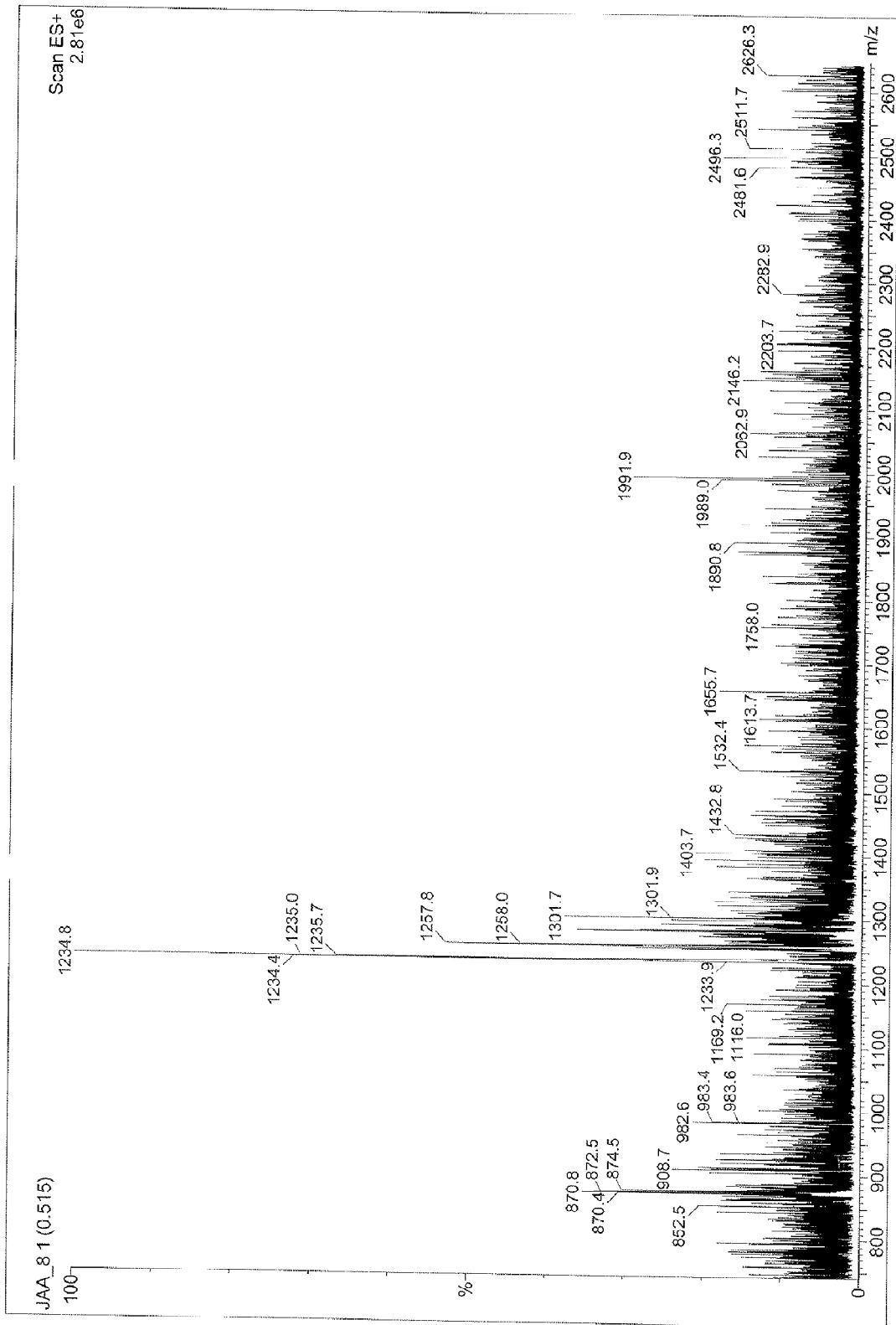
Vedlegg 4. Lineært beskyttet pentapeptid **10**) L- $\beta$ -sty-Ala<sup>4</sup>FC131



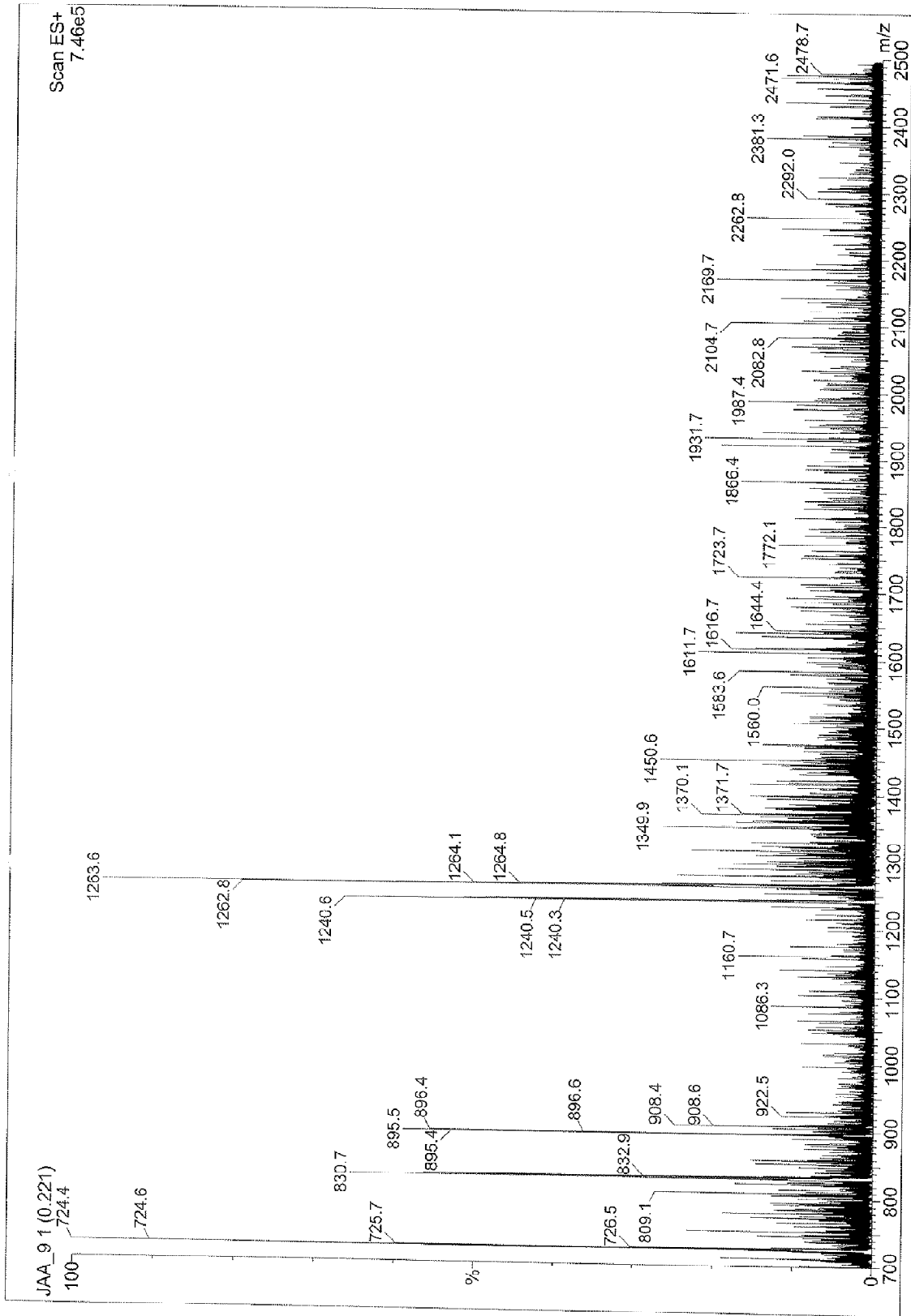
Vedlegg 5. Lineært beskyttet pentapeptid **11**) L-Phg<sup>4</sup>FC131



