

Samenvatting

Onderzoek naar overgangsmetaal-katalyse in water voor *in vivo* toepassingen

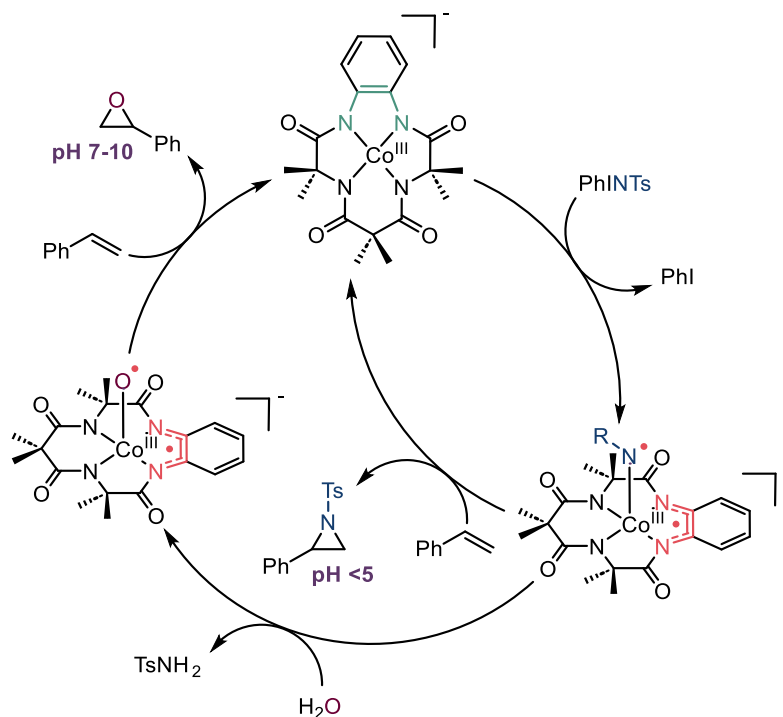
Katalyse door overgangsmetalen blijkt een krachtig hulpmiddel te zijn om moleculaire transformaties uit te voeren, die zonder katalyse synthetisch uitdagend of zelfs onmogelijk zijn. In aanwezigheid van een katalysator kunnen reacties met een hoge selectiviteit verlopen. Katalyse vindt daarom een brede toepassing in verschillende gebieden van de chemie. Recentelijk zijn overgangsmetaal-gekatalyseerde reacties succesvol uitgevoerd in cellen (*in vitro*) en in levende systemen (*in vivo*). In dit deelgebied van de bioorthogonale chemie worden katalysatoren gebruikt die niet in de natuur voorkomen om het repertoire van natuurlijke biosynthetische en metabole reacties aan te vullen: 'new-to-nature' katalysatoren voor 'new-to-nature' reacties.

Zoals beschreven in **Hoofdstuk 1**, worden deze new-to-nature katalysatoren veelal gebruikt om biosynthetische en metabole reacties na te bootsen die voorkomen in de natuur, zoals redox reacties en hydrogenaties. Ze worden ook gebruikt om reacties uit te voeren die voor de levende natuur nieuw zijn, zoals modificaties van functionele groepen, ontschermings-reacties, cycloaddities, cyclisaties en koppelingsreacties met new-to-nature substraten. Overgangsmetaal-gekatalyseerde reacties hebben geleid tot verschillende toepassingen. Deze variëren van geïnduceerde celdood door het verstoren van cellulaire evenwichten tot de gecontroleerde vrijgave en synthese van fluoroforen, geneesmiddelen en andere biologisch actieve verbindingen. Deze reacties kunnen nuttige toepassingen vinden in de biochemie en medicinale chemie, omdat ze alternatieve routes bieden voor bijvoorbeeld het chemisch labelen van biomoleculen en de behandeling van kanker.

