



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Exploring chemical space in covalent and competitive glycosidase inhibitor design

Chen, Y.

### Citation

Chen, Y. (2022, October 13). *Exploring chemical space in covalent and competitive glycosidase inhibitor design*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3480333>

Version: 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/1887/3480333>

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

## Summary in Chinese

### 中文总结

本论文对包含淀粉降解酶和溶酶体葡萄糖神经酰胺酶 (GBA) 在内的保留型内切/外切糖苷酶共价抑制剂和活性分子探针 (ABPs) 的设计, 合成与生物评价进行了描述, 同时还介绍了一系列糖醛酸型 1-*N*-亚氨基糖的合成并对其作为潜在的竞争性乙酰肝素酶抑制剂进行了研究。这些共价和竞争性糖苷酶抑制剂的设计依赖于对相应酶功能和作用机制的理解。**第一章**简要介绍了保留型/反转型糖苷酶催化水解相应底物所采用的分子机制, 同时描述了保留型  $\alpha$ -和  $\beta$ -葡萄糖苷酶的反应路径, 并探讨了基于这些路径的六元环多醇类共价抑制剂的设计。此外, 本章节还介绍了基于底物过渡态模拟的竞争性抑制剂的设计并对活性蛋白表达谱 (ABPP) 的作用流程进行了概述。

淀粉的生物降解需要一系列酶的协同作用, 其中, 催化糖链内部  $\alpha$ -1,4-糖苷键水解的保留型  $\alpha$ -淀粉酶在生物医学和生物工程中都得到了最广泛的研究。**第二章**介绍了麦芽二糖构型的六元环多醇类  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂和 ABPs 的合成。该合成的关键步骤在于使用对酸耐受的环己烯或差像六元环多醇环碳酸酯作为受体, 在适当的预活化条件下实现立体选择性的  $\alpha$ -1,4-糖苷化, 随后通过一系列化学转化获得所需的环氧, 氮丙啶和环状硫酸酯官能团。随后, 本章通过大量的生物化学实验对所合成抑制剂和 ABPs 的活性和有效性进行了研究。与环氧类 ABP 相比, 氮丙啶类 ABP 在对重组人类唾液  $\alpha$ -淀粉酶的标记中表现出较低的活性。这一结果与对米曲霉淀粉酶 (Taka-amylase) 的动力学研究中氮丙啶类抑制剂表现出最慢的抑制速率结果一致—而构象限制为可能的原因。进一步研究结果显示, 环氧类 ABP 能够以浓度、温度、时间和 pH 依赖型的方式有效地标记人类唾液、小鼠组织和真菌分泌组中的  $\alpha$ -淀粉酶, 并且这一标记可以被同源的共价抑制剂以及市售的竞争性抑制剂阿卡波糖所抑制。此外, 本章还利用生物素化环氧 ABP 对人类唾液和真菌分泌组中的  $\alpha$ -淀粉酶进行了蛋白质组学分析。

淀粉多糖由直链淀粉和支链淀粉组成, 其中后者是常规淀粉的主要组成成分。支链淀粉中  $\alpha$ -1,6-糖苷键分支点附近的  $\alpha$ -1,4-糖苷键对特异性的  $\alpha$ -1,4-淀粉酶的水解具有抗性。因此, 在第二章所研究的麦芽二糖构型六元环多醇环氧化物 ABPs 的基础上, **第三章**进一步描述了一系列葡萄糖-异麦芽糖 (GIM) 和异麦芽糖-葡萄糖 (IMG) 构型的六元环多醇环氧化物 ABPs 的合成。其中, 假三糖骨架的构建是通过在适当的预活化条件下对环己烯受体进行立体选择性的  $\alpha$ -1,4-和  $\alpha$ -1,6-糖苷化来实现的。随后, 通过立体选择性环氧化, 苄基脱保护以及与相应的标记基团进行酰胺偶联, 最后经过 HPLC 纯化即可获得最终探针。未来的研究将对这类新合成的 ABPs 在复杂生物样品中对淀粉降解酶的标记模式和效率进行探索并将所获得的数据与之前报道的麦芽二糖构型的 ABPs 数据进行比较。通过模拟支链淀粉的分支结构, 这些 IMG 和 GIM 构型的 ABPs 有望对偏

支链底物的淀粉降解酶展现出特异性,进而将可用于与工业相关的降解支链淀粉型多糖的淀粉降解酶的检测与发现。

**第四章**描述了一系列 $\beta$ -D-葡萄糖构型的六元环多醇氮丙啶抑制剂和 ABPs 的合成,其特点是在它们的 C6 位和氮丙啶氮上都进行了官能团化。X 射线晶体衍射结果显示重组人类 GBA (rhGBA) 能够在结构上有效地容纳这两个官能团。随后,本章节通过一系列体外和原位实验研究了这些双功能氮丙啶对 GBA 的选择性和有效性。 $IC_{50}$  测试结果表明,这类新的双功能六元环多醇氮丙啶抑制剂对 rhGBA 的抑制效力比先前所报道的 C6-单官能团化六元环多醇环氧化物的效力低约 10-15 倍。此外,这类双功能探针虽然能够在体外对小鼠大脑裂解物中的 GBA 进行选择标记,而在对含有内源性 GBA 和过表达非溶酶体葡萄糖神经酰胺酶 (GBA2) 的 HEK293T 细胞的原位标记中,其 GBA 选择性则有所下降。虽然双功能氮丙啶的选择性和有效性均低于相应的单功能环氧化物,但它们仍然是极具效力的 GBA 失活剂,可用于与高雪氏病 (Gaucher disease) 相关的 GBA 代谢研究。

Siastatin B 是一种从链霉菌培养物中分离而来的天然产物,此前已有报道它是一种有效的 $\beta$ -D-葡萄糖醛酸酶抑制剂。然而,siastatin B 的分子结构对于经典的保留型糖苷酶活性位点来说似乎过于巨大。Nishimura 课题组通过对含有三氟乙酰胺基的 siastatin B 衍生物进行 NMR 分析,发现这类三氟乙酰衍生物在溶剂中可迅速发生分解,从而释放出一类半胺醛/水合酮化合物作为真正的糖醛酸酶抑制剂。然而,这一重排现象尚未在 siastatin B 中得到证实。**第五章**通过对 siastatin B 和一系列糖醛酸酶,包括人类乙酰肝素酶 (HPSE)、荚膜菌 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶 (AcGH79)、假单胞菌乙酰肝素酶 (BpHEP) 和大肠杆菌 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶 (EcGusB) 的共结晶和 X 射线晶体衍射研究,证实了与这些酶活性位点进行共价结合的不是 siastatin B,而是其半胺醛或水合酮降解物。为了了解这类降解产物的作用模式,本章节合成了一系列半乳糖醛酸和葡萄糖醛酸构型的 1-N-亚胺糖衍生物。随后,对合成的葡萄糖醛酸构型亚胺糖与酶相互作用的初步结构研究表明,这些合成亚胺糖可能是潜在的 HPSE 和 $\beta$ -D-葡萄糖醛酸酶抑制剂。在未来的研究中,可通过动力学和竞争性 ABPP 实验对这些化合物的抑制特性进行深入评估。

**第六章**对本论文的研究成果进行了归纳和总结,并对未来的研究工作进行了展望。其中,描述了麦芽二糖构型的六元环多醇环状硫酸酯 ABPs 的合成,为 $\alpha$ -淀粉酶设计/合成了麦芽二糖构型的竞争性抑制剂和耐受外切酶水解的稳定性共价抑制剂,最后为半胺醛类亚胺糖和双羧基类亚胺糖的合成提供了思路。