Vedlegg 6. Lineært beskyttet pentapeptid **12**) L-Phe(4-I)<sup>4</sup>FC131

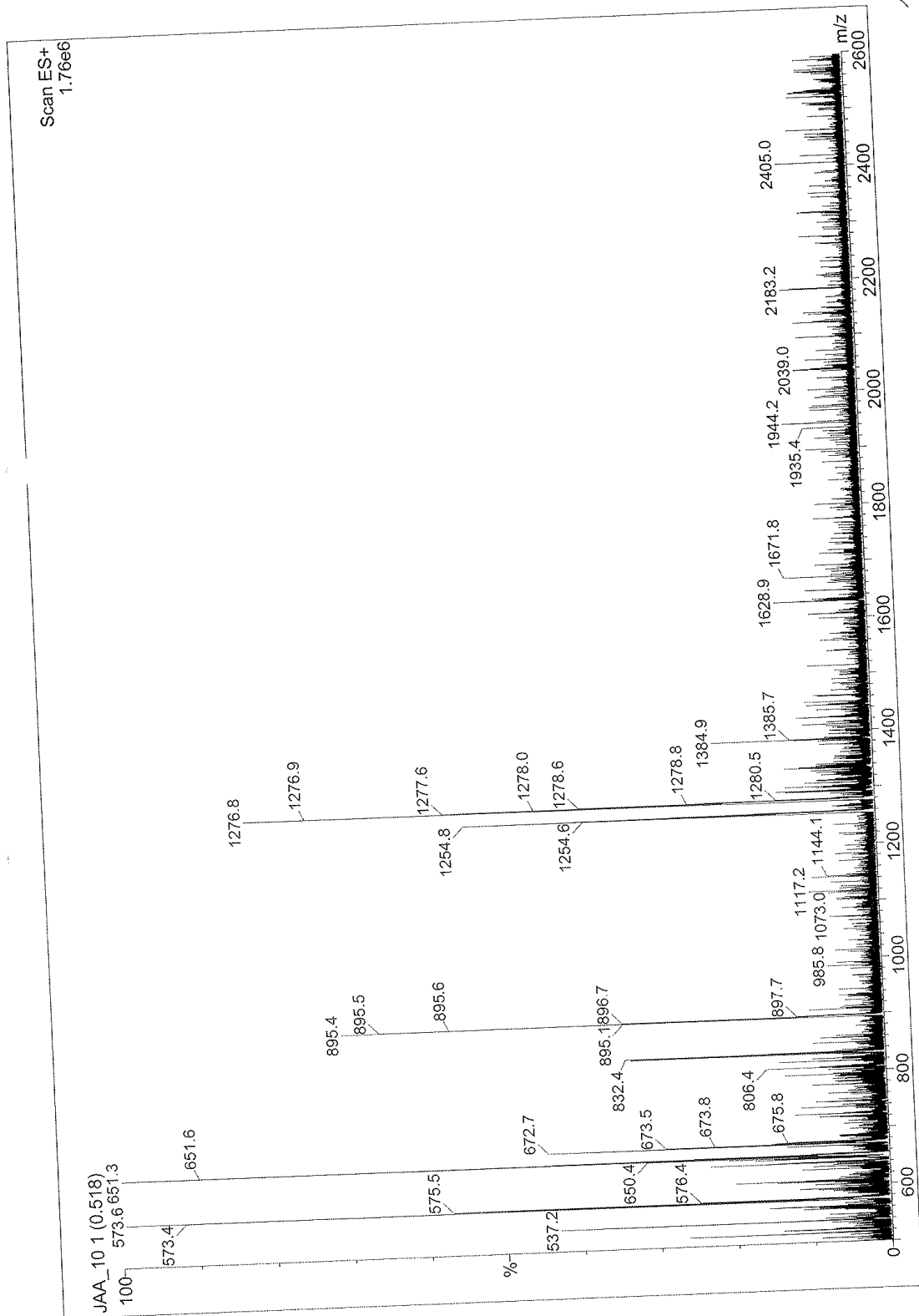


Vedlegg 7. Cyklisk beskyttet pentapeptid **13**) L-1-Nal<sup>4</sup>FC131

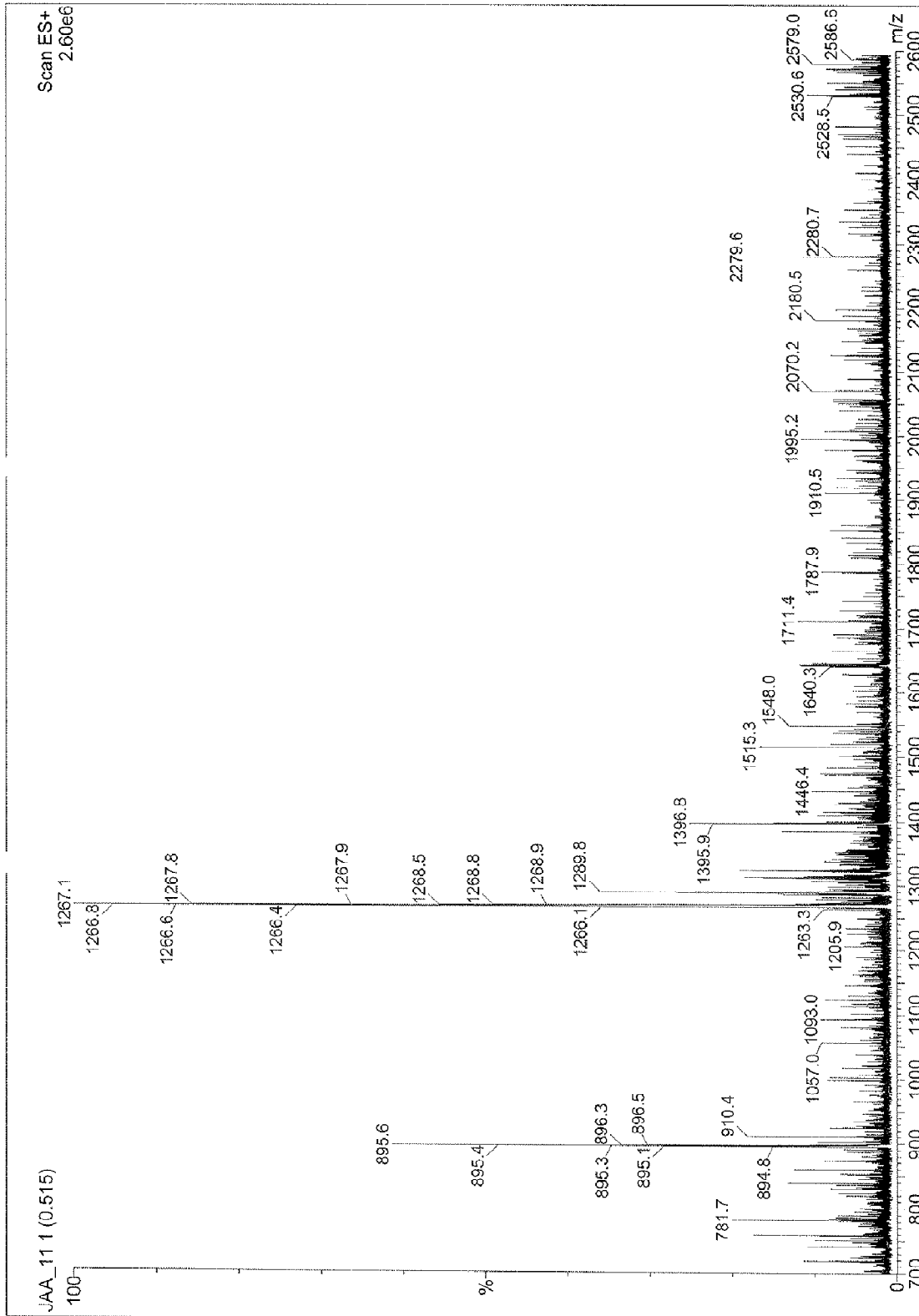


