



Doctoral Thesis

Synthesis and evaluation of gluco- and manno-configured tetrahydroimidazopyridines. Probing the mechanism of action of retaining β -glucosidases and β -mannosidases

Author(s):

Terinek, Miroslav

Publication Date:

2005

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004959396> →

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 No. 15931

**Synthesis and Evaluation of *gluco-* and *manno-*
Configured Tetrahydroimidazopyridines.
Probing the Mechanism of Action of Retaining
 β -Glucosidases and β -Mannosidases**

Submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

Presented by

Miroslav TERINEK

Dipl. Ing., Institute of Chemical Technology, Prague
born on Dezember 1st, 1972
from the Czech Republic

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. A. Vasella, Examiner
Prof. Dr. B. Jaun, Co-examiner

Zürich 2005

Summary

It was known that retaining β -glucosidases and galactosidases of families 1–3 feature a strong interaction between C(2)–OH of the substrate and the catalytic nucleophile. An analogous interaction can hardly take place for retaining β -mannosidases. A structure-activity comparison between the inhibition of the β -glucosidase from *Caldocellum saccharolyticum* (family 1) and β -glucosidase from sweet almonds by the *gluco*-imidazoles **19**, **47–51**, and the inhibition of snail β -mannosidase by the corresponding *manno*-imidazoles **20**, **86–90** does not show any significant difference, suggesting that later stages of the rate determining step catalyzed by these glycosidases do not differ significantly. For this comparison, I synthesized and tested the *manno*-imidazoles **86–90** and **92–102**. Among these, the alkene **93** is one of the strongest known inhibitors of snail β -mannosidase ($K_i = 6$ nM, non-competitive); the aniline **99** is the strongest competitive inhibitor of this series ($K_i = 8$ nM).

The *gluco* and *manno* tetrahydropyridoimidazole-2-acetic esters and acids **103**, **104** and **105**, **106** were synthesized by condensation, in the presence of HgCl_2 , of the known thionolactam **29** with the β -amino ester **141** that was obtained by addition of methyl acetate to the imine **150**, followed by debenylation. The resulting methyl esters **103** and **105** were hydrolyzed to the acetic acids **104** and **106**. The methoxycarbonyl imidazole **107** and the acid **108** were obtained *via* the known aldehyde **152**. The imidazoles **103–108** were tested as inhibitors of the β -glucosidase from *Caldocellum saccharolyticum*, the α -glucosidase from brewer's yeast, the β -mannosidase from snail, and the α -mannosidase from *Jack* bean. There is a similar dependence of K_i on the nature of the C(2) substituent in the *gluco* and *manno* series. With the exception of **101**, *manno*-imidazoles are weaker inhibitors than the corresponding *gluco*-analogues. The methyl acetates **103** and **105** are 3–4 times weaker than the methyl propionates **49** and **88**, in agreement with the hydrophobic effect. The *gluco* configured methoxycarbonyl imidazole **107** is 20 times weaker than the methyl acetate **103**, reflecting the reduced basicity of **107**, while the *manno*-configured methoxycarbonyl imidazole **100** is only 1.2 times weaker than the methyl acetate **105**, suggesting a binding interaction of the methoxycarbonyl group and the β -mannosidase. The carboxylic acids **50**, **89**, **101**, **104**, **106**, and **108** are weaker inhibitors than the esters, with the propionic acids **50** and **89**

the strongest and the carboxy-imidazoles **101** and **108** the weakest inhibitors. The *manno*-acetate **106** inhibits the β -mannosidase some 8 times less strongly than the propionate **89**, but only 1.5 times more strongly than the carboxylate **101**, suggesting a compensating binding interaction of the carboxy group and the β -mannosidase. The α/β selectivity for the *gluco*-imidazoles ranges between 110 for **108** and $13.4 \cdot 10^3$ for **50**; the *manno*-imidazoles are less selective. The methyl propionates proved the strongest inhibitors of the α -glucosidase (IC_{50} (**49**) = 25 μM) and the α -mannosidase (K_i (**88**) = 0.60 μM).

