



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Design, synthesis and application of sulfur-containing heterocycles for the inhibition of glycosidases and glycosyltransferases

Kok, K.

Citation

Kok, K. (2024, October 2). *Design, synthesis and application of sulfur-containing heterocycles for the inhibition of glycosidases and glycosyltransferases*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4093669>

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/1887/4093669>

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

Nederlandse samenvatting

Dit proefschrift beschrijft nieuwe ontwerpprincipes en synthetische strategieën gericht op de ontwikkeling van nieuwe verbindingen die zich richten op een breed scala aan glycosidase- en glycosyltransferase-enzymen. **Hoofdstuk 1** geeft een overzicht van de algemene reactiemechanismen van hydrolyse en glycosylering die door deze enzymfamilies worden uitgevoerd, en benadrukt hun betrokkenheid bij diverse fysiologische routes en ziekteprocessen, in het bijzonder bij lysosomale stapelingsziektes (LSD's). Speciale aandacht wordt besteed aan de ziekte van Fabry en Pompe, twee LSD's die als centrale thema's dienen voor de verbindingen die in de daaropvolgende hoofdstukken 2, 4, 5 en 6 worden beschreven. Tot voor kort was de enige beschikbare behandeling voor Pompe-patiënten enzymvervangingstherapie (ERT) met recombinant menselijk GAA (rhGAA). Helaas is het recombinante enzym dat voor ERT wordt gebruikt instabiel in plasma en dringt het slecht door in de skeletspieren, waardoor het een beperkt effect op het door de ziekte aangetaste weefsel heeft. Een goedgekeurde strategie waarvan is aangetoond dat deze de werkzaamheid van ERT vergroot, is de combinatie met farmacologische chaperontherapie (PCT), waardoor het recombinante enzym wordt gestabiliseerd door bezetting van het katalytische centrum met een ligand. Tijdens het onderzoek dat in **hoofdstuk 2** is uitgevoerd waren er klinische onderzoeken gaande naar de combinatie van de farmacologische GAA-chaperonne N-butyldeoxynojirimycin (NB-DNJ, Miglustat) en rhGAA. **Hoofdstuk 2** beschrijft de synthese en biologische evaluatie van cyclitol moleculen uitgerust met een cyclisch sulfamidaat waarbij de elektrofiliciteit van de cyclische sulfaatgroep wordt verlaagd. De introductie van een endocyclisch stikstofatoom op de C-1-positie van het cyclitol skelet resulteerde in een competitief ligand. Vergelijking van dit cyclisch sulfamidaat met NB-DNJ toonde vergelijkbare remmende activiteit aan waarbij het cyclosulfamidaat verbeterde selectiviteit vertoonde voor α -glucosidases en hogere stabilisatie van ERT (rhGAA, Myozyme) in plasma, in cellen en in zebravis embryo's, waardoor het transport van enzymen naar het lysosoom werd bevorderd. Enzym stabilisering die *in vivo* is aangetoond in zebravis embryo's levert verder bewijs van de potentiële werkzaamheid van het ontwikkelde cyclisch sulfamidaat als farmacologische chaperonne, die consistent beter presteerde dan de benchmarkverbinding in alle stabilisatie-experimenten. Dit is vooral belangrijk gezien het feit dat Miglustat in 2023 officieel werd goedgekeurd als onderdeel van een ERT-PCT-combinatietherapie onder de naam Opfolda voor de behandeling van de ziekte van Pompe.

Hoofdstuk 3 exploiteert 1,6-epi-cyclophellitolsulfamidaten als glycosidase remmers voor GH47 inverterende α -mannosidases. De zeven menselijke α -mannosidase isovormen uit de GH47-familie spelen een belangrijke rol bij de maturatie van *N*-glycanen en bij het labelen van verkeerd gevouwen eiwitten voor afbraak. Deze nauw verwante mannosidases worden in hun katalytische centrum ondersteund door Ca^{2+} en vertonen een ongebruikelijke katalytische route waarbij de substraat conformatie overgaat van $^3\text{S}_1$ (Michaelis-complex) naar $^3\text{H}_4$ (overgangstoestand) en eindigt in de $^1\text{C}_4$ -productconformatie. De uitdaging die in dit hoofdstuk wordt aangegaan, is het bereiken van selectieve remming van leden van een nauw verwante enzymfamilie, met vrijwel identieke katalytische centra. Dit gebrek aan selectiviteit belemmert de inspanningen om hun individuele biologische functie te bestuderen. Kifunensine is een nanomolair actieve remmer van de GH47-mannosidase familie dankzij het nabootsen van de $^1\text{C}_4$ -conformatie en mannoseconfiguratie. Kifunensine mist echter het vermogen om één enkel lid van de GH47-familie selectief te remmen. **Hoofdstuk 3** was bedoeld om te onderzoeken of cyclische sulfaten en sulfamidaten vergelijkbare mogelijkheden zouden kunnen bieden. Zoals beschreven in hoofdstuk 2, zijn α -glucose cis-cyclosulfaten en sulfamidaten verankerd in een $^4\text{C}_1$ -stoelconformatie die het Michaelis-complex van het glucose substraat van hun α -glycosidase doelwit enzym nabootst. Gebaseerd op QM-berekeningen van vrije-energielandschappen van cyclitol verbindingen uitgerust met een elektrofiel werd voorgesteld dat een mannose-geconfigureerd cyclitolskelet dat een transcyclisch sulfaat of sulfamidaat bevat, in plaats daarvan een $^1\text{C}_4$ -conformatie zou aannemen. Na het synthetiseren van de doelmoleculen nam het sulfamidaat inderdaad een $^1\text{C}_4$ -conformatie aan, maar helaas botste een van de dubbel gebonden zuurstofatomen van de cyclische sulfamidaatgroep met een leucine residu in het katalytische centrum van het enzym, wat verklaard dat het een slechte remmer is. Deze bevinding werd vervolgens aangegrepen als een kans voor selectieve remming van de isovorm van een enkel enzym door de implementatie van een bump-and-hole-strategie. Mutatie van leucine 310 naar een serine maakte dus de selectieve remming van een enkel lid van de GH47-familie met het sulfamidaat mogelijk. Deze ‘bump-and-hole’ strategie opent het potentieel voor selectieve remming van deze nauw verwante GH47-isovormen, waardoor de studie van hun individuele rol in *N*-glycaan maturatie en ER-geassocieerde afbraak mogelijk wordt.