Vedlegg 8. Cyklisk beskyttet pentapeptid **14**) L-Phe<sup>4</sup>FC131

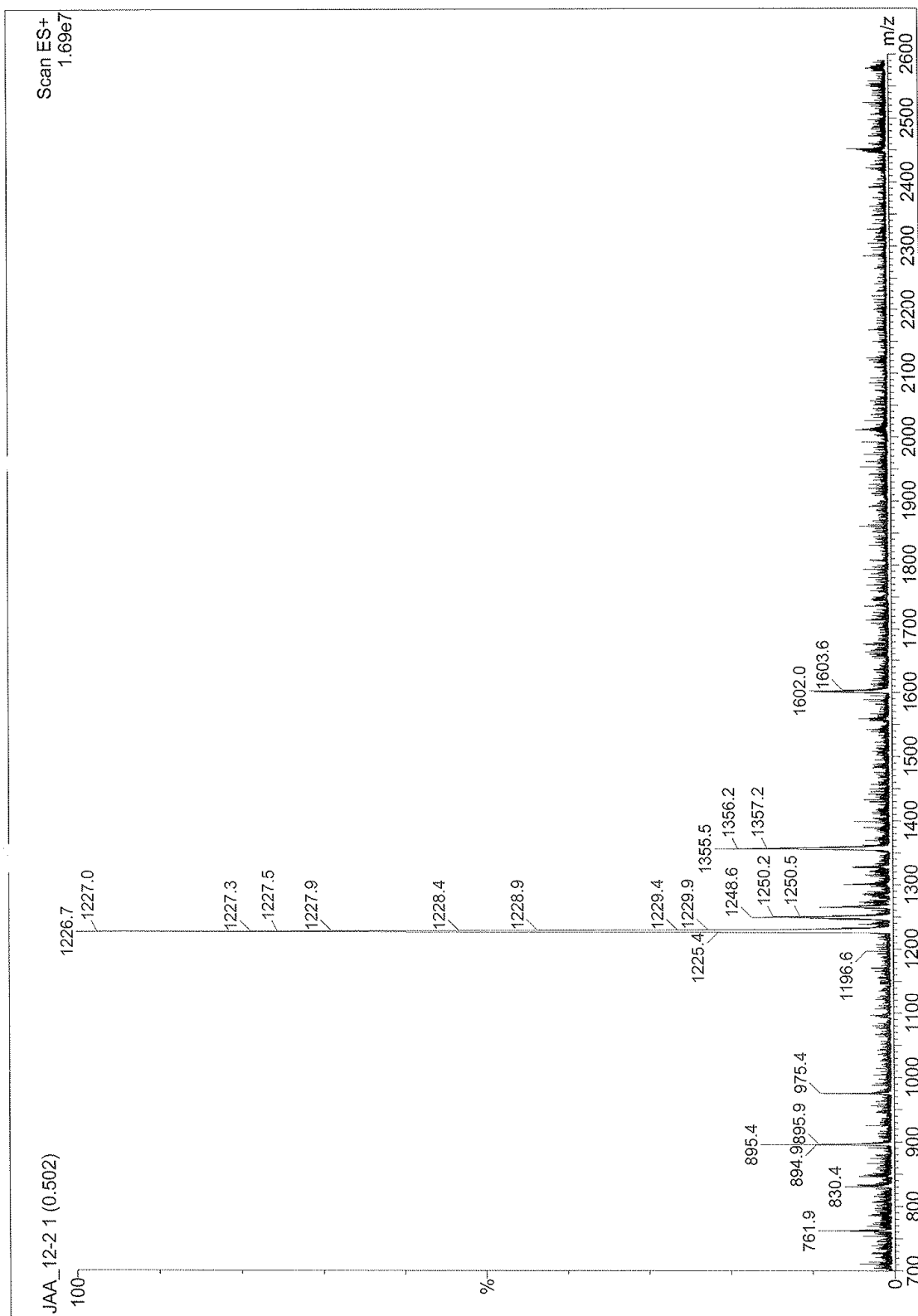




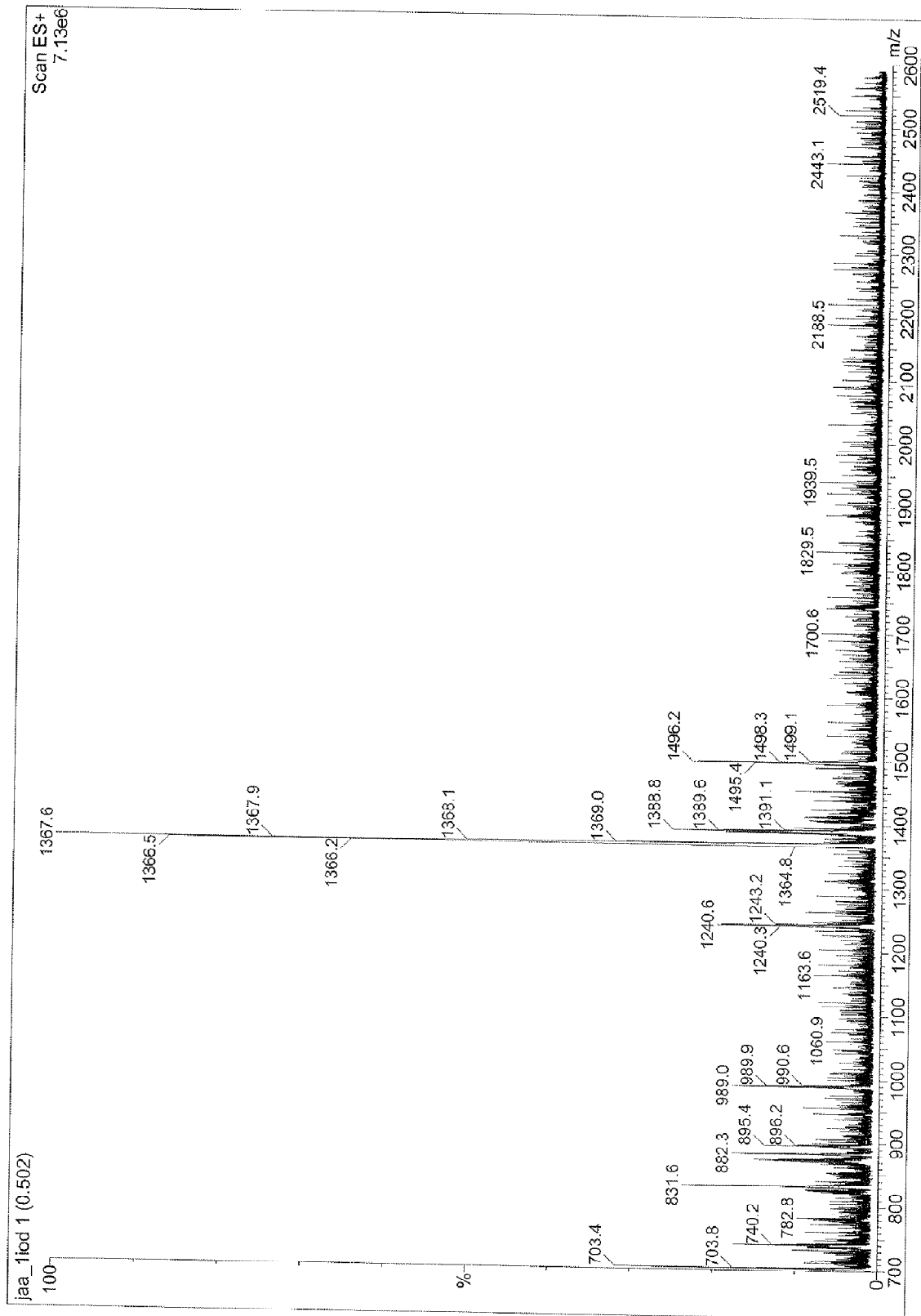
Vedlegg 9. Cyklisk beskyttet pentapeptid 15) L-h-Phe<sup>4</sup>FC131



