

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/37023> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Wong, Chung Sing

Title: The synthesis of mannose-derived bioconjugates and enzyme inhibitors

Issue Date: 2015-12-10

Samenvatting

Glycoconjugaten zijn betrokken bij een groot aantal biologische processen en onderwerp van vele studies. Glycoconjugaten kunnen aan lectine receptoren binden op basis van hun specifieke suiker structuur. Veel van deze lectines, en voornamelijk diegene aanwezig op cellen van het immuunsysteem, zijn lid van de C-type lectin familie. De mannose receptor, Dectrin-1 en 2 maar ook DC-SIGN vallen hieronder. Binnen immunologische studies en “targeting” strategieën zijn deze suiker-bindende receptoren interessante doelen om gebruik van te maken. Veel aandacht is besteed aan het ontwerp en synthese van artificiële glycoconjugaten om specifieke lectines te binden. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift richt zich voornamelijk op glycoconjugaten bestaande uit oligomannosides en kunstmatige mannose clusters die herkend worden door de mannose receptor of andere mannose bindende lectines.

Hoofdstuk 1 geeft een overzicht van verschillende mannose lectine-binding strategieën. Ondanks dat suiker eiwit interactie verschilt per lectine, worden de meeste beschouwd als multivalent. Enkele geselecteerde voorbeelden van lineaire en dendritische multivalente mannosyl conjugaten worden verder toegelicht waarbij de toepassing, synthese en biologische evaluatie in detail wordt behandeld. Tot slot wordt de synthese van de natuurlijke mannose *N*-glycaan conjugaten beschreven.

Hoofdstuk 2 beschrijft de synthese en biologische evaluatie van drie (oligo)mannosyl-DCG-04-conjugaten. Om de invloed van mannose op de cel opname te onderzoeken zijn verschillende mannoses variërend in grootte gekoppeld aan de irreversibele cathepsine remmer DCG-04 met een BODIPY fluorofoor. Het betreft een mono- tri- en heptamannoside waarbij

de natuurlijke *O*-glycosidische band in tact gehouden is. Middels een koper gecatalyseerde “click” reactie is deze verbonden met BODIPY-DCG-04. Behandeling van de constructen met cel lysaat toonde aan dat de hexamannoside conjugaat het slechts bond met cathepsines in cel lysaat. Echter, hexamannoside en trimannoside conjugaten vertoonden een hoge opname door levende cellen, in tegenstelling tot de monomannose conjugaat wat nauwelijks opname vertoonde. Verder was de trimannoside conjugaat een betere inhibitor in levende cellen dan de heptameermannoside variant.

In **Hoofdstuk 3** wordt de synthese van een mono- en tri-mannosyl-BODIPY-cyclophellitol construct beschreven. Deze constructen zijn ontworpen om selectief herkend en opgenomen te worden door Gacher cellen (macrophagen) door middel van mannose suiker herkenning. Het construct wordt opgenomen waarna het getransporteerd wordt naar het lysosoom. Door de aanwezigheid van α -mannosidase wordt het construct afgebroken waarna BODIPY-cyclophellitol, een “retaining β -glucosidase” probe vrij komt en bindt aan het enzym Glucocerebrosidase aanwezig in het lysosoom. De synthese kan verdeeld worden in vier onderdelen. 1) Mannose suiker synthese; 2) linker synthese aan de suikers; 3) de synthese van gedeeltelijk bescherm cyclophellitol en tot slot het assembleren van het constructen. Een nieuwe synthese route naar azidocyclophellitol wordt beschreven waarbij de azine pas in een laat stadium wordt geïntroduceerd. Biologische evaluatie toonde een opname van beide probes aan door de cel echter een lage binding was geobserveerd. De lage binding efficiëntie komt vermoedelijk door een ineffektieve hydrolyse van de mannose residuen.

