



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Lipophilic iminosugars : synthesis and evaluation as inhibitors of glucosylceramide metabolism

Wennekes, T.

Citation

Wennekes, T. (2008, December 15). *Lipophilic iminosugars : synthesis and evaluation as inhibitors of glucosylceramide metabolism*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13372>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/13372>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Samenvatting | Summary in Dutch

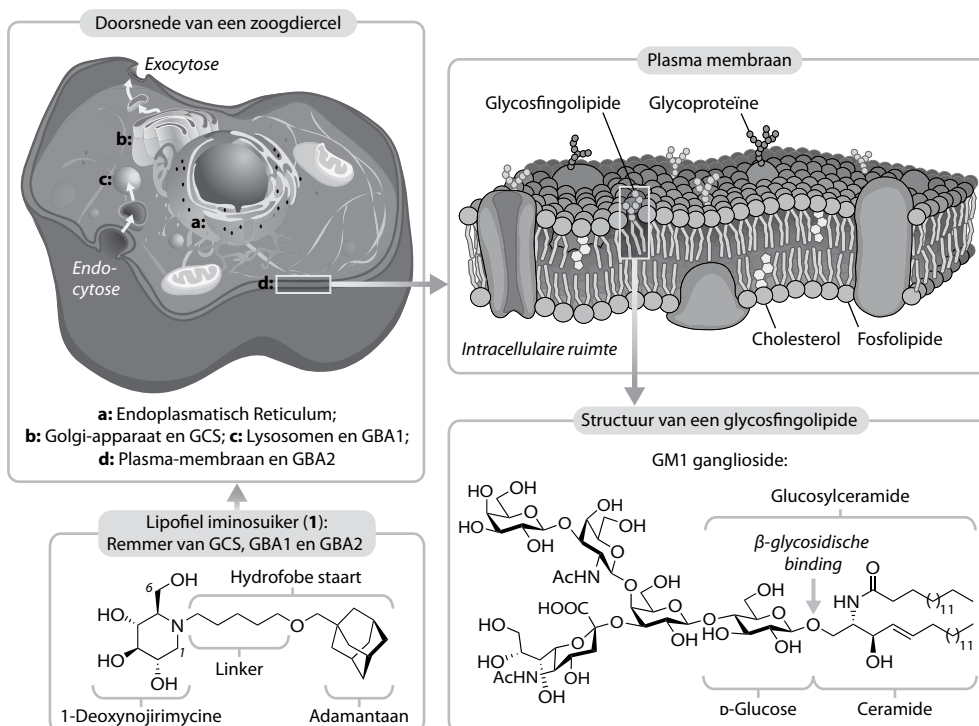
Lipofiele Iminosuikers

Synthese en Evaluatie als Remmers van Glucosylceramide Metabolisme

Alle menselijke cellen zijn aan de buitenkant bekleed met een glycocalyx, een dikke laag van diverse soorten suikerstructuren (koolhydraten). Het merendeel van deze suikers is verankerd in het plasma-membraan door conjugatie met een lipide (glycolipiden) of een eiwit (glycoproteïnen; zie figuur op pagina 312). Een fysiologisch belangrijke en omvangrijke klasse van glycolipiden is die van de glycosfingolipiden, waarvan de structuur bestaat uit een oligosaccharide, een variabele hoeveelheid van aaneengeschakelde monosaccharides, die aan het lipide ceramide gebonden is. Onderzoek heeft uitgewezen dat glycosfingolipiden niet willekeurig verspreid zijn tussen de fosfolipiden van het plasma-membraan, maar zich tezamen met cholesterol groeperen in microdomeinen, de zogenoemde lipide 'rafts'. Glycosfingolipiden zijn betrokken bij vele biologische processen zoals communicatie tussen cellen en signaaloverdracht via membraan gebonden receptoren. Ze spelen ook een rol in diverse ziektes. De exacte rol die glycosfingolipiden in zowel ziekte als gezondheid vervullen is echter vaak niet volledig bekend.