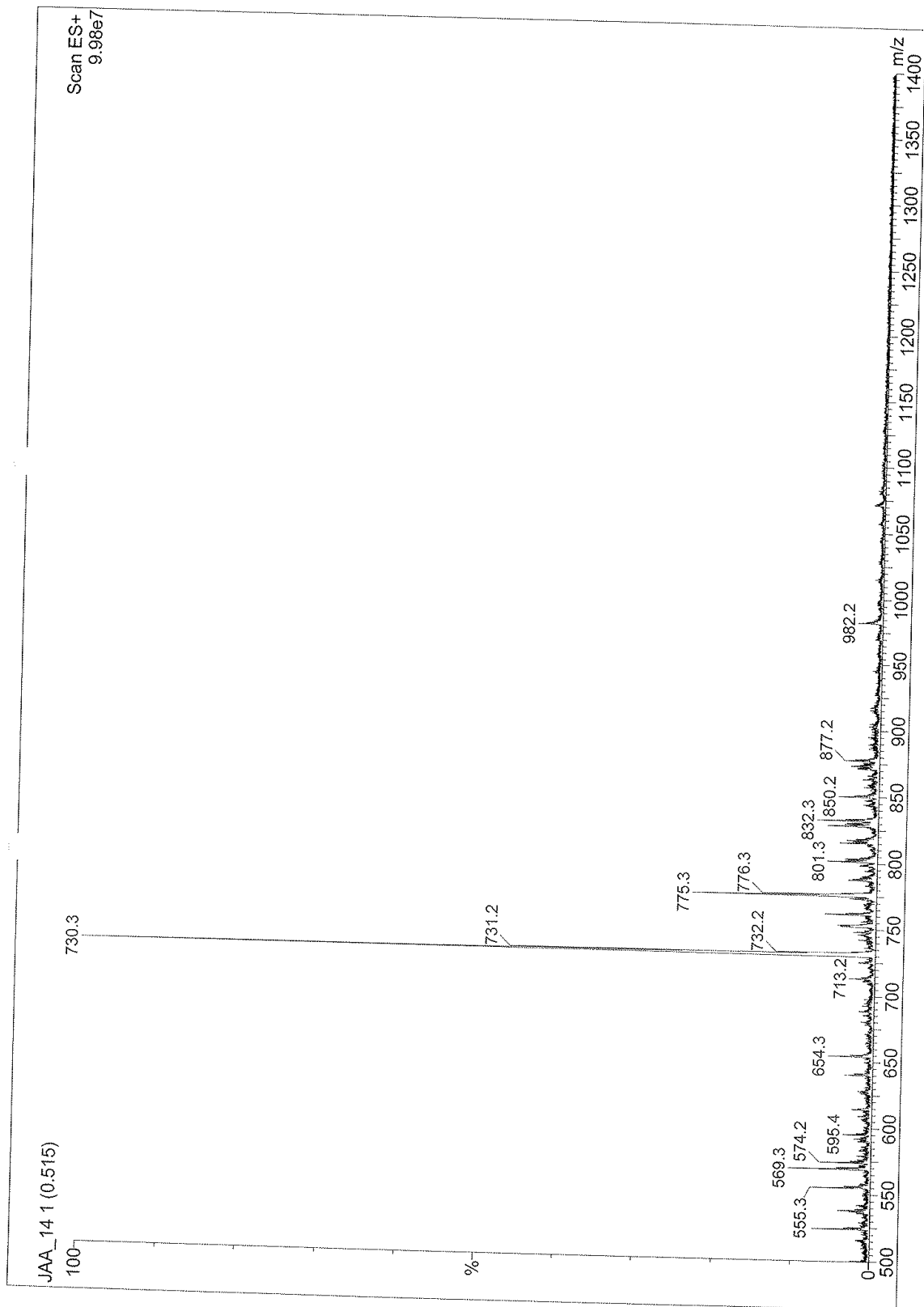
Vedlegg 10. Cyklisk beskyttet pentapeptid **16**) L-β-sty-Ala<sup>4</sup>FC131



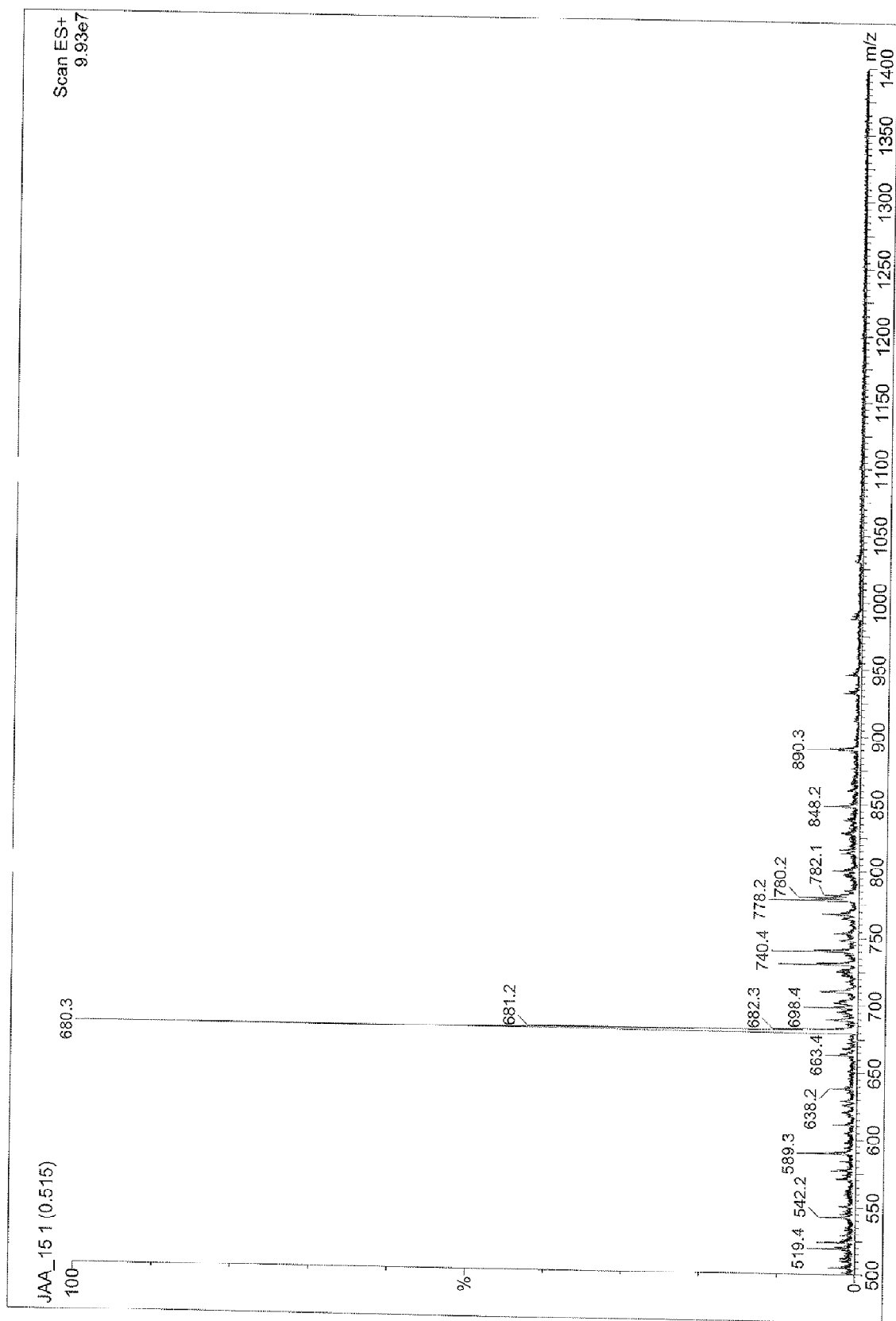
Vedlegg 11. Cyklisk beskyttet pentapeptid **17**) L-Phg<sup>4</sup>FC131



