Universiteit
Leiden
The Netherlands

# Structure-reactivity relationships in glycosylation chemistry

Hengst, J.M.A. van

**Citation**

Hengst, J. M. A. van. (2023, December 7). *Structure-reactivity relationships in glycosylation chemistry*. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/3665922

| | |
|---|---|
| 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/1887/3665922 |

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

## *Samenvatting in het Nederlands*

De synthese van koolhydraten, ook wel suikers genoemd, is moeilijker dan de synthese van andere biomoleculen zoals peptiden of oligonucleotiden. Wanneer twee suikers aan elkaar gekoppeld worden, wordt er een nieuw stereocentrum geïntroduceerd. Terwijl 1,2-*trans* glycosidische bindingen betrouwbaar gesynthetiseerd kunnen worden met behulp van sturing door een ester of amide groep op de naburige koolstof in de ring, is er voor de selectieve vorming van *1,2-cis* glycosidische bindingen nog geen universeel toepasbare techniek.

Bij een typische glycosyleringsreactie wordt een donor geactiveerd om zo een (verscheidenheid aan) elektrofiele intermedairen te vormen, die kunnen reageren met een nucleofiele acceptor volgens een reactiemechanisme met zowel $S_N1$- als $S_N2$-karakter. Aan de $S_N1$-kant van het spectrum nemen oxocarbeniumionen deel aan het mechanisme, terwijl covalente intermedairen fungeren als glycosylerend agens aan de $S_N2$-kant. De uitkomst van een glycosyleringsreactie wordt beïnvloed door de eigenschappen van zowel de donor als de acceptor, en kan ook worden beïnvloed door externe factoren.

Het doel van dit proefschrift is om systematisch te onderzoeken hoe veranderingen in stereochemie en beschermende groepen op de donor en acceptor het mechanisme en de uitkomst van glycosyleringsreacties beïnvloeden. Dit onderzoek zal een meer rationeel ontwerp van oligosaccharide syntheseroutes mogelijk maken.

**Hoofdstuk 1** introduceert de uitdagingen in de chemische synthese van koolhydraten en presenteert enkele oplossingen die gevonden zijn voor stereoselective glycosyleringsreacties. Het SN1/SN2-continuüm van de glycosyleringsreactiemechanisme wordt beschreven, evenals methoden om beide uiteinden van het spectrum te onderzoeken. Tenslotte wordt de rol van de reactiviteit van de acceptor in de uitkomst van de glycosyleringsreactie besproken.

In **Hoofdstuk 2** wordt de invloed van de configuratie van de donor op de stereochemische uitkomst van $S_N1$ reacties onderzocht door middel van een combinatie van computationele en experimentele chemie. Hiervoor zijn eerst alle acht diastereomere pyranosyl donoren, beschermd met enkel benzyl groepen gesynthetiseerd, tezamen met hun 6-deoxy analogen. Vervolgens werd de conformationele voorkeur van de oxocarbenium ionen – en daarmee de verwachte uitkomst van de $S_N1$ reacties – berekend door de generatie van *conformational energy landscape* (CEL) platen. Tenslotte werden de reacties van de donoren met twee