Het manipuleren van de hoeveelheid glycosfingolipiden is een van de mogelijkheden om hun functies te onderzoeken. Controle kan worden bereikt door invloed uit te oefenen op de enzymen die hun aanmaak en afbraak bewerkstelligen, oftewel die betrokken zijn bij hun metabolisme. Glycosfingolipide metabolisme begint met de biosynthese van ceramide in de membranen van het endoplasmatisch reticulum. Hierna wordt ceramide gekoppeld aan de suiker D-glucose op de buitenkant van het Golgi-apparaat door het membraan gebonden glycosyltransferase enzym, glucosylceramide synthase (GCS). Binnen in het Golgi-apparaat worden vervolgens stapsgewijs andere suikers aan het product glucosylceramide gekoppeld door diverse glycosyltransferases. Dit resulteert uiteindelijk in het uitgebreide palet van complexe glycosfingolipiden die door de cel gebruikt wordt (bv. GM1 ganglioside; zie figuur). Deze glycosfingolipiden worden daarna in membraanblaasjes naar het cel-oppervlak getransporteerd (exocytose). Afbraak van glycosfingolipiden (katabolisme) gebeurt door het afsnoeren van plasma-membraanblaasjes en het transport daarvan (endocytose) naar de lysosomen van de cel. Hier verwijderen glycosidases één voor één de suikerresiduen. In de laatste stap van de afbraak wordt met glucosylceramide als substraat door glucocerebrosidase (GBA1) en assistentie van het activator eiwit saposin C de laatste suiker verwijderd. Een derde enzym, β -glucosidase 2 (GBA2), is daarnaast ook in staat de β -glycosidische band in

glucosylceramide te hydrolyseren. Dit membraan-gebonden enzym bevindt zich nabij het plasma-membraan. Zijn functie is vooralsnog onbekend. Glucosylceramide neemt een unieke positie in omdat het de meest simpele glycosfingolipide is waaruit bijna alle complexere varianten worden vervaardigd. Het vertegenwoordigt tevens het substraat in de laatste stap van het katabolisme. De drie enzymen die betrokken zijn bij het metabolisme van glucosylceramide zijn dus de ideale kandidaten om de hoeveelheid glycosfingolipiden te kunnen beïnvloeden.



Het onderzoek dat beschreven wordt in dit proefschrift heeft de ontwikkeling van selectieve remmers te ontwikkelen voor GCS, GBA1 en GBA2 ten doel. De structuur van deze remmers is gebaseerd op lipofiel iminosuiker **1** (zie figuur). Iminosuikers zijn natuurlijk voorkomende derivaten van suikers waarbij het zuurstof atoom in de ring is vervangen door een stikstof atoom. Het synthetische iminosuiker **1** is een sterke remmer van zowel GCS, GBA1 als GBA2, maar ook van diverse andere niet aan glucosylceramide gerelateerde glycosidases. Meer selectievere remmers voor elk van de drie doel enzymen zijn nodig omdat hierdoor het glucosylceramide metabolisme nauwkeuriger gemanipuleerd kan worden. Bovendien zullen de hieruit resulterende effecten op biologische processen door verminderde aanwezigheid van bijwerkingen beter te interpreteren zijn. De selectievere remmers werden ontwikkeld door analoga van **1** te ontwerpen, te synthetiseren en te evalueren op hun capaciteit de diverse enzymen te remmen.

De algemene inleiding van dit proefschrift (**Hoofdstuk 1**) behandelt de biologische basis van het uitgevoerde onderzoek vanuit een historisch perspectief gezien. Het metabolisme van glycosfingolipiden wordt besproken met de nadruk op de beschikbare kennis over de werking van GCS, GBA1 en GBA2. Vervolgens wordt de huidige kennis over de rol die glycosfingolipiden in (patho)fysiologische processen vervullen uiteengezet, alsmede de therapeutische rol die remmers van glucosylceramide metabolisme kunnen vervullen in de behandeling van verscheidene ziektes zoals de ziekte van Gaucher en type 2 diabetes. Het hoofdstuk eindigt met een overzicht van de tot nu toe ontwikkelde en gepubliceerde remmers van GCS, GBA1 en GBA2.

Bij aanvang van het hier beschreven onderzoek was een grote hoeveelheid van iminosuiker **1** nodig voor evaluatie in diverse biologische studies. **Hoofdstuk 2** beschrijft de ontwikkeling en optimalisatie van een synthetische route die geschikt is voor het verkrijgen van kilogram hoeveelheden van **1**. Door middel van tien reacties met 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-D-glucose, 1,5-pentanediol en 1-adamantanemethanol als grondstoffen kon onder cGMP omstandigheden iminosuiker **1** gemaakt worden in twee batches van ieder 1.38 kg. Met behulp van dit materiaal kon de verbetering van glycemisch controle (op bv. de bloedsuikerspiegel) in diermodellen van type 2 diabetes onder invloed van **1** worden bestudeerd. Hoewel deze verbetering aan de remming van GCS wordt toegeschreven was dit vanwege de remming van meerdere andere enzymen door **1** niet met zekerheid vast te stellen.