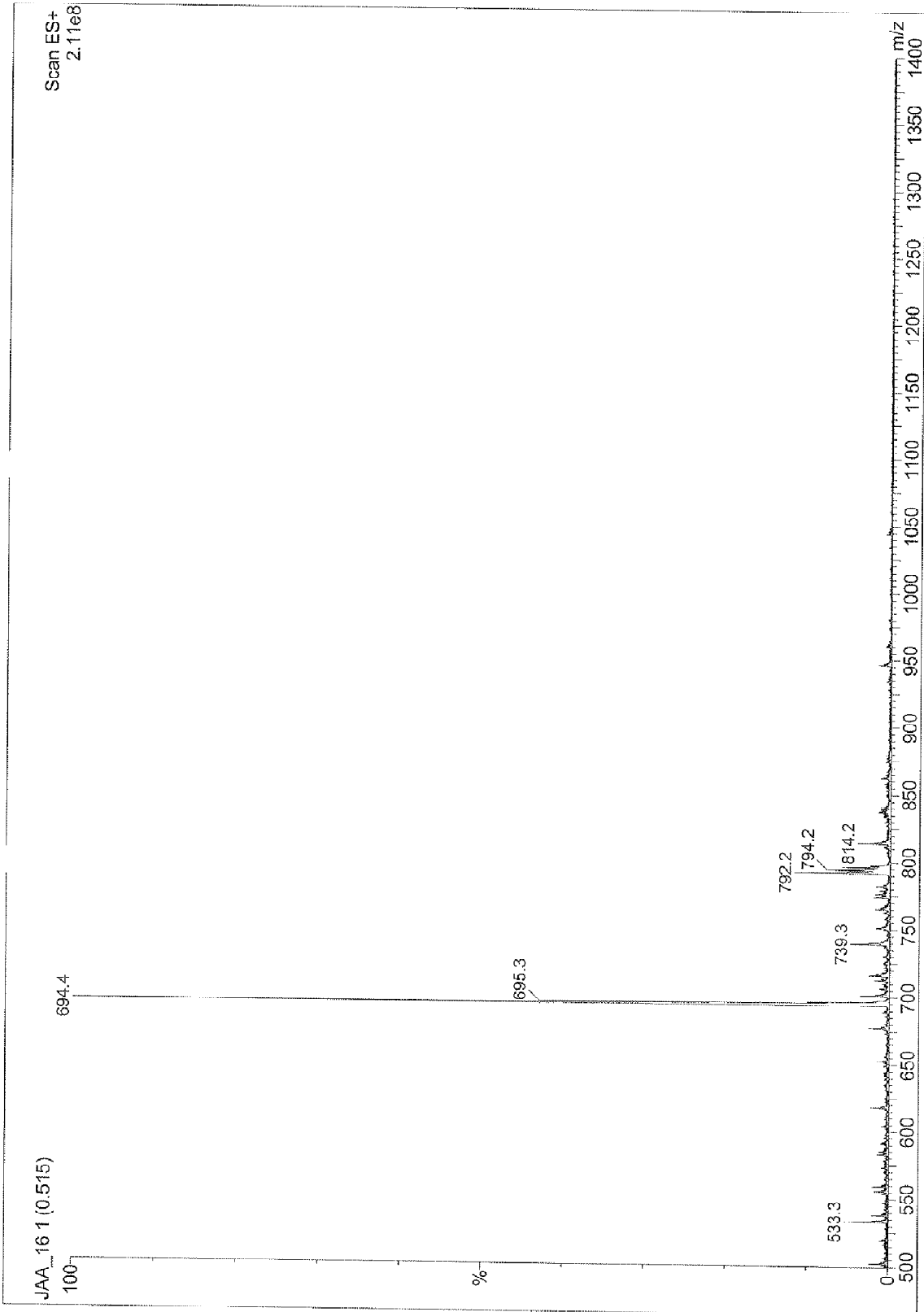
Vedlegg 12. Cyklisk beskyttet pentapeptid **18**) L-Phe(4-I)<sup>4</sup>FC131