The *gluco*-configured analogue **110** of Nagstatin and the methyl ester **109** were prepared to find out if the relation between the inhibitory activity of esters and acids is also valid for the inhibition of the *N*-acetyl- β -glucosaminidase from bovine kidney. The imidazopyridines **110** and **109** were synthesized by first condensing the thionolactams **66** or **156** with the β -amino ester **141**. The silyl ethers **157** and **158** resulting from **156** were desilylated to **154** and **155**; these alcohols were directly obtained by condensing **66** and **141**. The attempted substitution of the C(8)-OH group of **154** by azide under *Mitsunobu* conditions led unexpectedly to the deoxygenated α -azido esters **159**. The desired azide **160** was obtained by treating the *manno*-configured alcohol **155** with diphenyl phosphorazidate. The azide was transformed to the debenzylated acetamidoester **109** that was hydrolyzed to the Nagstatin analogue **110**. The imidazole-2-acetates **109** and **110** are nanomolar inhibitors of the *N*-acetyl- β -glucosaminidases from *Jack* beans and from bovine kidney, submicromolar to micromolar inhibitors of the β -glucosidase from *Caldocellum saccharolyticum*, and rather weak inhibitors of the snail β -mannosidase. In all cases, the ester was a stronger inhibitor than the corresponding acid. As expected from their *gluco* configuration, both imidazopyridines **109** and **110** are stronger inhibitors of the β -*N*-acetylglucosaminidase from bovine kidney than Nagstatin.

The inhibition of snail β -mannosidase by the *manno*-configured amino- and hydroxy-lactams and -imidazoles **20** and **111**–**113** was compared to the inhibition of the β -glucosidases from *C. saccharolyticum* and from sweet almonds by the *gluco*-configured amino- and hydroxy-lactams and -imidazoles **19**, **60**, **62**, and **63** ($\Delta\Delta G_{\text{diss.}}(\text{OH} \rightarrow \text{NH}_3^+)$). Substitution, in the *gluco*-configured **19**, **59** and **60**, of C(2)-OH by an ammonium group strengthens the interaction of the inhibitor with the catalytic nucleophile of retaining β -glucosidases, and weakens the interaction with the

catalytic acid. The analogous substitution in the *manno*-configured inhibitors **20** and **111**, leading to **112** and **113**, respectively, was expected to only reflect the impaired interaction of the inhibitor with the catalytic acid, as the catalytic nucleophile and the C(2) substituent are located on opposite sides of the average ring plane.

The mannonolactam **113** was synthesized from the known hydroxy-lactam **64** by *O*-mesylation followed by azidation and hydrogenation. Sultone **165** was formed as side product upon mesylation of **64**. The imidazole **112** was obtained from **64**, similarly to the synthesis of the known *gluco* isomer **62**, *via* the hydroxy-imidazoles **67** and **68**; best results were obtained by protecting **64** as the triisopropylsilyl ether **179**.

The resulting inhibition by the imidazoles **20** and **112** was interpreted as reflecting an improved binding of the catalytic nucleophile of snail β -mannosidase with the protonated imidazole ring of **112** and an impaired interaction with the catalytic acid, while a comparison of the inhibition by the lactams **111** and **113** is in keeping with the results that are expected if there is no significant interaction between the catalytic nucleophile of snail β -mannosidase and the C(2)-OH group of β -mannosides. The amino-imidazole **112** is a surprisingly strong inhibitor of the α -mannosidase from *Jack* beans ($K_i = 1.22 \mu\text{M}$; mixed-type ($\alpha = 2.3$)).

The oleyl- and dolichyl-substituted *D-manno* tetrahydroimidazopyridine-2-phosphonates **115** and **116** were synthesized as potential mannosyl transferase inhibitors *via* the phosphonate **114**. This phosphonate was prepared *via* a high yielding Pd(PPh₃)₄-catalyzed diphenyl-phosphonylation of the *manno*-iodoimidazole **91**, followed by transesterification to the diethyl phosphonate **192** and dealkylation, providing **114** in eight steps from the thionolactam **29** and in an overall yield of 15%. Alternatively, a more highly convergent synthesis based on the HgCl₂/Et₃N-promoted condensation of the thionolactam **29** with the α -aminophosphonate **200** in THF led to **114** in four steps and the same overall yield. In the presence of HgCl₂/Et₃N, the thionolactam **29** reacted at 80° with 2-methoxyethanol to provide 66% of a 64:36 mixture of the *gluco*- and *manno*-iminoethers **203/204**. Performing the reaction at 22° yielded preferentially the *gluco*-isomer **203** (86%, 84:16).