nucleofielen die reageren via een $S_N1$ mechanisme, namelijk TES-D en allyl-TMS, bestudeerd.
De stabiliteit van de conformeren die in de CEL-platen gevonden werd, kan verklaard worden door de "voorkeuren" van de substituenten om het oxocarbenium ion het meest te stabiliseren, danwel het minst te destabiliseren. Wanneer de C-3 of C-4 alkoxy groepen op een *pseudo*-axiale manier geplaatst zijn, dan is het oxocarbenium ion stabieler dan wanneer deze groepen *pseudo*-equatoriaal geplaatst zijn. Voor C-2 en C-5 heeft een *pseudo*-equatoriale oriëntatie de voorkeur. Wanneer alle vier de substituenten in de voorkeursoriëntaties kunnen worden geplaatst, zoals het geval is voor gulose/6-deoxygulose, heeft het ion een sterke voorkeur voor een enkele goed gedefiniëerde conformatie ($^4H_3$ half-stoel). Met drie van de vier substituenten optimaal georiënteerd, vertonen de ionen ook een sterke voorkeur voor die conformatie. Wanneer slechts twee substituenten in de voorkeursoriëntatie kunnen worden geplaatst, zijn de energieverschillen tussen de verschillende conformeren een stuk kleiner en kan het oxocarbenium ion meerdere conformaties aannemen. Een andere observatie is dat de voorkeuren voor 6-deoxy oxocarbeniumionen in de meeste gevallen sterk lijken op die van hun 6-O-benzyl-evenkniën, alhoewel de absolute energieverschillen verschillen. Dit blijkt ook uit de uitkomst van de glycosyleringsreacties.
In de reacties met TES-D, is de oriëntatie van de substituent van C-2 in de donor moleculen de belangrijkste factor voor de stereochemische uitkomst van de glycosyleringsreactie gebleken. Alle reacties waren zeer *1,2-cis* selectief. Dit is in overeenstemming met de voorspelde waarden van de CEL-platen, behalve voor talose en 6-deoxyglucose, waar een 1:1 mengsel wordt voorspeld en voor idose, waar α-selectiviteit werd voorspeld, maar volledige β-selectiviteit werd waargenomen.
Reacties met allyl-TMS gaven andere resultaten. Wanneer de C-2-groep van de donorglycosiden equatoriaal is, verloopt de reactie met volledige α-selectiviteit zoals bij TES-D. Wanneer de C-2-groep echter axiaal is geplaatst, verschuift selectiviteit van de reactie om meer van het 1,2-*trans* product te geven. Een mogelijke verklaring voor deze observatie zijn de sterische interacties tussen de substituenten en het inkomende nucleofiel, die aanval op de *cis*-zijde ongunstig maken. Volgens een Curtin-Hammett kinetisch scenario kan dan een aanval plaatsvinden op een oxocarbenium ion conformeer met hogere energie omdat dit een overgangstoestand met lagere energie oplevert.

In **Hoofdstuk 3** staan de mechanismes die verlopen via een covalent tussenproduct centraal. Variabele temperatuur (VT) NMR is gebruikt om de reactieve deeltjes te karakteriseren, die gevormd worden door activatie van de donoren. De waargenomen deeltjes waren ofwel een mengsel van α-triflaat en α-oxosulfoniumtriflaat, een mengsel van α-triflaat en α,β-oxosulfoniumtriflaten of een mengsel van α,β-oxosulfoniumtriflaten. β-Triflaten werden bij geen van de donoren waargenomen.

Vervolgens werden de geactiveerde donoren gekoppeld met vijf alcohol acceptoren, die door een toenemend aantal fluor-atomen (EtOH: 0, MFE: 1, DFE: 2, TFE: 3 en HFIP: 6), steeds minder nucleofiel zijn, om de relatie tussen de nucleofiliciteit van de acceptor en het mechanisme van de reactie te onderzoeken. In de reacties met EtOH, MFE, DFE en TFE blijkt vooral de configuratie van C-3 belangrijk te zijn voor de relatie tussen de reactiviteit van de acceptor en de stereochemische uitkomst van de glycosylering. Wanneer de substituent op C-3 equatoriaal is, wordt een duidelijke trend waargenomen waarbij meer nucleofiele acceptoren een hogere β-selectiviteit geven en minder nucleofiele acceptoren een hogere α-selectiviteit. Wanneer de C-3-groepen axiaal zijn, worden α:β-mengsels verkregen zonder duidelijke relatie tussen nucleofiliciteit en stereoselectiviteit. Een mogelijke mechanistische verklaring voor deze waarnemingen is dat voor de donoren met een equatoriaal georiënteerde C-3-groep, de meest reactieve acceptoren reageren met de stabielere covalente α-deeltjes, wat de β-producten oplevert, terwijl minder reactieve acceptoren alleen kunnen reageren met de meer reactieve β-deeltjes, wat leidt tot het α-product. Wanneer de substituent op C-3 axiaal is, is het reactiviteitsverschil tussen de covalente α- en β-deeltjes kleiner vanwege destabiliserende 1,3-diaxiale interacties tussen het axiale α-triflaat- en de C-3-groep. De $S_N2$-substitutie van het β-deeltje wordt ook belemmerd door de groep op C-3. Deze sterische interacties werken elkaar tegen, wat leidt tot een algehele slechte selectiviteit.
De glycosyleringen met HFIP waren allemaal volledig α-selectief, ongeacht de stereochemie van C-2 of C-3. Dit staat in contrast met de uitkomst van gerelateerde reacties met TES-D, een nucleofiel dat veel gebruikt is om $S_N1$-reactieroutes te karakteriseren, waarin hoge *1,2-cis* selectiviteit wordt gezien. Dit suggereert dat de glycosyleringen met zwakke O-nucleofielen via een ander mechanisme plaatsvinden dan nucleofiele additie aan een oxocarbenium ion.