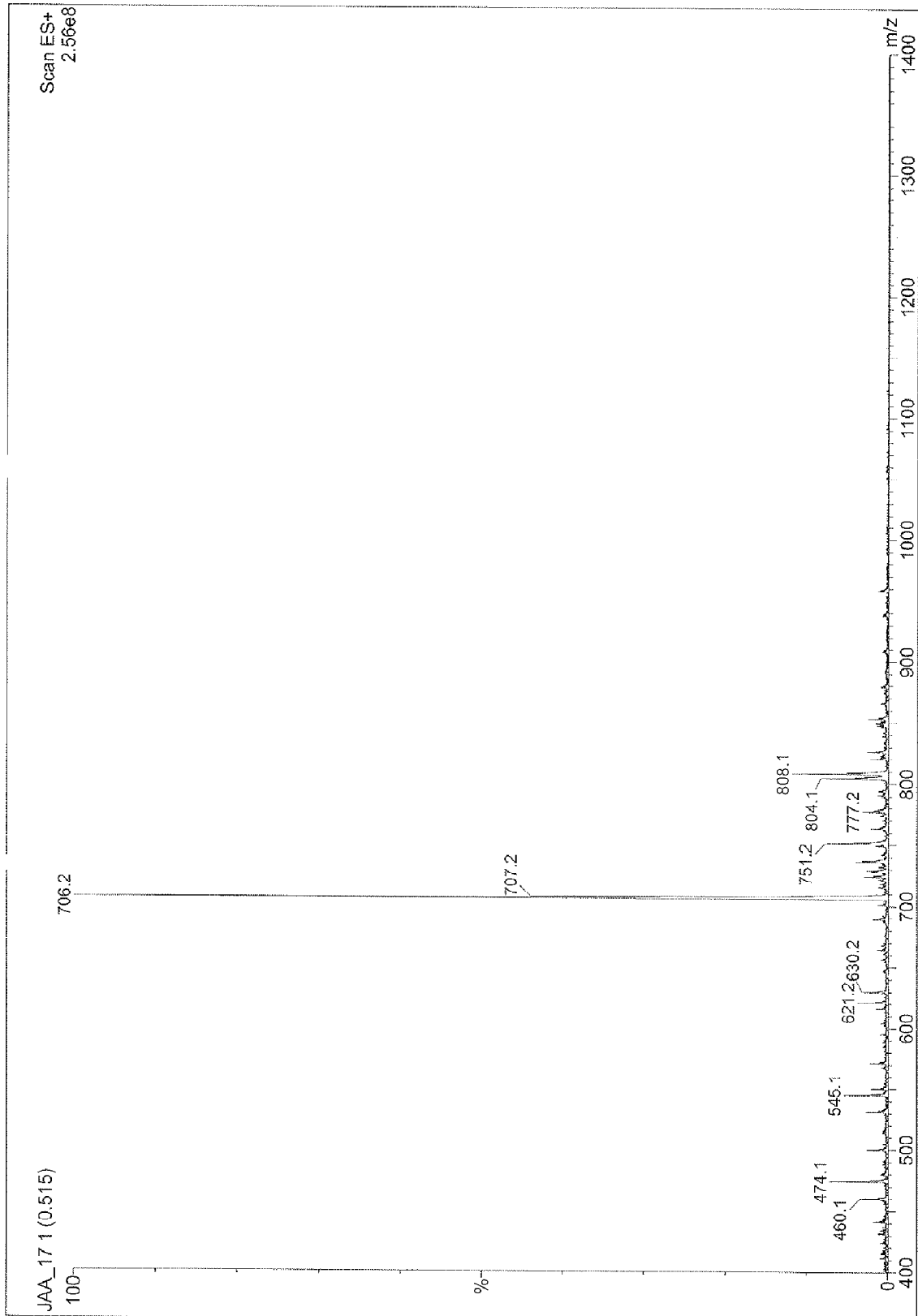
Vedlegg 13. Cyklisk ubeskyttet pentapeptid 1) L-1-Nal<sup>4</sup>FC131