Zusammenfassung

Es war bekannt, dass retentive β -Glucosidasen und Galactosidasen der Familien 1–3 durch eine starke Wechselwirkung der C(2)–OH Gruppe des Substrates mit dem katalytischen Nucleophil gekennzeichnet sind. Eine analoge Wechselwirkung kann bei den β -Mannosidasen kaum stattfinden. Ein Struktur-Aktivitäts-Vergleich zwischen der Hemmung der β -Glucosidasen aus *Caldocellum saccharolyticum* (Familie 1) und der β -Glucosidasen aus Mandeln durch *gluco*-Imidazole **19**, **47–51** und der Hemmung von β -Mannosidasen aus Schnecken durch die entsprechenden *manno*-Imidazole **20**, **86–90** weist keine signifikanten Unterschiede auf, was darauf hindeutet, dass die Wirkmechanismen dieser Glycosidasen sich nicht wesentlich voneinander unterscheiden, sobald die (geschwindigkeitsbestimmende) Spaltung der C(1)–O Bindung soweit fortgeschritten ist, dass C(1) eine angenähert planare Geometrie aufweist. Für diesen Vergleich synthetisierte und testete ich die *manno*-Imidazole **86–90** und **92–102**. Dabei ist das Alken **93** einer der stärksten bekannten Inhibitoren der β -Mannosidase aus Schnecken ($K_i = 6$ nM, nicht kompetitiv). Das Anilin-Derivat **99** ist der stärkste kompetitive Inhibitor dieser Serie ($K_i = 8$ nM).

Die *gluco*- und *manno*-Tetrahydropyridoimidazol-2-essigsäure und deren Ester (**103**, **104** bzw. **105**, **106**) wurden durch Kondensation des bekannten Thiolactams **29** mit dem β -Aminoester **141** in Gegenwart von HgCl_2 und anschließende Debenzylierung synthetisiert. Der β -Aminoester **141** wurde hergestellt durch die Addition eines metallierten Essigsäuremethylesters an das Imin **150**. Die erhaltenen Methylester **103** und **105** wurden zu den entsprechenden Säuren **104** und **106** hydrolysiert. Das Methoxycarbonylimidazol **107** und die Säure **108** wurden über den bekannten Aldehyd **152** hergestellt. Die Aktivität der Imidazole **103–108** als Hemmer der β -Glucosidase aus *Caldocellum saccharolyticum*, der α -Glucosidase aus Bierhefe, der β -Mannosidasen aus Schnecken und der α -Mannosidase aus Schwertbohnen wurde bestimmt. Ich fand eine vergleichbare Abhängigkeit der K_i -Werte von der Natur des C(2) Substituenten in der *gluco*- und in der *manno*-Reihe. Mit Ausnahme von **101** sind die *manno*-Imidazole schwächere Inhibitoren als die *gluco*-Analoge. In Übereinstimmung mit dem hydrophoben Effekt sind die Essigsäureester **103** und **105** 3–4 mal schwächere Inhibitoren als die Propionsäureester **49** und **88**. Das *gluco*-konfigurierte

Methoxycarbonylimidazol **107** ist ein 20 mal schwächer Inhibitor als der Methylester **103**, was auf die geringere Basizität von **107** zurückzuführen ist. Hingegen ist das *manno*-konfigurierte Methoxycarbonylimidazol **100** nur ein 1.2 mal schwächerer Inhibitor als der Methylester **105**, was eine bindende Wechselwirkung zwischen der Methoxycarbonylgruppe und der β -Mannosidase vermuten lässt. Die Carbonsäuren **50**, **89**, **101**, **104**, **106** und **108** sind schwächere Inhibitoren als die Ester, wobei die Propionsäurederivate **50** und **89** die stärksten und die Carboxyimidazole **101** und **108** die schwächsten Inhibitoren darstellen. Das *manno*-Acetat **106** hemmt die β -Mannosidase 8 mal schlechter als die Propionsäure **89**, aber nur 1.5 mal besser als die Carbonsäure **101**, was eine kompensierende bindende Wechselwirkung zwischen der Carboxylgruppe und der β -Mannosidase vermuten lässt. Die α/β -Selektivität der *gluco*-Imidazole bewegt sich in einem Bereich von 110 für **108** und $13.4 \cdot 10^3$ für **50**, wohingegen die *manno*-Imidazole weniger selektiv sind. Die Propionsäureester stellten sich als die stärksten Hemmer der α -Glucosidase (IC_{50} (**49**) = 25 μM) und der α -Mannosidase (K_i (**88**) = 0.60 μM) heraus.

