



Doctoral Thesis

Auf dem Weg zu übergangszustandsanalogen Hemmern von Glycosidasen. Optimierung der Wechselwirkungen zwischen Hemmer und Enzym.

Author(s):

Panday, Narendra

Publication Date:

2000

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-003929056> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr.13657

**Auf dem Weg zu Übergangszustandsanalogen
Hemmern von Glycosidasen. Optimierung der
Wechselwirkungen zwischen Hemmer und Enzym.**

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels
Doktor der Naturwissenschaften
der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von
Narendra Panday
Dipl. Natw. ETH
Geboren am 3. Januar 1970
aus Frankreich

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. A. Vasella, Referent
Prof. Dr. D. Arigoni, Korreferent

Zürich 2000

Zusammenfassung

Die Pyrrole **78**, **86** und **87** und das 1,2,3-Triazol **88** wurden hergestellt, um durch Vergleich ihrer Hemmeigenschaften mit jenen der Azole **30** und **21** zu überprüfen, ob ein seitlich protonierbares glycosidisches Heteroatom auch bei β -*N*-Acetylglucosaminidasen Voraussetzung für eine starke Hemmung durch Hemmer vom Lacton Typ ist. Anhand der (formal) vom Trifluoracetylglucosamin abgeleiteten Pyrrole **101–103** wurde zusätzlich untersucht ob eine Erhöhung der Azidität des Acetamido H–N von **78**, **86** und **87** zu einer Verbesserung der Hemmeigenschaften führt.

Die Pyrrole **78**, **86** und **87** sowie die entsprechenden Trifluoracetyl-Analogen **101–103** wurden aus den geschützten *gluco*-Pyrrolopyridinen **68–70** hergestellt. Gemeinsamer Schlüsselschritt der Synthesen war die säurekatalysierte Substitution der C(8)-Benzyloxygruppe durch eine Azidogruppe, wobei unter Bedingungen kinetischer Kontrolle vorwiegend das *gluco*-konfigurierte Azid und unter Bedingungen thermodynamischer Kontrolle bevorzugt das *manno*-konfigurierte Azid entstand. Das vom *N*-Acetylglucosamin abgeleitete 1,2,3-Triazol **88** wurde aus dem 1:1-Gemisch der *L-ido*- und *D-gluco* Acetyleno-Diole **142** und **143** hergestellt.

Verglichen mit dem Tetrazol **30** und Imidazol **21** sind die Pyrrole **78**, **86** und **87** und das 1,2,3-Triazol **88** schwache Hemmer der β -*N*-Acetylglucosaminidase aus Rinderniere. (**78**: $K_i = 75 \mu\text{M}$, **86**: $K_i = 20 \mu\text{M}$, **87**: $K_i = 19 \mu\text{M}$ und **88**: $K_i = 4 \mu\text{M}$). Dies bestätigt die Erfordernis eines seitlich protonierbaren Heteroatoms in der glycosidischen Stellung für eine starke Hemmung von β -*N*-Acetylglucosaminidasen. Der Ersatz der Acetamidogruppe durch eine Trifluoracetamidogruppe erhöht die Hemmeigenschaften auf etwa das doppelte.

Um das vom *N*-Acetylglucosamin abeleiteten Imidazol **21** herzustellen, wurden Bedingungen untersucht, welche die direkte Substitution der C(8)-Benzyloxygruppe von **84** durch eine Azidogruppe, die regioselektive Spaltung dieser Benzyloxygruppe, oder die regioselektive Spaltung der C(2)-Benzyloxygruppe des Tetra-O-benzylgluconolactams **38** ermöglichen sollten. Es wurden Bedingungen gefunden, die eine regioselektive Spaltung der C(2)-OBn-Gruppe von **38** und dem *manno*-Epimeren **39** ermöglichten. Die hierbei in guten Ausbeuten erhaltenen 3,4,6-Tri-O-benzylglyconolactame **100** bzw. **184** liessen sich in das C(8)-Acetamidoimidazol **21** bzw. in das C(8)-Acetamido-1,2,4-Triazol **89** überführen. Für **21** wurde, den von *Tatsuta et al.* bestimmten IC_{50} -Wert von 7 nM bestätigend, ein IC_{50} -Wert von 5 nM gegen β -*N*-Acetylglucosaminidase aus Rinderniere ermittelt. Das Triazol **89** weist bei kompetitiver Hemmung einen K_i -Wert von 34 nM auf, der somit zwischen jenem des Imidazols **21** ($IC_{50} = 7$ nM) und jenem des Tetrazols **30** ($K_i = 200$ nM) liegt; d. h. auch hier findet man die für die Hemmung von β -Glucosidasen, β -Mannosidasen und β -Galactosidasen beobachtete Korrelation mit der Basenstärke des Hemmers.