Vedlegg 14. Cyklisk ubeskyttet pentapeptid 2) L-Phe<sup>4</sup>FC131

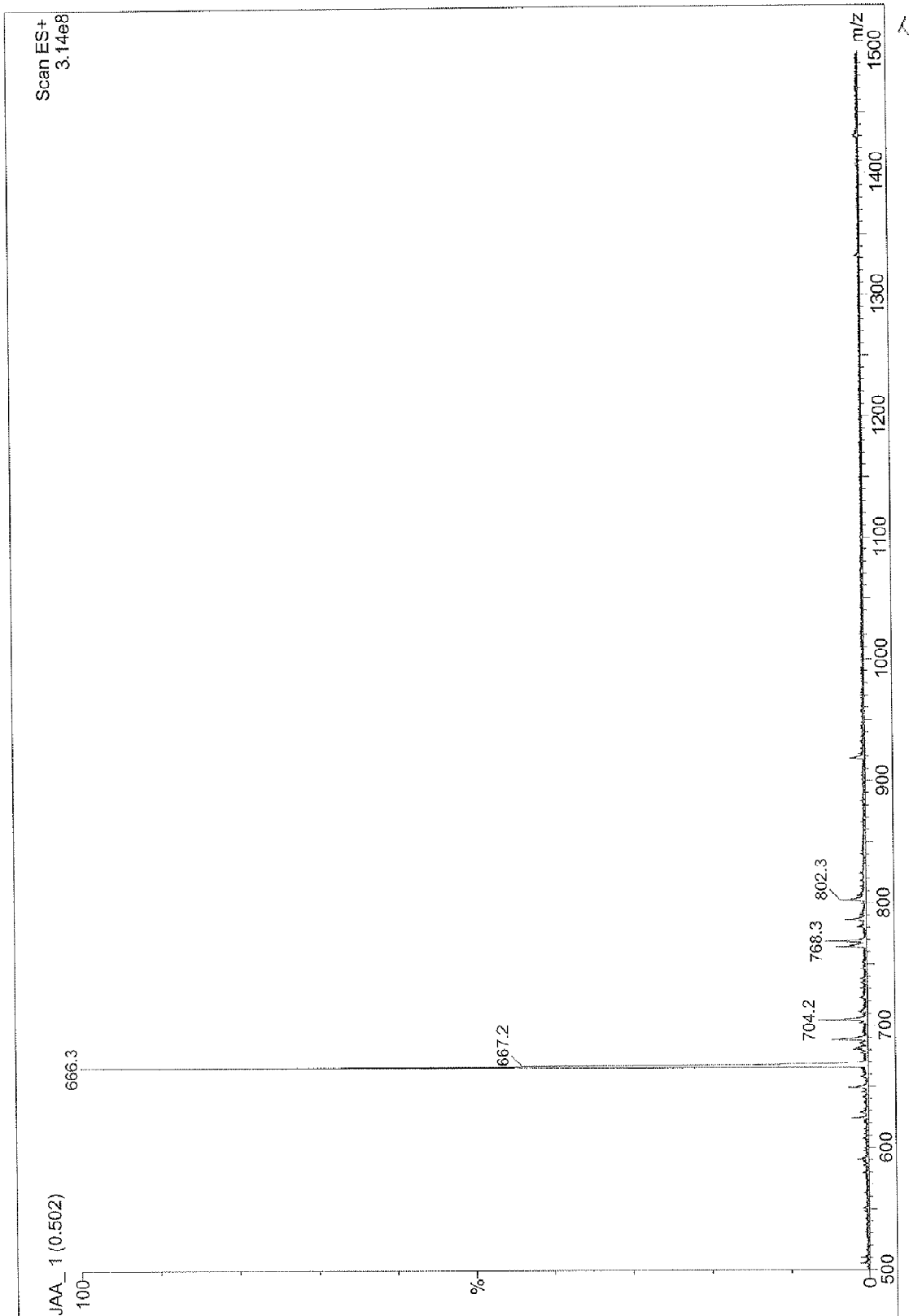


Vedlegg 15. Cyclisk ubeskyttet pentapeptid 3) L-h-Phe<sup>4</sup>FC131

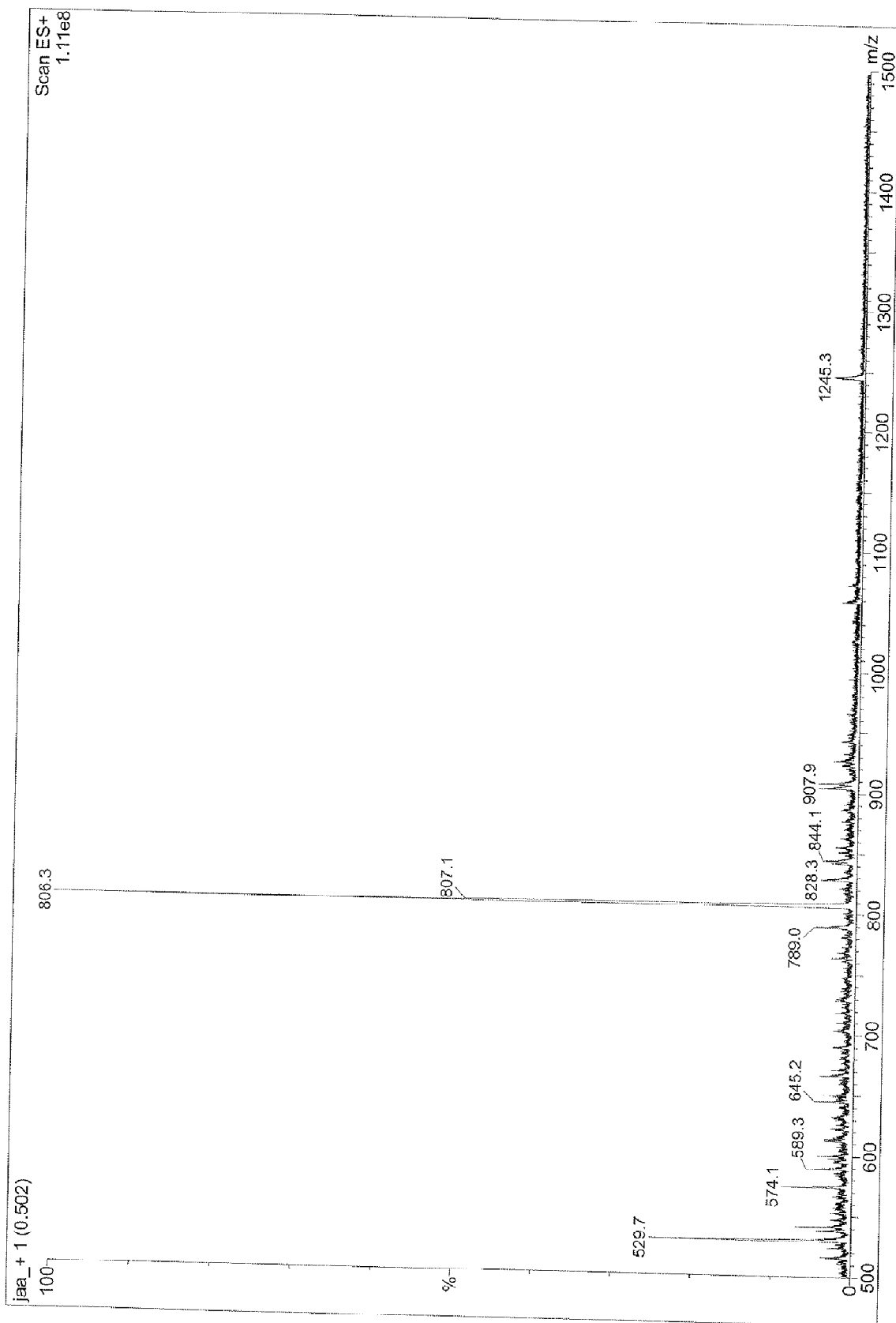


Vedlegg 16. Cyclisk ubeskyttet pentapeptid 4) L- $\beta$ -sty-Ala<sup>4</sup>FC131