De tot nu toe behaalde resultaten illustreren de potentie van overgangsmetaal-katalyse en de toepassingen ervan in biologische omgevingen. Toch is de reikwijdte nog enigszins beperkt wat betreft het scala van overgangsmetaal-gekatalyseerde reacties die in laboratoria zijn uitgevoerd voor synthetische toepassingen. Het vertalen van

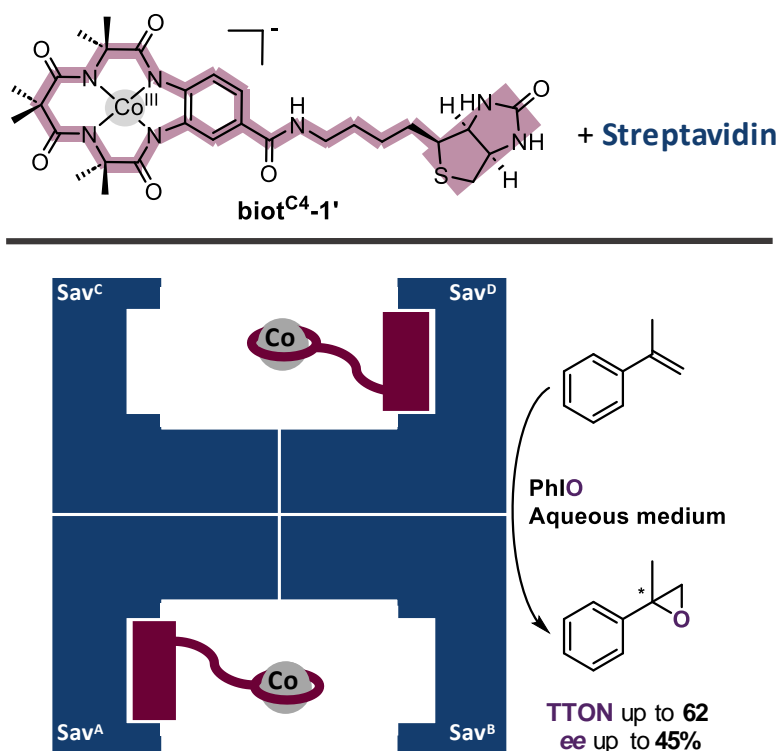
overgangsmetaal-gekatalyseerde reacties van glazen kolven naar levende cellen is niet triviaal, omdat de omstandigheden in cellen sterk verschillen van de gecontroleerde en aanpasbare omstandigheden in een kolf. De ontwikkeling van katalytische systemen voor toekomstige *in vivo* toepassingen verloopt daarom via vele stappen. Dit begint met het evalueren van hun reactiviteit, selectiviteit en stabiliteit in water en onder biologisch relevante en biomimetische omstandigheden. Dit proefschrift is daarom gericht op het verkennen van overgangsmetaal-gekatalyseerde reacties die interessant zijn voor toekomstige *in vivo* toepassingen in waterige media.

In **Hoofdstuk 2** zijn we begonnen met het uitvoeren van styreen aziridinatie in water en onder biologisch relevante condities met behulp van een in water oplosbaar $\text{Li}[\text{Co}^{\text{III}}(\text{TAML}^{\text{red}})]$ -complex. Het uitvoeren van nitreen-overdracht reacties in water spreekt niet voor zich, omdat het meestal gepaard gaat met de vorming van zuurstofhoudende nevenproducten. De door kobalt-gekatalyseerde nitreen-overdracht reactie naar styreen gaf inderdaad styreenoxide als hoofdproduct, naast kleine hoeveelheden aziridine product. In een gecombineerde experimentele en theoretische benadering onthulden we de rol van water bij de epoxidevorming. Dit bleek plaats te vinden via de hydrolyse van de kobalt-nitreen-radicaal tussenproducten, waarbij oxyl-radicaal tussenproducten ontstaan die actief zijn in de zuurstofatoom-overdracht naar styreen. Op basis van de inzichten uit computationele en experimentele mechanistische studies ontdekten we dat de hydrolyse van nitreen-radicaal complexen voorkomen of gestimuleerd kan worden door de pH te veranderen. Op deze manier kan selectief het gewenste aziridine product (pH = 4) of het styreenoxide product (pH tussen 7 en 10) worden verkregen.