Zur besseren Charakterisierung und Ausnutzung der Wechselwirkung zwischen der C(2)-OH-Gruppe des Glycons und der Glycosidase, welche zur Stabilisierung des Übergangszustandes beiträgt, wurde untersucht, ob der Erstatz der C(2)-Hydroxy- durch eine C(2)-Ammoniumgruppe bei einer Anzahl von *gluco*-konfigurierten Hemmern (**6**, **8**, **16**, **17**, **24**, **25** und **27**) zu einer Verbesserung der Hemmeigenschaften führt. Dazu wurden das Aminolactam **107**, das Aminotetrazol **106** und die Aminopyrrole **109** und **110** in einer Stufen aus dem geschützten Aminolactam **107**, dem GlcNAc-Tetrazol **30** und den beiden Azidopyrrolen **125** und **127** hergestellt. Das Aminoimidazol **104**, das Amino-1,2,4-Triazol **105** und das Amino-1,2,3-

Triazol **108** wurden als Zwischenstufen im Rahmen der Synthese der GlcNAc-Azole **21**, **89** und **88** hergestellt.

Das pH-Optimum der Hemmung der Amine liegt unterhalb ihres pK_{HA} -Wertes. Dies zeigt, dass sie als Ammoniumsalze gebunden werden und dass C(2)-OH als H-Brückendonator (zum katalytischen Nucleophilen) wirkt und nicht (primär) als H-Brücken-Akzeptor. Der Einfluss der C(2)-NH₃⁺-Gruppe auf die Hemmstärke korreliert mit der Basizität des glycosidischen Heteroatoms. Die deutlichste Zunahme der Hemmstärke beobachtet man für jene Amine, denen ein glycosidisches Heteroatom fehlt; die Zunahme entspricht einem Energiebetrag von 1.5 – 2.9 kcal/mol, während die Zunahme für die Amine **106** und **107** mit schwach basischem glycosidischem Heteroatom ($\Delta\Delta G(C(2)-OH \rightarrow C(2)-NH_3^+) = 0.6 - 1.1$ kcal/mol) weniger deutlich ist. Bei den Aminen **104** und **105**, die ein stark basisches Heteroatom besitzen überwiegt der ungünstige Einfluss des Ersatzes der C(2)-OH-Gruppe durch eine C(2)-NH₃⁺-Gruppe und führt zu einer Abnahme der Hemmstärke um 2.3 bis 4.7 kcal/mol.

Zur weiteren Verbesserung der Hemmwirkung wurden substituierte Tetrahydroimidazopyridine hergestellt. Der optimale Substitutionsort wurde mit Hilfe einer pK_{HA}/K_i -Korrelation bestimmt und dazu die regioisomeren C(2)- bzw. C(3)-Acetamidoderivate **115** und **118** hergestellt. Als Edukt diente das Thiolactam **81**, das entweder mit Iodacetonitril regioselektiv *N*-alkyliert oder mit Aminoacetonitril kondensiert wurde. Der Ringschluss erfolgte jeweils spontan; die wenig stabilen Aminoimidazole **206**, **207**, **217** und **224** wurden *N*-acetyliert.

Die Acetamido-Imidazole sind signifikant weniger basisch als die beiden Mutterverbindungen **16** und **18**, nehmen aber im wesentlichen die gleiche Konformation ein. Korrelation der Basizität von **115** und **116** und ihrer Hemmstärke gegen β -Glucosidasen aus Mandeln und aus *C. saccharolyticum*

und die analoge Korrelation der Basizität von **117** und **118** mit ihrer Hemmstärke gegen Schnecken- β -Mannosidase machte den ungünstigen Einfluss der C(3)- nicht aber der C(2)-Acetamidogruppe deutlich. Die erstaunlich starke Hemmung der α -Glucosidase aus Brauhefe durch **115** weist auf eine bindende Wechselwirkung zwischen diesem Enzym und der C(2)-Acetamido-Gruppe hin.