In **Hoofdstuk 4** wordt een systeem beschreven om de structuur-reactiviteits relaties van een set van 60 acceptoren te bepalen, dat gebaseerd is op het gebruik van twee conformationeel vastgelegde glycosyl donoren. De stereochemische uitkomst van de glycosyleringsreacties met deze twee donoren is sterk afhankelijk van de nucleofiliciteit van de acceptor, zoals bepaald door middel van glycosyleringen met de EtOH, MFE, DFE, TFE en HFIP-modelacceptoren. De meest nucleofiele acceptoren reageren met volledige β-selectiviteit, terwijl het verminderen van de nucleofiliciteit van de acceptor geleidelijk leidt tot volledige α-selectiviteit. Deze reactiviteit-stereoselectiviteit relatie werd gebruikt om de reactiviteit van een groot aantal suikeracceptoren te bepalen. Door systematisch het beschermengroep patroon op D-glucose-, D-mannose-, D-galactose-, L-rhamnose- en L-fucose-acceptoren te variëren en hun reactiviteit te "meten", was het mogelijk om te bepalen welke structurele kenmerken de reactiviteit van de acceptor bepalen. Er werden ook twee soorten modelacceptoren geïntroduceerd. De eerste soort bestaat uit suikerachtige acceptoren, gebaseerd op 1,2,6-trideoxyglucose en 1,2,6-

trideoxygalactose, die alleen de "essentiële" substituenten bevatten, met verschillende patronen van beschermgroepen. De tweede soort modelacceptoren zijn C-2-OH-glycerolacceptoren met een cyclische beschermende groep op C-1 en C-3. Deze acceptoren lijken op suikeracceptoren omdat het secundaire alcoholen zijn, die geflankeerd worden door twee beschermde hydroxyl groepen. In tegenstelling tot suikeracceptoren zijn deze alcoholen niet chiraal, dus de stereochemische uitkomst van de glycosyleringsreacties wordt niet beïnvloed door diastereomere interacties. De resultaten van de glycosyleringsreacties laten zien dat zowel de configuratie van de acceptor als het patroon van de beschermgroepen op de acceptor een sleutelrol spelen bij het bepalen van de reactiviteit van de acceptor. Met betrekking tot de configuratie van de acceptor zijn equatoriale alcoholen reactiever dan axiale alcoholen. De oriëntatie van de functionele groep naast de nucleofiele alcohol is ook belangrijk, en alcoholen met alleen equatoriale buren zijn reactiever dan alcoholen die zich naast een axiale buur bevinden. Met betrekking tot het patroon van beschermgroepen zijn benzoyl-beschermde acceptoren minder reactief dan hun benzyl-beschermde tegenhangers. De grootte van dit effect hangt af van welke benzylgroep wordt vervangen door een benzoylgroep, aangezien het effect veel groter is wanneer een equatoriale benzylgroep naast de alcohol wordt vervangen door een benzoylgroep dan wanneer hetzelfde wordt gedaan met een naburige axiale benzylgroep.

**Hoofdstuk 5** bouwt voort op hoofdstuk 4, door gebruik te maken van dezelfde methodologie die werd toegepast op benzyl/benzoyl-beschermde acceptoren om de invloed van de meest gebruikte *N*-beschermengroepen (azide, trichlooracetamide (TCA) en trifluoracetamide (TFA)) op de reactiviteit van acceptor te bepalen. De acceptoren die in deze studie werden gebruikt, waren C-4-OH glucosamine-acceptoren, aangezien de C-4-OH *N*-acetylglucosamine-acceptoren berucht zijn vanwege hun slechte nucleofiliciteit en C-3-OH glucosamine-acceptoren, om het effect van verschillende beschermgroepen naast de nucleofiele alcohol te onderzoeken. De C-4-OH en C-3-OH mannosamine-acceptoren werden toegevoegd om de invloed van de configuratie van het beschermde amine op de reactiviteit van de acceptor te bepalen. Net als bij de benzyl/benzoyl-beschermde acceptoren, zijn zowel de configuratie als de aard van de beschermende groepen belangrijk voor de reactiviteit van de acceptor. Voor zowel de glucosamine C-4-OH als de mannosamine acceptoren heeft de aard van de *N*-beschermende groep weinig invloed op de reactiviteit van de acceptoren, aangezien alle glycosyleringen binnen dezelfde acceptorreeks verliepen met vergelijkbare stereoselectiviteit en hoge opbrengst. Bij de glucosamine en mannosamine C-3-OH acceptoren werden vergelijkbare trends waargenomen als bij de acceptorreeks in hoofdstuk 4. De eerste observatie is dat een azide een deactiverend effect heeft dat vergelijkbaar is met dat van een O-benzoylgroep en dat gehalogeneerde acetamides een groter deactiverend effect hebben dan de azides, waarbij de trifluoracetamides meer