Hoofdstuk 4 beschrijft de synthese en eerste immunologische resultaten van twintig gemannosyleerde peptiden conjugaten. Hierbij is gekeken naar de invloed van verschillende mannose clusters op de opname en antigeen presentatie van levende cellen. De peptide, SIINFEKLDEVA₅K, een MHC-I epitope, wordt opgenomen via de mannose receptoren waarna het epitope via de MHC-II route gepresenteerd wordt aan de T cel. Dit wordt ook wel “cross-presentation” genoemd. Aan het peptiden zijn mannose residuen geconjugeerd variërend in eenheden (1,2,3, en 6 eenheden) en verschillende

grootte (mono- di- en tri-mannosiden). Door een strategie toe te passen waarbij eerst het volledige peptide gesynthetiseerd wordt, kan zo het gewenste mannose residuen erop gekoppeld. Door deze strategie toe te passen kan uit één enkel peptide eenvoudig verschillende conjugaten verkregen worden. Cluster vorming van het product met het aanwezige Cu(I) zorgde voor product verlies tijdens het eerste zuiveringsproces. Dit is opgelost door gebruik te maken van de ionenwisselaar CupriSorb[®] waarna de opbrengst aanmerkelijk is verhoogd. Verrassend genoeg vertoonden de conjugaten met één of twee mono mannose residuen het hoogste T cel response. Echter een duidelijke trend tussen aantal mannose residuen en mannose grootte is niet zichtbaar.

Hoofdstuk 5 beschrijft de synthese van mannose geconfigureerd α - en β -cyclophellitol en de corresponderende aziridine derivaat. Deze verbindingen kunnen gebruikt worden als selectieve probes om retaining α - en β -mannosidase te remmen. Voor de synthese is een beschreven route gevolgd waarna de absolute conformatie van benzyl ether beschermd α - en β -aziridine cyclophellitol is gemeten met behulp van NMR spectroscopie. Zowel α - en β -aziridine cyclophellitol begaven zich in een 4H_3 conformatie wat bevestigd is met DFT berekeningen.

Het werk beschreven in **Hoofdstuk 6** is gebaseerd op voorgaand onderzoek van Walvoort die aantoonde dat 2-deoxy-fluoro- β -glucose met een *N*-phenyltrifluoroacetimide gesubstitueerde groep op het anomere centrum een verbeterde binding gaf met het enzym glucocerebrosidase dan zijn voorgangers. Dit hoofdstuk beschrijft de synthetische toegankelijkheid van verschillende geconfigureerde 2-deoxy-fluoro suikers met verschillende *N*-phenyltrifluoroacetimide substituenten als vertrekkende groep op de anomere positie. Helaas blijken de 2-deoxy-fluoro imidaat suikers zeer instabiel te zijn en gedeeltelijke tot volledige degradatie van het product tijdens HPLC zuiveringen kon niet worden voorkomen. Enkel α -2-deoxy-2-fluoro-mannosyl *N*-phenyltrifluoroacetimide en enkele α - en β -2-deoxy-2-fluoro-glucosyl gesubstitueerde *N*-phenyltrifluoroacetimide derivaten konden geproduceerd worden in lage opbrengst. Alle 2-deoxy-2-fluoro-

galactose geconfigureerde imidaten bleken te instabiel waardoor er geen product geïsoleerd is.

Tot slot wordt in **Hoofdstuk 7** een samenvatting gegeven van de voorgaande hoofdstukken en worden een aantal toekomstperspectieven behandeld, waaronder de introductie van een dithiol linker om afgifte van BODIPY-cyclophellitol te bevorderen en de conjugatie van het natuurlijke mannose *N*-glycaan oligomeer aan de cathepsine remmer DCG-04. Verder wordt het gebruik van mannose-6-fosfaten voorgesteld om opname van de SIINFEKLDEVA₅K te verhogen en worden er alternatieve synthese routes voorgesteld naar de productie van thioimidaat suikers als potentiële glucocerebrosidase remmers.