



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Synthetic strategies for non-hydrolyzable pyrophosphate analogues

Guo, J.

Citation

Guo, J. (2026, September 17). *Synthetic strategies for non-hydrolyzable pyrophosphate analogues*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4309697>

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/1887/4309697>

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

Nederlandse samenvatting

Synthetische strategieën voor niet-hydrolyseerbare pyrofosfaatanalogen

De pyrofosfaatgroep speelt een belangrijke rol in uiteenlopende biologische processen, waaronder glycosylering, celwandsynthese, signaaltransductie, energiemetabolisme en de biosynthese van nucleïnezuren. De intrinsieke chemische en enzymatische instabiliteit van het pyrofosfaatmotief bemoeilijkt echter de studie van de processen waarin het betrokken is. Het onderzoek dat in deze thesis wordt beschreven, richt zich op de ontwikkeling van niet-hydrolyseerbare pyrofosfaatanaloga als remmers en/of structurele probes om de structuur en het werkingsmechanisme van enzymen die deze verbindingen als substraten gebruiken te bestuderen.

Hoofdstuk 1 introduceert verschillende pyrofosfaatbevattende moleculen en benadrukt de betrokkenheid van cytidine difosfaat glycerol (CDP-Gro) en cytidine difosfaat ribitol (CDP-Rbo) bij de biosynthese van wall teichoic acid (WTA), evenals de rol van nucleosidedifosfaat (NDP)-suikers als donorsubstraten voor glycosyltransferases. Vervolgens wordt een overzicht gegeven van strategieën die zijn ontwikkeld om pyrofosfaatmimetica te genereren, met een focus op bisfosfonaat- en oxysulfonylcarbamaatanaloga, waarmee de basis wordt gelegd voor het ontwerp en de synthese van de stabiele analoga die in de daaropvolgende hoofdstukken worden beschreven.

Hoofdstuk 2 beschrijft een eenvoudige synthetische methode voor de bereiding van een reeks CDP-Gro- en CDP-Rbo-mimetica als potentiële remmers van wall teichoic acid polymerases. Sulfonylcarbamaat- en oxyfosfonylcarbamaatgroepen werden geïntroduceerd als pyrofosfaat-isostere groepen, wat leidde tot verhoogde chemische stabiliteit. In de beschreven synthesesroutes werden chlorosulfonylisocyaan (CSI) en dichloorfosforylisocyaan (dCPI) gebruikt als veelzijdige koppelingsreagentia. Deze reagentia kunnen in twee richtingen worden toegepast: door eerst te reageren met het cytidinedeel en vervolgens met het glycerol- of ribitoldomein, of omgekeerd, wat flexibele routes naar verschillende CDP-Gro- en CDP-Rbo-mimetica mogelijk maakt. De remmende activiteit van deze verbindingen tegen enzymen die CDP-Gro en CDP-Rbo gebruiken moet nog worden onderzocht.

Hoofdstuk 3 beschrijft het ontwerp en de synthese van twee uridinedifosfaat N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc)-mimetica. UDP-carbaGlcNAc werd ontworpen waarbij de GlcNAc-groep werd vervangen door een niet-hydrolyseerbare carba-GlcNAc-eenheid, terwijl een tweede analoog zowel een carba-GlcNAc-eenheid als een methyleenbisfosfonaatbinding bevat, waardoor zowel de glycosidische als de pyrofosfaatbinding niet hydrolyseerbaar zijn. UDP-carbaGlcNAc werd opgebouwd via P(III)–P(V)-koppelingschemie, terwijl het P–CH₂–P-gekoppelde UDP-GlcNAc-analoog werd gesynthetiseerd met behulp van een fosforamidiet–fosfodiësterstrategie.