Um den Einfluss weiterer C(2)-Substituenten auf die Hemmeigenschaften von **16** zu untersuchen wurde ausgehend von **84** über das 2-Iodimidazol **122** eine Reihe weiterer C(2)-funktionalisierter Imidazole (**229–242**) hergestellt. Die Einführung hydrophober und flexibler Substituenten, wie in **237** und **238** führte zu nanomolar bzw. subnanomolar wirkenden Hemmern von β -Glucosidasen; dabei handelt es sich um langsame Hemmer. Der C(2)-Substituent hat nur einen geringen Einfluss auf die Selektivität der Hemmung von β - und α -Glucosidasen. Die Einführung eines Hydroxymethylsubstituenten (**231**) oder eines Phenethylsubstituenten (**238**) führte zu einer markanten Steigerung der Hemmstärke, doch waren die 1'-Hydroxyphenethyl-Derivate **241** und **242** schwächere Hemmer als **231** und **238**. Dieses Ergebnis wurde anhand der Konformationsänderung des Substrates auf dem Weg zum Übergangszustand erklärt.

Summary

The pyrroles **78**, **86**, and **87** and the 1,2,3-triazole **88** were prepared to compare their inhibitory properties with those of the azoles **30** and **21** and thereby check if a laterally protonable glycosidic heteroatom is required for a strong inhibition of β -*N*-acetylglucosaminidases by lactone type inhibitors. The analogous, trifluoroacetylated pyrroles **101–103** were prepared to check whether an increase of the acidity of the acetamido H–N of **78**, **86**, and **87** improves their inhibitory strength.

The *N*-acetylglucosamine related pyrroles **78**, **86**, and **87** as well as the trifluoro analogues **101–103** were prepared from the *gluco*-pyrrolopyridines **68–70**; the *Lewis* acid promoted substitution of the C(8)-benzyloxy group by an azido group was the key step of this transformation. The *gluco*-configured azide was mainly formed under conditions of kinetic control whereas equilibration favoured the (more stable) *manno*-azide. The *N*-acetylglucosamine related 1,2,3-triazole **88** was prepared from a 1:1-mixture of the *L-ido*- and *D-gluco* acetylenediols **142** and **143**.

The pyrroles **78**, **86**, and **87**, and the 1,2,3-triazole **88** are weaker inhibitors of the β -*N*-acetylglucosaminidase from bovine kidney (**78**: $K_i = 75 \mu\text{M}$, **86**: $K_i = 20 \mu\text{M}$, **87**: $K_i = 19 \mu\text{M}$ und **88**: $K_i = 4 \mu\text{M}$) than the tetrazole **30** and the imidazole **21**. This result confirms the requirement for a laterally protonable glycosidic heteroatom for a strong inhibition of β -*N*-acetylglucosaminidases. The trifluoroacetamido pyrroles **101–103** inhibit the tested *N*-acetyl- β -D-glucosaminidases twice as strongly than the corresponding acetamido pyrroles.

To prepare the *N*-acetyl- β -D-glucosamine derived imidazole **21** I looked for methods to either directly substitute the C(8)-benzyloxy group of **84** by an azido group, or to regioselectively cleave this benzyloxy group, or to

regioselective cleave the C(2)-benzyloxy group of the tetra-O-benzylgluconolactam **38**; I found a method to regioselectively cleave the C(2)-OBn group of **38** and its *manno*-epimer **39**. The 3,4,6-tri-O-benzylglyconolactams **100** and **184** obtained by this method were transformed to the C(8)-acetamidoimidazole **21** and the C(8)-acetamido-1,2,4-triazole **89**, respectively. An IC_{50} of 5 nM was determined for **21** against β -*N*-acetylglucosaminidases from bovine kidney. This IC_{50} compares well to the IC_{50} of 7 nM determined by *Tatsuta et al.* The triazole **89** is a competitive inhibitor (K_i of 34 nM), its inhibitory strength lying between the one of the imidazole **21** ($IC_{50} = 7.0$ nM) and the one of the tetrazole **30** ($K_i = 200$ nM); thus, as observed for the inhibition of β -glucosidases, β -mannosidases and β -galactosidases, the inhibitory strength correlates with the basicity of the inhibitor.