Schema 1. Aziridinitie van styreen met de [Co^{III}(TAML^{red})]⁻ katalysator in de water: het begrijpen en voorkomen van epoxidatie reacties via de hydrolyse van het nitreen (Hoofdstuk 2).

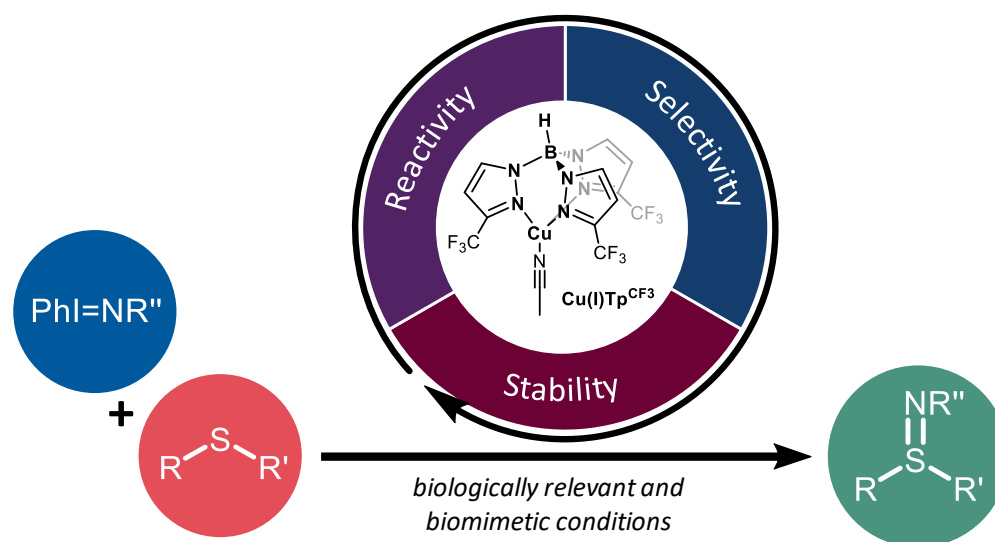
Via Co(TAML)-gekatalyseerde nitreen- en zuurstofatoom-overdracht kunnen (respectievelijk) aziridines en epoxides selectief worden gevormd in water. Aangezien de meeste geneesmiddelen meerdere stereogene centra hebben, is de asymmetrische synthese van deze verbindingen ook van groot belang. Middels de experimenten beschreven in **Hoofdstuk 3** probeerden we asymmetrische, radicaal-type zuurstofatoom-overdracht mogelijk te maken met behulp van een Co(TAML)-gebaseerd kunstmatig metaal-enzym. Deze werd gegenereerd door de verankering van een achirale, gebiotinyleerde Co(TAML)-katalysator in streptavidine. In aanwezigheid van iodosylbenzeen en α -methylstyreen levert het op Co(TAML)-gebaseerde kunstmatige metaal-enzym het corresponderende enantio-verrijkte epoxide op met verhoogde TTON's. Deze resultaten illustreren een verbetering aangaande de enantioselectiviteit en de activiteit vergeleken met gelijksoortige, enantiopure Co(TAML) katalysatoren. De kristalstructuren van twee verschillende Co(TAML) · Sav metaal-enzymen onthullen het belang van de niet-covalente interacties binnen de secundaire coördinatie omgeving. Deze beïnvloeden de precieze lokalisatie van de katalysator in het artificiële enzym, wat terug te zien is in de vorming van het enantio-verrijkte epoxide.



Schema 2. Een op Co(TAML)-gebaseerd kunstmatig metaal-enzyme voor asymmetrische radicaal-type zuurstofatoom-overdracht katalyse (Hoofdstuk 3).