Hoofdstuk 4 beschrijft een nieuwe orthogonale desymmetriseringstrategie voor de synthese van asymmetrische difluoromethyleenbisfosfonaten, die gestabiliseerde analoga zijn van natuurlijke

pyrofosfaten met een $P-CF_2-P$ -binding. Het symmetrische diethyl(dimethyl)difluoromethyleenbisfosfaatreagens werd op gramschaal gesynthetiseerd (18 gram). De methode maakt gebruik van het verschil in reactiviteit tussen methyl- en ethylestergroepen om een stapsgewijze demethylerings- en condensatiereeks mogelijk te maken, waarbij één methylgroep selectief kan worden verwijderd om een intermediair te vormen dat kan worden gekoppeld aan een alcohol tot een tetra-esterintermediair. Complete ontscherming van dit intermediair levert terminale difluoromethyleenbisfosfaatmoleculen op. Aan de andere kant, maakt de selectieve verwijdering van de resterende methylgroep een koppeling met een tweede alcohol mogelijk, waardoor toegang wordt verkregen tot asymmetrische difluoromethyleenbisfosfaatderivaten. De toepasbaarheid van deze methode werd aangetoond door de synthese van een reeks nucleotidedifosfaat- en verwante difluoromethyleenbisfosfaatanaloga, waaronder ADP-, ADP-ribose-, CDP-glycerol- en CDP-ribitol-derivaten.

Om de in Hoofdstuk 4 beschreven asymmetrische difluoromethyleenbisfosfonaten verder uit te breiden, beschrijft **Hoofdstuk 5** het ontwerp en de synthese van (difluoro)methyleenbisfosfaat UDP-carbagalactose-analoga als niet-hydrolyseerbare UDP-Gal-mimetica. Deze analoga bevatten carbagalactose en $P-CH_2-P$ - of $P-CF_2-P$ -motieven, waardoor zowel chemische als enzymatische stabiliteit wordt verhoogd terwijl essentiële structurele kenmerken voor biologische herkenning behouden blijven. In tegenstelling tot wat in Hoofdstuk 4 werd waargenomen, bleek Wada's reagens niet bruikbaar voor de koppeling van difluoromethyleenbisfosfonaten met secundaire alcoholen. Verschillende benaderingen, waaronder verschillende condensatiereagentia, nucleofiele substitutie van tosylaten en Mitsunobu-reacties, werden onderzocht maar waren eveneens niet succesvol. Uiteindelijk leidde nucleofiele substitutie van een carba- β -galactose-triflaat door het tetrabutylammoniumzout van een difluoromethyleenbisfosfaat tot de vorming van een volledig beschermd $P-CF_2-P$ -gekoppeld UDP-Gal-analoog. Het overeenkomstige $P-CH_2-P$ -gekoppelde UDP-Gal-analoog werd opgebouwd via een fosforamidiet-fosfodiësterstrategie volgens dezelfde algemene procedure als gebruikt voor de UDP-GlcNAc-analoga.

De $P-CH_2-P$ - en $P-CF_2-P$ -analoga werden geëvalueerd in een in vitro biochemische assay voor remming van recombinant humaan A4GALT, waarbij IC_{50} -waarden van $26,0 \pm 2,8 \mu M$ en $22,0 \pm 1,2 \mu M$ werden verkregen, ondanks de relatief hoge concentratie UDP-Gal-substraat in de assay. Deze resultaten suggereren dat beide analoga sterker binden dan natuurlijk UDP-Gal onder deze omstandigheden.

Hoofdstuk 6 vat het in deze thesis beschreven onderzoek samen en biedt een vooruitblik op toekomstige onderzoeksrichtingen. Dit hoofdstuk bespreekt de mogelijke toepassing van de ontwikkelde synthetische strategieën op andere pyrofosfaatbevattende moleculen en onderzoekt de mogelijkheid om de permeabiliteit van de celmembranen van de gesynthetiseerde remmers te verbeteren via prodrugstrategieën. Deze benaderingen worden geacht de verdere ontwikkeling van verwante remmers te ondersteunen.