Hoofdstuk 4 gaat dieper in op het cyclische sulfaat en sulfamidaat thema en ontwikkelt een nieuwe synthetische methode om een imine functionaliteit te introduceren en daardoor een extra plek voor modificatie van deze moleculen te creëren. Aanvankelijk werden dichloorcarbamaten

gesynthetiseerd met behulp van een verscheidenheid aan beschermgroep reagentia en vervolgens omgezet in de bijbehorende aminosulfonyldichloriden. Vervolgens werden aminoalcoholen of diolen behandeld met deze S(IV)-reagentia om cyclische sulfimininen te vormen. Deze eerste stap werd gevolgd door het screenen van verschillende oxidatieomstandigheden om de sulfimininen om te zetten in de S(VI)-sulfiminidaten en sulfonimidamiden. Na het onderzoeken van verschillende omstandigheden voor het verwijderen van de beschermgroepen, werd het duidelijk dat de Boc, Cbz en Troc-groepen allemaal verenigbaar waren met de chemie ten aanzien van cyclische sulfiminidaten en sulfonimidamiden. Voor een globale eenstapsontscherming van hydrogeneringsgevoelige beschermgroepen (PMB, Nap, Bn) resulteerde de Cbz-groep in de hoogste ($\geq 90\%$) opbrengsten. Een van de belangrijkste doelen van de ontwikkeling van sulfiminidaten en sulfonimidamiden is echter het functionaliseren van de imines. Vanuit dat perspectief toonde de Troc-groep het beste potentieel, met middelmatige tot hoge opbrengsten ($\geq 70\%$). Door gebruik te maken van deze nieuwe methodologie werden sulfonimidaten en sulfonimidamiden op zowel een glucose als een galactose cyclitol-skelet gesynthetiseerd. Toekomstige biologische karakterisering voor het bepalen van de werkzaamheid en potentiële therapeutische toepassingen van de verbindingen voor de behandeling van de ziekte van Pompe en Fabry moet nog worden onderzocht, evenals hun potentiële toepassing als antivirale middelen die werken door ER α -glucosidasen te remmen. De initiële biochemische evaluatie van de glucose cyclosulfonimidaten toonde inhibitie van rhGAA waarvan werd aangetoond dat dit een covalent en onomkeerbaar proces was. Niettemin zouden deze verbindingen verder kunnen worden geoptimaliseerd in termen van remmende activiteit en selectiviteit door het modificeren van de imine groep.

Hoofdstuk 5 benut het potentieel van 1,6-cyclophellitol-cyclosulfonimidaten in de ontwikkeling van potentiële glucosyltransferaseremmers. Om nieuwe UDP-glucose-mimetica te creëren werden glucose cyclitol sulfiminidaat verbindingen gekoppeld aan een uridine-bouwsteen via een thiofosfaat- of sulfamidebinding. Het gebruik van de P(V)-chemie, ontwikkeld door de Baran groep, vergemakkelijkte de installatie van de thiofosfaatkoppeling.

Hoofdstuk 6 zette de zoektocht naar GT-remmers voort door een op acceptoren gebaseerde strategie toe te passen. Een kleine bibliotheek van glucosylceramide (GlcCer), galactosylceramide (GalCer) en lactosylceramide (LacCer) mimetica werd gesynthetiseerd met als doel het remmen van A4GALT, het galactosyltransferase enzym dat verantwoordelijk is voor de vorming van Gb3, het glycosphingolipide dat zich ophoopt bij Fabry-patiënten. Modificaties

werden ofwel in het glycon- ofwel in het aglycon-gedeelte van LacCer gemaakt. Gegeven dat AdaGalCer het enige bekende niet-natuurlijke A4GALT-substraat is dat in staat is om de Gb3-niveaus in fibroblasten te verlagen werden structuurmodificaties rationeel geïncorporeerd met als doel potentiële competitieve en covalente A4GALT-remmers te genereren. Concreet werden GlcCer, GalCer en LacCer uitgerust met een adamantyl- of bifenyagroep in plaats van de natuurlijke palmitinezuurketen. Bovendien werden sommige verbindingen op de C-4- en/of C-3-positie gemodificeerd, waarbij de C-4-hydroxylgroepen werden verwijderd (deoxy), vervangen (amine) of gefunctionaliseerd met een verscheidenheid aan elektrofielen. Deze aanpak werd gevolgd omdat A4GALT de glycosylatie van de C-4-positie van galactosylgroepen katalyseert.

Ten slotte geeft **hoofdstuk 7** een samenvatting van de beschreven hoofdstukken met suggesties voor vervolgonderzoek.