



Universiteit  
Leiden

The Netherlands

## Synthesis & biological applications of glycosylated iminosugars

Duivenvoorden, B.A.

### Citation

Duivenvoorden, B. A. (2011, December 15). *Synthesis & biological applications of glycosylated iminosugars*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/18246>

Version: Corrected Publisher's Version

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

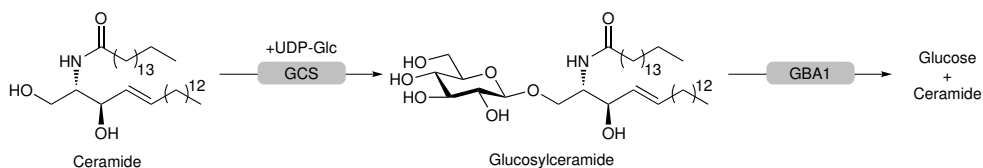
Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/18246>

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

# Samenvatting

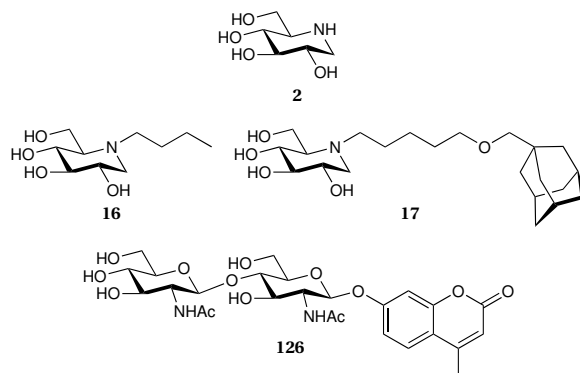
Iminosuikers zijn suiker (koolhydraat) derivaten waarin de ring-zuurstof is vervangen door een stikstof. Deze groep van gehydroxyleerde alkaloiden heeft interessante biologische eigenschappen. Ze blijken uitstekende remmers te zijn voor verscheidene glycosidases en glycotransferases. Iminosuikers zijn in grote verscheidenheid te vinden in bladeren, vruchten en de stam van de moerbeiplant (*Morus* spp.). Eén van de iminosuikers die uit deze plant kan worden geïsoleerd is 1-deoxynojirimycin (DNJ) **2**, waarvan door de jaren heen verschillende derivaten zijn gesynthetiseerd. Twee van deze derivaten, NB-DNJ **16** en AMP-DNJ **17** (Figuur 2), zijn uitstekende remmers voor het enzym glycosylceramide synthase (GCS). NB-DNJ wordt tegenwoordig gegeven aan patiënten met de ziekte van Gaucher, een lysosomale stapelingsziekte die wordt veroorzaakt door een verstoorde activiteit van het enzym glucocerebrosidase (GBA1) (Figuur 1). Hierdoor ontstaat een overschot aan glucosylceramide (GC) in de lysosomen, met als gevolg dat organen opzwellen (lever en nieren) en ontstekingen ontstaan. Door het remmen van GCS wordt er minder GC aangemaakt en zal de balans tussen anabolisme en katabolisme van GC worden hersteld.

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek behelst de synthese van NB-DNJ en AMP-DNJ prodrugs. Voorts zijn er verschillende nieuwe substraten voor het menselijke chitinase enzym chitotriosidase gesynthetiseerd waarbij ook rekening is gehouden met de ongewenste afbraak door andere enzymen.



**Figuur 1:** Anabolisme en katabolisme van glucosylceramide.

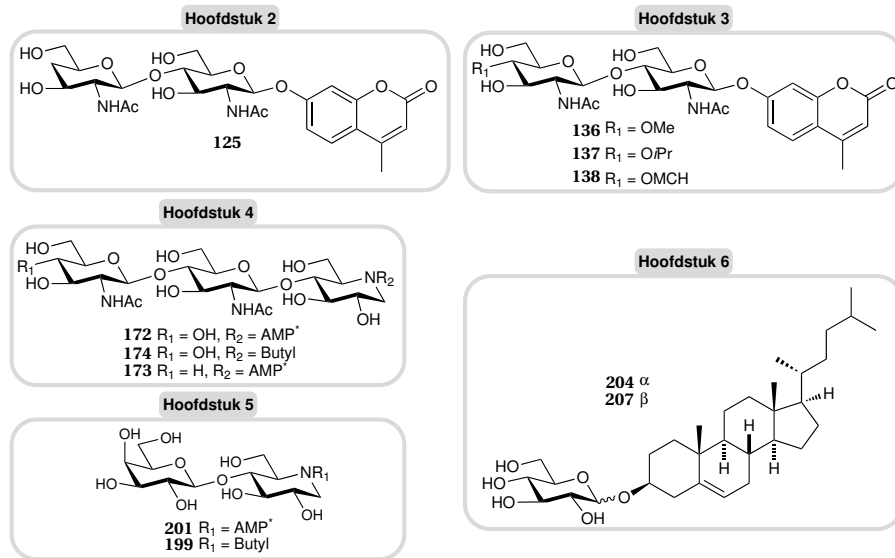
De inleiding van dit proefschrift (**Hoodstuk 1**) geeft een overzicht van alle in de literatuur beschreven *O*-geglycosyleerde iminosuikers. Er worden verschillende voorbeelden gegeven van chemische en enzymatische synthese strategieën waarbij iminosuikers van één of meerdere "gewone" suikers worden voorzien. Ook wordt een kort overzicht gegeven van geglycosyleerde iminosuikers die op een andere manier met elkaar zijn verbonden.