Het onderzoek van **Hoofdstuk 3** poogt de verbeterde controle eenduidig te verklaren door het ontwikkelen van een meer selectieve remmer voor GCS. Hiervoor werden analoga van **1** met andere stereochemie op de C-4 en C-5 posities van het 1-deoxynojirimycine iminosuiker ontwikkeld. Een analoog van **1** met *L-ido* stereochemie (C-5 epimeer) bleek een even sterke en bovendien selectievere remmer van GCS te zijn. Vergelijking van deze remmer met **1** in twee diermodellen van type 2 diabetes liet zien dat de verbeterde glycemische controle m.b.v. **1** wordt verkregen door een combinatie van twee effecten: de verlaging van de cellulaire glycosfingolipide concentratie door GCS remming en de hieruit resulterende verbeterde gevoeligheid van de insuline receptor alsmede de gereduceerde opname van suikers uit voedsel door remming van darm glycosidases.

Hoofdstuk 4 behandelt de synthese van dimeer variaties van **1** en het *L-ido* analoog uit hoofdstuk 3. Bij dit ontwerp werd het iminosuiker pentyl-linker gedeelte van de remmers verdubbeld en werden deze twee elementen op twee verschillende manieren aan één adamantaan bevestigd. Evaluatie van de vier dimeer variaties voor remming van GCS, GBA1 en GBA2 liet een vergelijkbare selectiviteit maar een verminderde activiteit zien in vergelijking met hun monovalente tegenhangers. Een mogelijk 'bivalent' effect veroorzaakt door dimerisatie van het iminosuiker, dient dus voorlopig te worden uitgesloten.

Het onderwerp van **Hoofdstuk 5** is het bestuderen van het effect op de remming wanneer de hydrofobe staart van de ring stikstof in **1** wordt verplaatst naar de C-1, O-2,

O-3, O-4 of O-6 positie. Het aldus vrijgekomen secundaire amine werd gealkyleerd tot een tertiair amine (als in **1**) met een methyl of butyl groep. Onder de O-2 en O-6 variaties van deze serie analoga bevonden zich drie selectieve GBA1 remmers. Met uitzondering van de C-1 modificatie resulteerde alle verplaatsingen van de hydrofobe staart tot verlies van de capaciteit om GCS te remmen.

Hoofdstuk 6 behandelt het vervolgonderzoek naar de structuur-activiteit relatie van de C-1 analoga, aza-C-glycosiden genaamd. β -Aza-C-glucosiden, zoals besproken in hoofdstuk 5, werden gesynthetiseerd door additie van een acetyleen anion derivaat van de hydrofobe staart op gluconolacton. Na een reductie/oxidatie/dubbele reductieve aminering sequentie werden na ontscherming de eindproducten verkregen. Hierbij werd gevarieerd in de linker lengte en de alkylering van het stikstof atoom. Een serie van α -aza-C-glycosiden met een D-*gluco* (als in **1**), L-*ido* of D-*xylo*-iminosuiker werd bereid met behulp van een 'Grubbs' gekatalyseerde cross-metathese reactie. Deze serie bevatte tevens variërende linker lengtes en hydrofobe staarten. Geen van de gesynthetiseerde verbindingen vertoonde een sterkere remming van GCS dan **1** of de C-1 analoga uit hoofdstuk 5. Eén β -aza-C-glucoside met een acetyleen in de linker lengte bleek een selectieve remmer van GBA2 te zijn. Onder de α -aza-C-D-xylosiden bevonden zich meerdere zeer sterke en selectieve GBA1 remmers.

Hoofdstuk 7 bespreekt de synthese van diverse lipofiele piperidine en pyrrolidine iminosuikers met behulp van de Staudinger/aza-Wittig/Ugi drie-component reactie. Onder deze verbindingen die variëren in de stereochemie, substitutie van het iminosuiker op de C-1 positie en de substitutie van het stikstof atoom, bevonden zich een remmer van GCS en een aantal remmers van GBA1 en GBA2.

Tot slot bespreekt **Hoofdstuk 8** enkele voorlopige resultaten van nog lopende studies en presenteert het een aantal mogelijke nieuwe remmers en hun toepassingen voor toekomstig onderzoek.

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek heeft diverse op lipofiel iminosuiker **1** gebaseerde selectieve remmers van GCS, GBA1 en GBA2 opgeleverd. Het succesvolle gebruik van lipofiele iminosuikers in diabetes type 2 modellen en de opheldering van hun duale actiemechanisme hierbinnen bieden uitzicht op de ontwikkeling van een therapie voor diabetes type 2. Doordat alle in dit proefschrift beschreven verbindingen zijn getest op zowel remming van GCS, GBA1, GBA2 en enkele andere glycosidases, is een hoeveelheid nieuwe informatie verkregen over de selectiviteit van remmers van het type lipofiel iminosuiker.