Omdat het $\text{Li}[\text{Co}^{\text{III}}(\text{TAML}^{\text{red}})]$ -complex zure omstandigheden vereist voor selectieve nitreen-overdracht katalyse in water, zochten we naar een katalytisch systeem dat beter compatibel is met biologisch relevante en biomimetische omstandigheden. In **Hoofdstuk 4** staan onze experimenten beschreven om te onderzoeken hoe koper-gekatalyseerde nitreen-overdracht in waterige media geschikt gemaakt kunnen worden voor toekomstige toepassingen *in vivo*. De $\text{Cu}(\text{I})\text{Tp}^x$ -katalysatoren die in deze studie worden gebruikt vertonen een uitstekende reactiviteit voor nitreen-overdracht, een hoge chemoselectiviteit en voldoende tolerantie voor biomoleculen. Hierdoor kan de sulfimidatiereactie van thioethers onder biologisch relevante en biomimetische omstandigheden worden uitgevoerd. De sulfimidatie van een prodrug leverde een gerapporteerd medicijnmolecuul op met anti-kankeractiviteit. Hiermee werd het principe aangetoond voor potentiële intracellulaire toepassingen voor de synthese van medicijnen. Tot slot laten we in dit hoofdstuk ook zien hoe oplosbaarheidsproblemen met betrekking tot de katalysator in gebufferde media kunnen worden aangepakt door de katalysator in te kapselen in liposomen. De beschermende functie van de liposomen

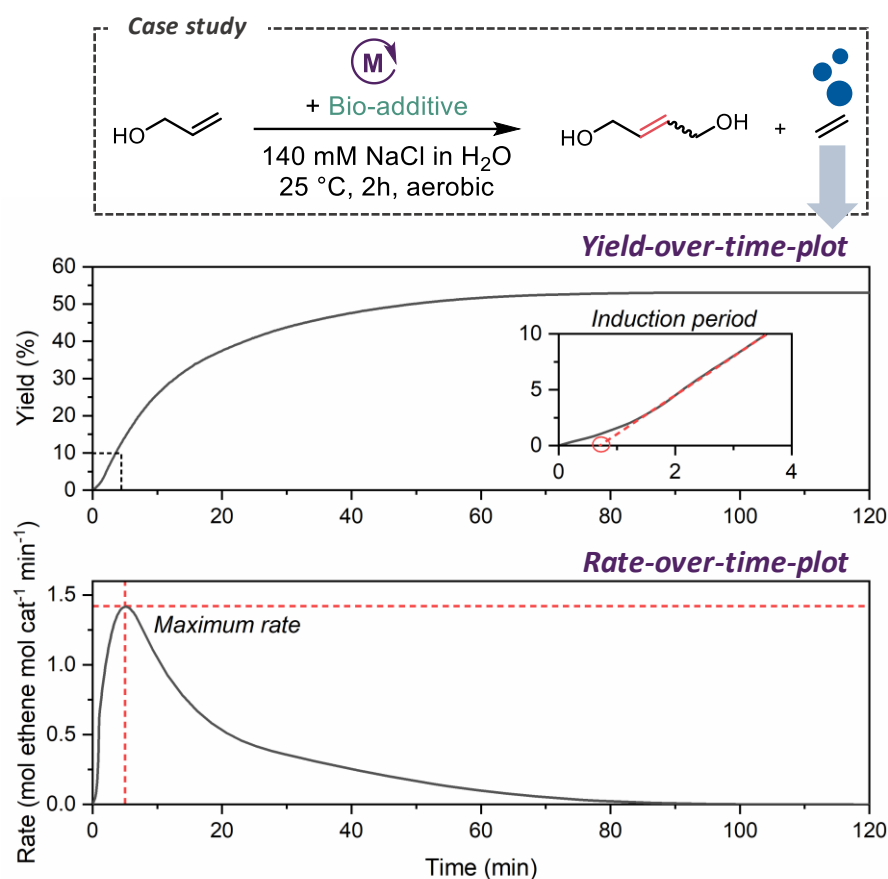
bleek ook een positief effect te hebben op de ingekapselde katalysator en diens compatibiliteit met biomoleculen.