**Figuur 2:** Moleculen beschreven in de samenvatting.

Chitine is de op een na meest voorkomende bio-polymeer en kan worden gevonden in het exoskelet van geleedpotigen, zoals insecten, kreeftachtigen en spinnen, waar het zorgt voor stevigheid. Tot het einde van de vorige eeuw werd er gedacht dat het menselijk lichaam niet in staat was om chitine of derivaten daarvan af te breken. De eerste menselijke chitinase werd bij toeval gevonden tijdens onderzoek naar een verhoogde glycosidase-activiteit in het serum van Gaucherpatiënten. Dit enzym werd geïdentificeerd als chitotriosidase (CHIT1) en wordt tegenwoordig gebruikt als indicator om de ernst van de ziekte en de werking van de medicatie van Gaucher patiënten te visualiseren. Lange tijd werd umbelliferyl chitobiose **126** (Figuur 2) gebruikt als fluorescent substraat, maar dit substraat bleek bij verhoogde concentraties een onjuist beeld te geven. De oorzaak hiervan bleek de transglycosylase activiteit van CHIT1 te zijn, waarbij chitotriose of chitobiose aan het substraat wordt gekoppeld. Door de alcoholfunctie op de 4-plaats van het niet-reducerende suiker te verwijderen, kon transglycosylering worden voorkomen. Het verbeterde 4'-deoxychitobyosyl umbelliferone **125** bleek een beter substraat voor CHIT1. Eerder beschreven syntheseroutes leidden echter slechts tot milligrammen van dit substraat (**125**, Figuur 3). **Hoofdstuk 2** behelst een verbeterde en op te schalen synthese route naar het fluorescente substraat **125**. De route is gebaseerd op het gebruik van een centrale bouwsteen die kan worden gebruikt voor de synthese van zowel de donor als de acceptor. De cruciale koppeling tussen het chitobiose deel en de fluorofoor vindt plaats onder geoptimaliseerde “phase transfer conditions”.

Daarna wordt in **Hoofdstuk 3** het ontwerp, de synthese en de biologische evaluatie van drie nieuwe CHIT1 substraten beschreven (**136**, **137** en **138**, Figuur 3). Deze chitobiosederivaten zijn voorzien van een fluorofoor op het anomere centrum en hebben een verschillende etherfunctie op de 4-positie van de niet-reducerende suiker. Deze modificaties omvatten de relatief kleine methylgroep (OMe), de grotere isopropyl (O*i*Pr) en de meeste ruimte innemende methylcyclohexaan-groep (OMCH).



**Figuur 3:** Een overzicht van de stoffen beschreven in dit proefschrift.

\* AMP = N-5-(adamantan-1-yl-methoxy)-pentyol.

Voor de synthese van substraten **136**, **137** en **138** werd gebruik gemaakt van een 1,6-anhydro glucosamine derivaat, dat dienst deed als uitgangsstof voor de synthese van zowel de donoren als de acceptoren. Uit biologische testen bleek dat alle nieuwe substraten de Michaelis-Menten kinetiek volgen, maar ook dat de nieuwe substraten stabiel zijn voor de ongewenste stapsgewijze degradatie door  $\beta$ -hexosaminidase.

De lokaal verhoogde activiteit van CHIT1 en de directe correlatie met de ernst van de ziekte van Gaucher, biedt de mogelijkheid voor het lokaal activeren van medicatie door gebruik te maken van een zo genoemde “prodrug”. **Hoofdstuk 4** behandelt het ontwerp en de synthese van mogelijke prodrugs voor de ziekte van Gaucher, waarbij chitobiose of 4'-deoxychitobiose wordt gebruikt als enzym substraat en NB-DNJ (**16**) of AMP-DNJ (**17**) als medicatie. Door deze moleculen *via* een glycosidische binding aan elkaar te koppelen ontstaan er inactieve prodrugs (**172**, **174** en **173**, Figuur 3). De actieve verbinding **16** of **17** komt vrij wanneer het enzym, CHIT1, het chitobiose deel er weer afknijpt. Hierdoor is de medicatie alleen lokaal actief waardoor de kans op mogelijke bijwerkingen wordt verminderd.

Het is bekend dat sommige iminosuikers een bittere smaak hebben. De afkeer van de mens tegen stoffen met een bittere smaak is een oerinstinct dat ons waarschuwt voor potentieel gevaarlijke stoffen. Met als doel de bittere smaak van NB-DNJ en AMP-DNJ te maskeren wordt in **Hoofdstuk 5** de synthese van twee verschillende prodrugs (**201** en **199**) uiteengezet, waarbij galactose is gekoppeld aan een iminosuiker (Figuur 3). De aldus verkregen prodrugs zijn lactose derivaten die bekend staan om hun mild zoete smaak. Door lactose te gebruiken als uit-

gangsstof kon een glycosyleringsstap worden vermeden. Uit de biologische resultaten bleek dat de AMP-DNJ prodrug (**201**) kan worden geknipt door het enzym lactase-phlorizin hydrolase (LPH), dat wordt gevonden in het darmslijm van ratten.

Uit onderzoek om een eenduidige oorzaak voor de ziekte van Parkinson en het metabolisme van glycosylceramide te vinden, is gebleken dat patiënten met de ziekte van Parkinson een hoge dosis geglucoosyleerd cholesterol hebben. Recent onderzoek toont aan dat tijdens de biosynthese van deze geglucoosyleerde cholesterol niet de verwachte UDP-glucose als glucosedonor wordt gebruikt, maar glycosylceramide. Met de synthese van  $\alpha$  (**204**) en  $\beta$  geglucoosyleerde cholesterol (**207**) in **Hoofdstuk 6** is een interne standaard verkregen, die een bijdrage te levert aan verder onderzoek.