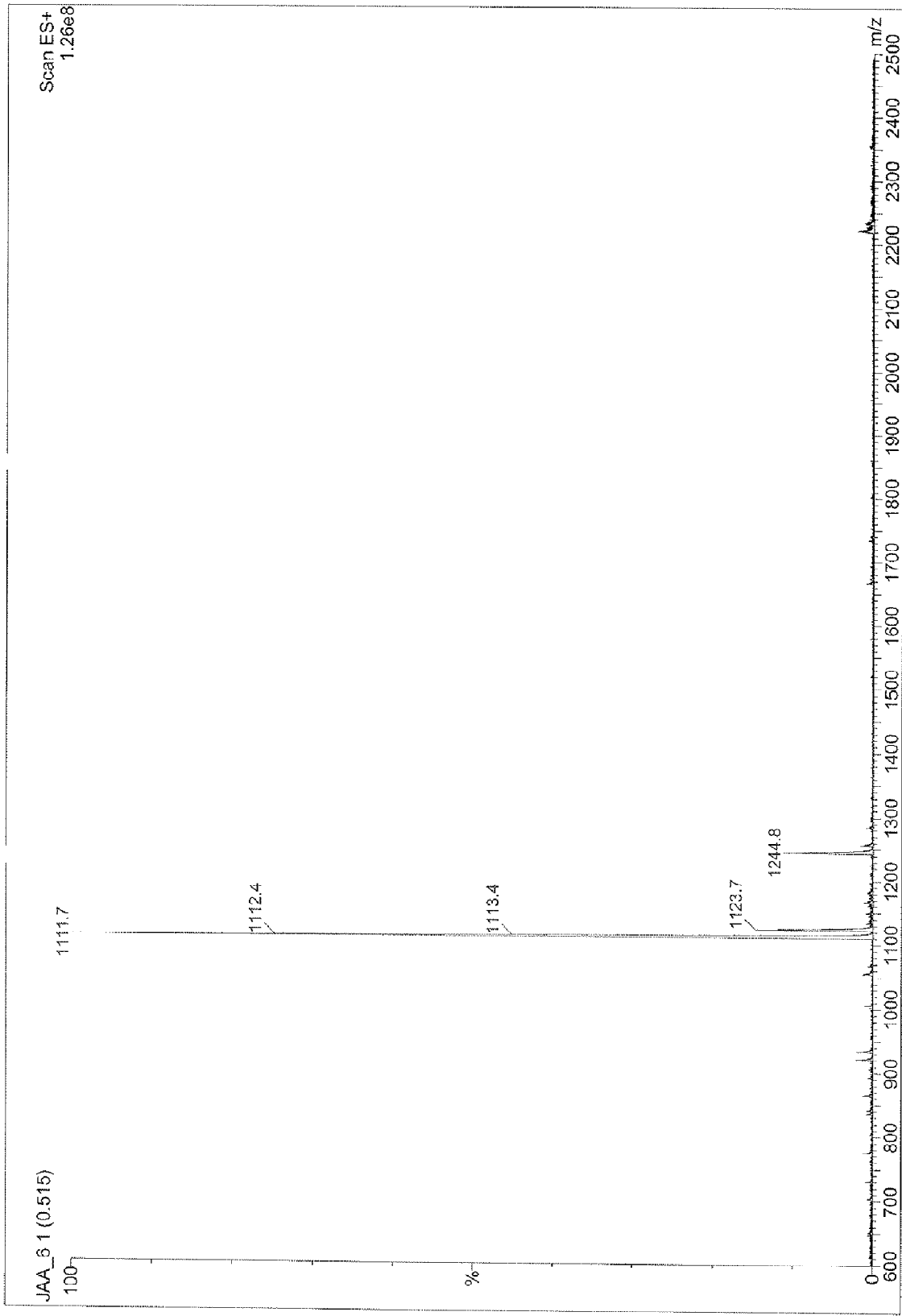




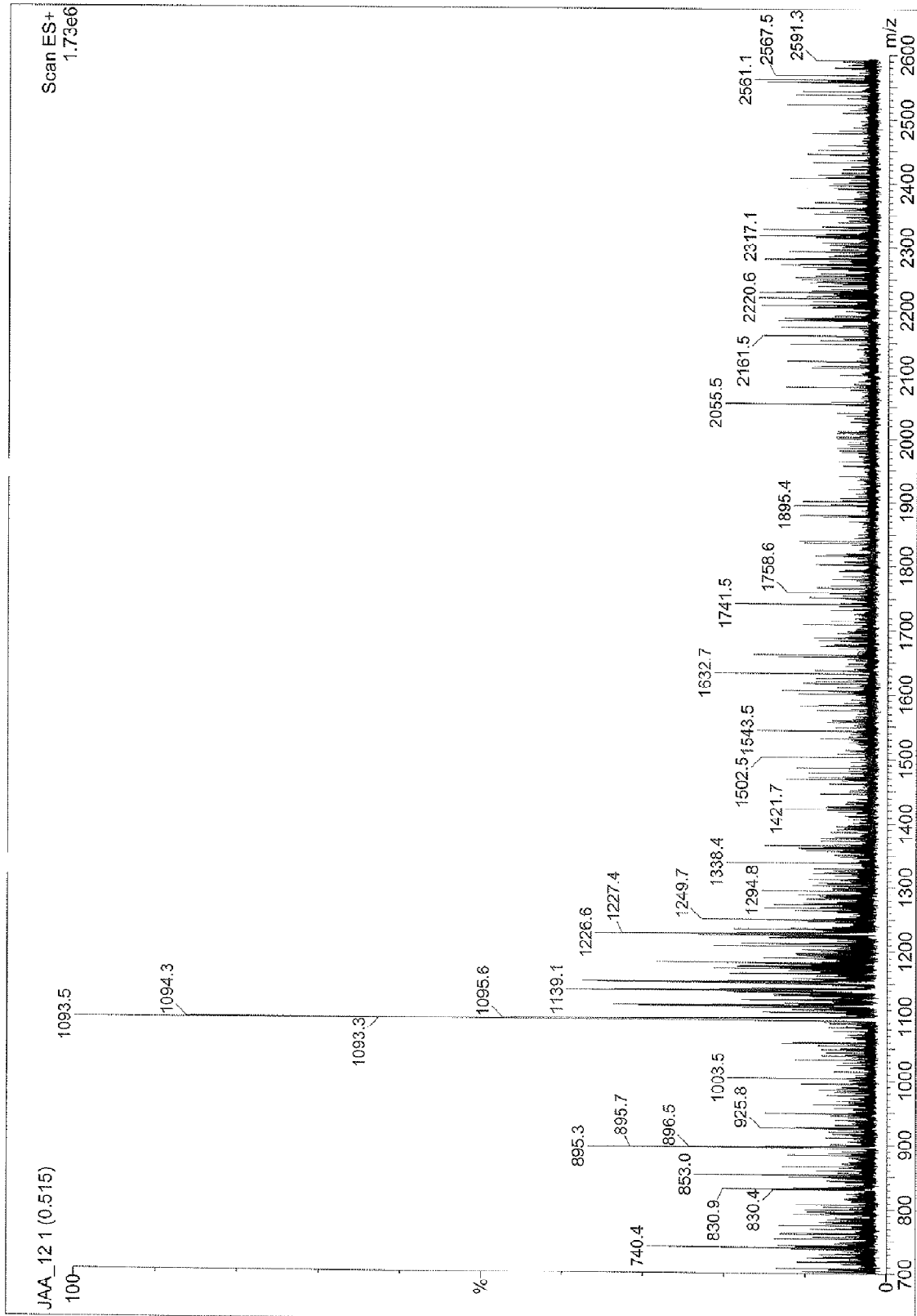
Vedlegg 17. Cyklisk ubeskyttet pentapeptid 5) L-Phg<sup>4</sup>FC131



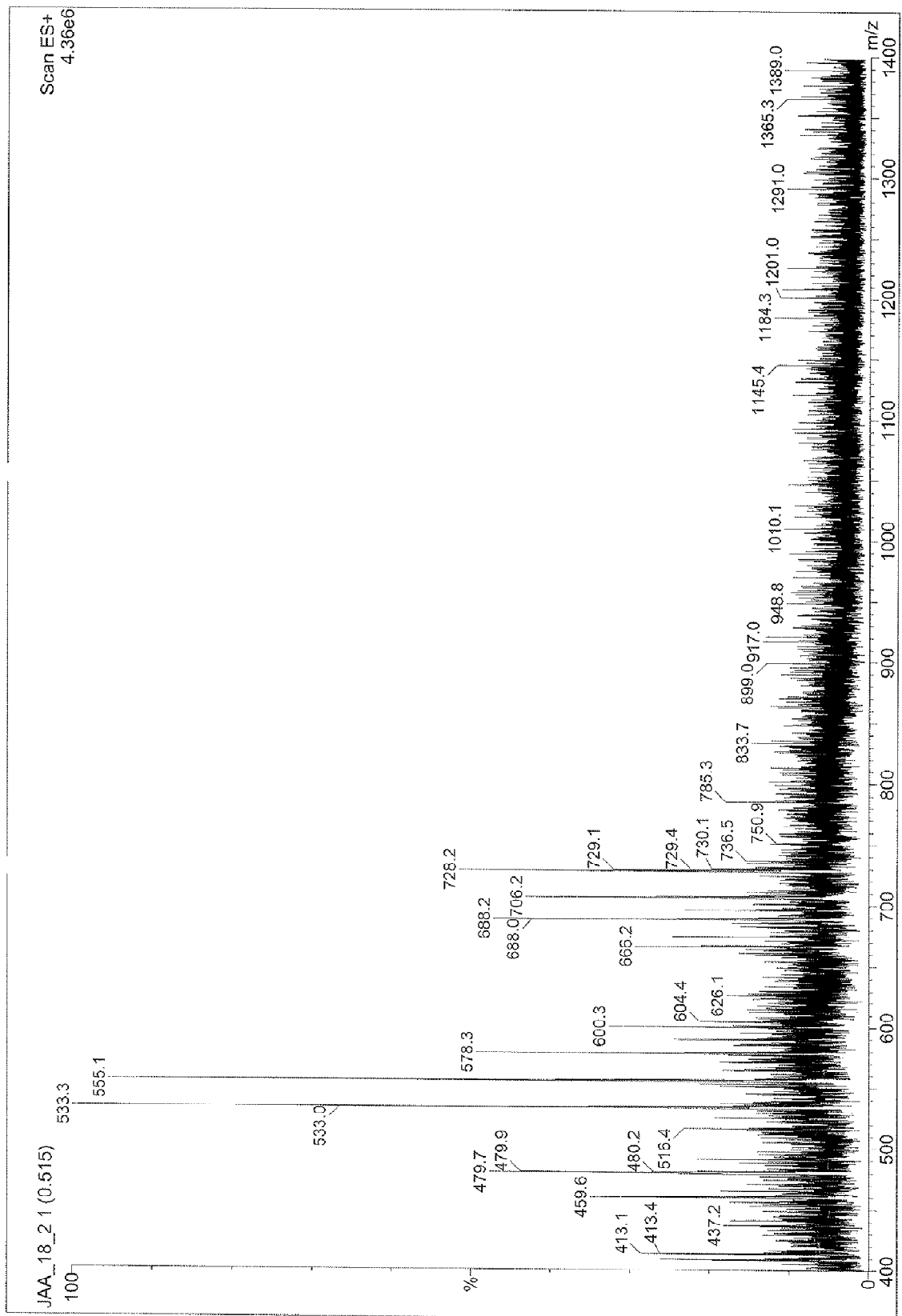
Vedlegg 18. Cyklisk ubeskyttet pentapeptid **6**) L-Phe(4-I)<sup>4</sup>FC131



Vedlegg 19. Lineært beskyttet tetrapeptid T1



Vedlegg 20. Cyklisk beskyttet tetrapeptid **T1.2**



Vedlegg 21. Cyklisk ubeskyttet tetrapeptid T1.3