Schema 3. Koper-gekatalyseerde sulfimidatie in waterige media: een snelle, chemoselectieve reactie met een goede tolerantie voor biomoleculen (Hoofdstuk 4).

Tijdens ons onderzoek hebben we gemerkt dat het een behoorlijke uitdaging is om kinetische gegevens onder biologisch relevante en biomimetische omstandigheden te verkrijgen. Hoge concentraties van zouten en biomoleculen bemoeilijken de toepassing van de gebruikelijke analytische technieken in oplossing en alternatieve protocollen zijn slechts beperkt beschikbaar. Omdat gedetailleerde mechanistische gegevens cruciaal zijn voor het ontwikkelen van katalysatoren met het oog op *in vivo* toepassingen, hebben we een protocol ontwikkeld om de reactiekinetiek onder biomimetische omstandigheden te meten. Dit protocol staat beschreven in **Hoofdstuk 5** en is zeer compatibel met complexe media, omdat het gebaseerd is op gasvorming als hulpmiddel. Door honderden datapunten te produceren via 'bellentellen' kunnen reactiesnelheden worden verkregen als functie van de reactievoortgang. Dit leidt tot een eenvoudige beoordeling van kritieke katalysatorparameters zoals inductie- en deactiveringsprocessen. Bovendien laten we zien dat de voortgang van twee bioorthogonale chemische reacties met overgangsmetalen, waaronder de ruthenium-gekatalyseerde olefine kruis-metathese, nauwkeurig kan worden gevolgd in aanwezigheid van verschillende bioadditieven, celcultuurmedia en cellysaten. Het protocol dat we hebben ontwikkeld is breed toepasbaar, aangezien veel

overgangsmetaal-gekatalyseerde, bioorthogonale reacties die momenteel worden gebruikt en ontwikkeld voor verschillende toepassingen in cellen en levende systemen één of meer equivalenten gas per product vormen.



Schema 4. Gasvorming als hulpmiddel om de kinetiek van een reactie te bestuderen onder biomimetische omstandigheden (Hoofdstuk 5).

Door het onderzoeken van overgangsmetaal-gekatalyseerde reacties in water voor *in vivo* toepassingen, heeft dit proefschrift bijgedragen aan het deelgebied van de bioorthogonale chemie dat gewijd is aan het aanvullen van het repertoire van reacties dat in de levende natuur voorkomt. Onze studies hebben de uitdagingen onthuld die geassocieerd worden met de uitvoering van overgangsmetaal-katalyse in waterige media en hoe deze kunnen worden aangepakt. Dit hebben we bereikt door een gedetailleerd begrip van een katalytisch systeem of door het gebruik van gastheersystemen zoals liposomen. Naast deze fundamentele studies hebben we verkennende studies uitgevoerd onder biologisch relevante en biomimetische omstandigheden in de context van intracellulaire synthese van geneesmiddelen. We

hebben een kunstmatig metaal-enzym gebaseerd op kobalt gebruikt om enantio-verrijkte epoxides te produceren via asymmetrische zuurstofatoom-overdracht en op koper-gebaseerde katalysatoren om een medicijn te synthetiseren via nitreen-overdracht. Daarnaast hebben we een nieuw en veelzijdig protocol ontwikkeld dat gedetailleerde kinetische studies in complexe reactiemedia mogelijk maakt, vergelijkbaar met de cellulaire omgeving, om de vertaling van overgangsmetaal-katalyse van glazen kolven naar cellen te vergemakkelijken. Daarom verwachten we dat onze bevindingen de verdere ontwikkeling kunnen ondersteunen van new-to-nature katalysatoren en reacties. Dit betreft zowel de katalysatoren en reacties die zijn onderzocht in dit proefschrift, als deze die nog moeten worden onderzocht in waterige media voor toekomstige toepassing in cellen en levende systemen.