To better characterize and exploit the interaction between the C(2)-OH-group of the glycon and the glycosidase contributing to the stabilization of the transition state, I examined the effect of replacing the C(2)-hydroxy group of a series of *gluco*-configured inhibitors (**6**, **8**, **24**, **16**, **17**, **25** and **27**) by an ammonium group on the inhibitory properties. For this purpose the aminolactam **107**, the aminotetrazole **106**, and the aminopyrroles **109** and **110** were prepared from the protected aminolactam **188**, the GlcNAc-tetrazole **30**, and the two azidopyrroles **125** and **127**. The aminoimidazole **104**, the amino-1,2,4-triazole **105**, and the amino-1,2,3-triazole **108** were prepared in the context of the synthesis of the GlcNAc-azoles **21**, **88** and **89**.

The pH-optimum of the inhibition by the amines is below their pK_{HA} -value, evidencing that they are bound as ammonium salts and that C(2)-OH acts primarily as a H-bond donor (to the catalytic nucleophile) and not as a H-bond acceptor. The influence of the C(2)-NH₃⁺-group on the inhibition

correlates with the basicity of glycosidic heteroatom. The inhibitory strength increases most markedly for the amines lacking a glycosidic heteroatom ($\Delta\Delta G(\text{C}(2)\text{-OH}\rightarrow\text{C}(2)\text{-NH}_3^+) = 1.5 - 2.9$ kcal/mol), but much less for the amines **106** und **107** with a weakly basic heteroatom ($\Delta\Delta G(\text{C}(2)\text{-OH}\rightarrow\text{C}(2)\text{-NH}_3^+) = 0.6 - 1.1$ kcal/mol). For the amines **104** and **105** possessing a strongly basic heteroatom at the glycosidic position the unfavourable influence of replacing the C(2)-OH group by a C(2)-NH₃⁺-group dominates and leads to a decrease of the inhibitory strength by 2.3 bis 4.7 kcal/mol.

Functionalized tetrahydroimidazopyridines were prepared to further increase the inhibitory strength. The appropriate site for the introduction of substituents was determined by means of a $\text{pK}_{\text{HA}}/K_{\text{i}}$ -correlation for C(2)- and C(3)-acetamido derivatives **115** and **118**, respectively, prepared for it. The thiolactam **81** was used as starting material for their preparation; it was either converted to the amidines **215** und **216** which were regioselectively *N*-alkylated, or it was condensed with aminoacetonitrile. The spontaneous ring closure gave the unstable aminoimidazoles **206**, **207**, **217**, and **224** which were *N*-acetylated.

The acetamidoimidazoles are significantly less basic than the two parent compounds **16** and **18** but adopt essentially the same conformation. The correlation of the basicity of **115** and **116** with their inhibitory strength against β -glucosidases from almonds and from *C. saccharolyticum* as well as the analogous correlation of the basicity of **117** and **118** and their inhibitory strength against snail β -mannosidase evidenced the unfavourable influence of the C(3)- but not of the C(2)-acetamido group. The surprisingly strong inhibition of the α -glucosidase from brewer's yeast by **115** indicates a binding interaction between this enzyme and the C(2)-acetamido group.

To study the influence of other C(2)-substituents on the inhibitory property of **16**, the protected imidazole **84** was converted to the 2-iodoimidazole **122** which proved a versatile intermediate for the preparation of a series of C(2)-functionalized imidazoles (**229–242**). The introduction of flexible substituents as in **237** and **238** led to derivatives inhibiting β -glucosidases at nanomolar and subnanomolar concentrations; these inhibitors are slow binding. The C(2)-substituent has only a minor influence on the selectivity of the inhibition of β - and α -glucosidases. The introduction of a hydroxymethyl substituent (**231**) or of a phenethyl substituent (**238**) led to a marked increase of the inhibitory strength. However the 1'-hydroxyphenethyl-derivatives **241** and **242** are weaker inhibitors than **231** and **238**. This result was rationalized in the context of a refined mechanism of action of retaining β -glycosidases.