



Universiteit  
Leiden

The Netherlands

## **Design and synthesis of next generation carbohydrate-mimetic cyclitols: towards deactivators of inverting glycosidases and glycosyl transferases**

Ofman, T.P.

### **Citation**

Ofman, T. P. (2024, March 28). *Design and synthesis of next generation carbohydrate-mimetic cyclitols: towards deactivators of inverting glycosidases and glycosyl transferases*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3729796>

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/1887/3729796>

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

## Nederlandse samenvatting

Cyclophellitol en zijn vele analoga zijn veel gebruikte remmers van retentie-glycosidasen (GH's) en vertonen vaak uitstekende potenties en selectiviteit binnen deze enzym familie. In de loop der jaren heeft een beter begrip van hun werkingsmechanisme geleid tot het ontwerp van analogen die zijn afgestemd op specifieke glycosidasen en voor specifieke doeleinden. Op die manier zijn er onder meer remmers en probes ontwikkeld voor specifieke endo- of exo-glycosidasen, maar ook reagentia om juist een breder scala aan glycosidasen te bestuderen zijn succesvol geconstrueerd en toegepast. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift richt zich op nieuwe ontwerpen en de ontwikkeling van synthetische methodologie om het palet aan remmers en probes van glycaan verwerkende enzymen uit te breiden. Zo worden er mogelijke irreversibele remmers beschreven van inverterende glycosidasen, een enzymfamilie zo groot en divers als retentie-enzymen maar waarvoor tot op heden geen covalente remmers bestaan. Daarnaast wordt het ontwerp en de synthese van een nieuwe klasse van glycosyltransferase (GT) donoranalogen gepresenteerd, die als potentiële remmers worden beschouwd. Al met al borduurt het gepresenteerde werk voort op de groeiende lijst van remmers en probes van retentie GH's, zet het de eerste stappen richting de complementaire inverterende GH's, en rapporteert het over het ontwerp van een nieuwe klasse van potentiële, conformatie gedreven GT-remmers.

**Hoofdstuk 2** beschrijft een nieuwe syntheseroute naar een orthogonaal beschermd cyclophellitol bouwsteen uitgaande van commercieel verkrijgbaar tri-*O*-acetyl-D-glucal. De sleuteltransformatie van de synthese beruist op een Claisen-omlegging, waarmee D-glucal effectief kan worden omgezet in carba-D-glucal. De daaropvolgende verplaatsing van de 1,2-alken naar de 1,7-positie levert de orthogonaal beschermd cyclophellitol bouwsteen op met een rendement van 19% over 12 stappen. Vanwege de volledige orthogonaliteit van alle vier de hydroxyl beschermgroepen, zijn regio selectieve manipulaties mogelijk. De brede inzetbaarheid van de bouwsteen is vervolgens aangetoond in de synthese van een kleine reeks aan  $\alpha$ -(1,3)-gekoppelde di- en trisacharide-nigerose- en dextraan-mimetica. Cruciaal in de synthese van de mimetica is het inspelen op het naburige groepsparticipatiepotentieel van het allylische, secundaire alcohol, wederom beschikbaar dankzij regioselectieve ontscherming. De stereoselectieve introductie van zowel epoxide- als aziridine functionaliteiten werd vervolgens mogelijk.

**Hoofdstuk 3** behelst een studie naar de conformationele en elektronische effecten van 1,2- en 1,7-cyclophellitolen op hun inhibitie potentie van menselijke  $\alpha$ -glucosidasen. Hiertoe zijn een reeks van twintig configuratieve en functionele cyclophellitol-analogen, met een systematische reeks van elektrofielen, gesynthetiseerd en bestudeerd in *in vitro*

experimenten op hun remmende potenties van menselijke zure  $\alpha$ -glucosidase (GAA) en ER  $\alpha$ -glucosidase II (ER-II). Hoewel er in vergelijking met bestaande remmers geen potentere remmers werden gevonden, werden voor sommige verbindingen laag-micromolaire affiniteiten waargenomen. Vervolgens zijn de conformationele vrije energielandschappen van de meest actieve verbindingen in kaart gebracht. Er werd een systematische  $60^\circ$  verschuiving in de laagste energieconformatie van het 1,2-cyclophellitool waargenomen in vergelijking met hun 1,7-tegenhangers. Als gevolg van deze verschuiving lijkt de laagste energieconformatie niet op die van het Michaelis-complex of die van transitietoestand tijdens hydrolyse. Deze cruciale conformatie verandering kan de algemene vermindering in waargenomen remmende potenties van de 1,2-cyclophellitolen ten opzichte van hun 1,7-tegenhangers verklaren.