deactiverend zijn dan de trichlooracetamides. De configuratie van het beschermde amine naast de alcohol bleek ook belangrijk te zijn voor de reactiviteit van de acceptor. Zoals waargenomen voor de alcohol beschermde acceptoren, is de C-3-OH-glucosazide-acceptor reactiever dan de C-3-OH-mannosazide-acceptor. In lijn met de resultaten van hoofdstuk 4, is het deactiverende effect van de *N*-beschermgroepen op equatoriale amines naast de nucleofiele alcohol veel groter dan het deactiverende effect van de *N*-beschermgroepen van de naburige axiale amines.

In **Hoofdstuk 6** wordt de kennis die in de hoofdstukken 2-5 is opgedaan toegepast op de synthese van de repeterende eenheid van een *Acinetobacter Baumannii* capsulair polysaccharide . *A. Baumannii* is een Gram-negatieve bacterie die door de Wereldgezondheidsorganisatie is aangemerkt als een pathogeen met een hoog risico vanwege de hoge mate van antibioticaresistentie. Het polysacharide bestaat uit repeterende eenheden van vier suikers met de structuur [→4)-β-D-GlcpNAc3NAcA-(1→3)-α-D-QuipNAc4NAc-(1→3)-α-D-QuipNAc4NAc-(1→4)-β-D-GlcpNAc3NAcA-(1→] met de twee zeldzame suikers 2,4-di-*N*-acetyl-α-D-quinovose (2,4-di-*N*-acetyl bacillosamine, QuiNAc4NAc) en 2,3-di-*N*-acetyl-β-D-glucuronzuur (GlcNAc3NAcA). Wat de structuur van deze polysacharide bijzonder maakt, is dat deze geen enkele vrije alcohol groep bezit!
Uitgaande van D-fucose en D-glucosamine-HCl werden synthetische routes ontwikkeld om meerdere grammen van de vereiste bacillosamine en 2,3-diaminoglucuronzuur bouwstenen te produceren. De reactiviteit van de bacillosaminedonoren werd vervolgens bestudeerd om methoden te ontwikkelen voor de constructie van de *1,2-cis* bindingen. Modelglycosyleringen met gefluoreerde ethanolacceptoren toonden aan dat de stereoselectiviteit van de bestudeerde selenofenol bacillosamine donor onder pre-activeringscondities sterk afhangt van de nucleofiliteit van de acceptor, waarbij ethanol zorgt volledige β-selectiviteit laat zien en 2,2,2-trifluorethanol bijna alleen maar α-product levert. De aziden en methylesters op de koolhydraatacceptoren zouden een deactiverend effect moeten hebben op de nucleofiliciteit van het vrije alcohol moeten hebben, op basis van de eerdere studies. Inderdaad, verloopt de glycosylering met zowel de 2,3-di-*N*-acetylglucuronzuuracceptoren als de bacillosamine-acceptoren met hoge α-selectiviteit.
Om het onderliggende mechanisme van deze selectiviteit te onderzoeken werd VT-NMR gebruikt om de reactieve intermediairen gevormd uit de bacillosaminedonoren te bestuderen. Wanneer de selenofenoldonor werd geactiveerd met $Ph_2SO$ en $Tf_2O$, werd een mengsel van het α-triflaat, α-oxosulfoniumtriflaat en β-oxosulfoniumtriflaat gevormd. Het β-oxosulfoniumtriflaat bleek het meest reactief te zijn, op basis van de laagste ontledingstemperatuur. De activering van de overeenkomstige PTFAI-donor met TfOH leidde tot de selectieve vorming van het α-triflaat. Op basis van de glycosyleringen van de selenofenoldonor en imidaatdonor met de 2,3-di-*N*-

acetylglucuronzuuracceptoren wordt verwacht dat de oxosulfoniumtriflaten een rol spelen bij het bepalen van de selectiviteit van de selenofenoldonor. Met deze kennis in de hand kon het tetrasaccharide worden samengesteld. Uiteindelijk werd 855 mg (670 μmol) van een beschermd tetrasaccharide-bouwsteen verkregen, welke ontschermd kan worden of kan worden gebruikt voor de synthese van grotere oligomeren.