**Hoofdstuk 4** beschrijft de synthese van acht cyclitol verbindingen uitgerust met buiten de ring verkerende aziridines. De cyclitol verbindingen zijn potentieel selectieve remmers van inverterende  $\alpha$ - en  $\beta$ -glucosidasen - een enzym groep waarvoor tot op heden geen, op mechanisme gebaseerde, covalente remmers bestaan. De hypothese is dat door het buiten de ring plaatsen van de elektrofile positie, een covalente binding aan kan worden gegaan met het ver weg gelegen nucleofiel, kenmerkend voor inverterende glycosidasen. De sleutelstap in de synthese was een divergente aza-Michael-geïnitieerde ringsluiting reactie (aza-MIRC) tussen onbeschermd validamine of 1-*epi*-validamine en een kleine serie van dibromo verbindingen bestaande uit een diverse selectie van elektronen zuigende functionaliteiten. Op deze manier werden alle acht beoogde remmers verkregen in uitstekende rendementen, wat de mildheid en robuustheid van deze aziridine-vormende reacties op complexe, onbeschermd substraten aantoont.

Als uitbreiding op de in hoofdstuk 4 beschreven zoektocht naar covalente remmers van inverterende  $\alpha$ - en  $\beta$ -glucosidasen, beslaat **Hoofdstuk 5** de synthese van een kleine reeks verbindingen met een anomere vinylgroep in combinatie met verschillende elektrofielen over de 1,2-positie. De hypothese is dat het terminale deel van de alkeen via een 1,4-Michael-additie, wederom een irreversibele additie reactie zou kunnen aangaan met het verafgelegen nucleofiel. De verbindingen zijn op divergente wijze gesynthetiseerd vanuit carbagluucose-derivaten die zijn gesynthetiseerd zoals beschreven in hoofdstuk 3. Vanwege de intrinsieke instabiliteit en reactiviteit van de voorgestelde elektrofielen, en de daaruit voortvloeiende synthetische uitdagingen tijdens de globale ontscherming, bleek het gebruik van silyl-beschermgroepen gecombineerd met een fluoride ontschermingsstap cruciaal.

**Hoofdstuk 6** beschrijft het ontwerp en de synthese van een reeks complexe, conformationele donor-mimetica van glucosyl- en galactosyl transferasen. Het ontwerp

van deze complexe structuren is gebaseerd op kristallografische data. Hieruit blijkt dat de donorsubstraten (UDP-glucose of UDP-galactose, respectievelijk) een sterk gebogen oriëntatie aannemen bij het vormen van een Michaelis-complex met sommige glucosyl- of galactosyl transferasen. Sleutel tot het ontwerp is de conformationele beperking veroorzaakt door de aanwezigheid van een cyclische carbamaat- of -sulfamidaat groep, die de C1- en C2-positie overbrugt. Bovendien is het amide verder gefunctionaliseerd met een uridine 5'-monofosfaatgroep. Een van de sleutel transformaties was een Sharpless aminohydroxylering, die volledig stereoselectief bleek te zijn op zowel carba-D-glucal als carba-D-galactal en bijna equimolaire hoeveelheden van beide regio-isomeren opleverde met een uitstekend rendement. Op een divergente en parallelle wijze werden de regio-isomeren omgezet in zowel de cyclische carbamaten als sulfamidaten. In de volgende stap maakte een Atherton-Todd *N*-fosforylering een robuuste en efficiënte condensatie mogelijk van het cyclische carbamaat of sulfamidaat met een beschermd H-fosfonaat. Uiteindelijk, en met behulp van een milde en efficiënte één-pot-tweestaps ontschermings methode, konden alle acht complexe doelstructuren succesvol gesynthetiseerd en geïsoleerd worden.

Om verder in te gaan op de 1,2-carbamaat- en sulfamidaat donormimetica uit hoofdstuk 6, beschrijft **Hoofdstuk 7** de synthetische studie naar de overeenkomstige isomeren waarin de cyclisch carbamaat en sulfamidaat de 1,7-positie overbruggen. Er werd verondersteld dat door het verplaatsen van de bicyclische structuur, een grotere chemische ruimte onderzocht kan worden. In tegenstelling tot wat werd waargenomen in hoofdstuk 6, bleek de Sharpless-aminohydroxylering niet te gaan wanneer uitgevoerd op cyclophellitol-cyclohexenen. Een relatief lange synthese route was nodig om tot de cyclische carbamaten te komen. Het gebruik van een TIPDS-bescherm groep op de 4- en 6-positie van de carbagluucose-analogen bleek essentieel voor de daaropvolgende Atherton-Todd-reactie en de globale ontschermingsstap, wat resulteerde in de isolatie van het eerste doelmolecuul. Parallel hieraan werden volgens de eerder genoemde procedures beide regio-isomeren van de carbagalactose carbamaten gesynthetiseerd. Een Atherton-Todd-fosforylering van het eerste cyclische carbamaat en daaropvolgende globale ontscherming leverde de eerste doelmolecuul van carbagalactose op. Het bleek niet mogelijk om, middels de Atherton-Todd methode fosforylering van het tweede carbamaat, alsook het cyclosulfamidaat, te bewerkstelligen. Om die reden zijn nieuwe synthetische routes nodig in de synthese van de overgebleven cyclische carbamaat- en cyclische sulfamidaat constructen.

Ten slotte beslaat **Hoofdstuk 8** een samenvatting van de verkregen resultaten met enkele suggesties voor vervolgonderzoek.