Das *gluco*-konfigurierte Analoge **110** von Nagstatin und sein Methylester **109** wurden synthetisiert, um herauszufinden ob der Vergleich der biologischen Aktivitäten der Ester und der Carbonsäuren auch für die Hemmung der *N*-Acetyl- β -glucosaminidase aus Rinderniere gültig ist. Die Synthese der Imidazopyridine **110** und **109** beginnt mit der Kondensation der Thiolactame **66** oder **156** mit dem β -Aminoester **141**. Die aus **156** erhaltenen Silylether **157** und **158** wurden in die entsprechenden Alkohole übergeführt, die auch durch Kondensation von **66** und **141** erhalten wurden. Ein Versuch zur Substitution der C(8)-OH Gruppe von **154** durch Azid unter *Mitsunobu* Bedingungen führte unerwarteterweise zum deoxygenierten α -Azidoester **159**. Das gewünschte Azid **160** wurde durch Umsetzung des *manno*-konfigurierten Alkohols **155** mit Diphenylphosphorazidat erhalten. Das Azid wurde in den debenzylierten Acetamidoe-ster **109** übergeführt, und dieser zum entsprechenden Nagstatinanalogen **110** hydrolysiert. Die Imidazol-2-acetate **109** und **110** sind nanomolare Inhibitoren der *N*-Acetyl- β -glucosaminidasen aus Schwertbohnen und Rindernieren, submicromolare bis micromolare Inhibitoren der β -Glucosidase aus *Caldocellum saccharolyticum* und relativ schwache Inhibitoren der β -Mannosidase aus Schnecken. In allen Fällen ist der Ester ein stärkerer Inhibitor als die entsprechende Säure. Wie zu erwarten war, sind die

gluco-konfigurierten Imidazopyridine **109** und **110** stärkere Inhibitoren der *N*-Acetyl- β -glucosaminidasen aus Rinderniere als Nagstatin.

Die Hemmung der β -Mannosidase aus Schnecken durch die *manno*-konfigurierten Amino- und Hydroxylactame und -imidazole **20**, **111**–**113** wurde verglichen mit der Hemmung der β -Glucosidase aus *C. saccharolyticum* und aus Mandeln durch die *gluco*-konfigurierten Amino- und Hydroxylactame und -imidazole **19**, **60**, **62** und **63** ($\Delta\Delta G_{\text{diss.}}(\text{OH} \rightarrow \text{NH}_3^+)$). Die Substitution von C(2)–OH der *gluco*-konfigurierten **19**, **59** und **60** durch eine Ammoniumgruppe verstärkt die Wechselwirkung des Inhibitors mit dem katalytischen Nucleophil der retentiven β -Glucosidase und schwächt die Wechselwirkung mit der katalytischen Säure. Die analoge Substitution in den *manno*-konfigurierten Inhibitoren **20** und **111** führt zu **112** und **113**, von denen erwartet wurde, dass sie nur die schwächere Wechselwirkung des Inhibitors mit der katalytischen Säure widerspiegeln, da sich das katalytische Nucleophil und der C(2) Substituent auf gegenüberliegenden Seiten der mittleren Ringebene befinden.

Das Mannonolactam **113** wurde ausgehend vom bekannten Hydroxylactam **64** durch *O*-Mesylierung, gefolgt von nucleophiler Substitution durch Azid und katalytischer Hydrierung synthetisiert. Das Sulton **165** bildete sich bei der Mesylierung von **64** als Nebenprodukt. Das Imidazol **112** wurde aus **64** über die Hydroxyimidazole **67** und **68** (analog zur Synthese des bekannten *gluco*-Isomeren **62**) hergestellt. Die besten Ergebnisse wurden erhalten, wenn **64** als Triisopropylsilylether **179** geschützt wurde.

Die Hemmwirkung der Imidazole **20** und **112** weist auf eine stärkere Bindung des katalytischen Nucleophilen der β -Mannosidase mit dem protonierten Imidazolring von **112** und eine schwächere Wechselwirkung mit der katalytischen Säure, während ein Vergleich der Hemmung durch die Lactame **111** und **113** in Übereinstimmung ist mit den Ergebnissen die erwartet werden, wenn es keine signifikante Wechselwirkung zwischen dem katalytischen Nucleophil der β -Mannosidase und der C(2)–OH Gruppe der β -Mannoside gibt. Das Aminoimidazol **112** ist überraschenderweise ein starker Inhibitor der α -Mannosidase aus Schwertbohnen ($K_i = 1.22 \mu\text{M}$; gemischte Hemmung ($\alpha = 2.3$)).

Die Oleyl- und Dolichyl-substituierten *D-manno* Tetrahydroimidazopyridin-2-phosphonate **115** und **116** wurden über das Phosphonat **114** als potentielle Mannosyltransferaseinhibitoren gewonnen. Die Synthese des Phosphonats begann mit einer in hohen Ausbeuten ablaufenden Pd(PPh₃)₄-katalysierten Diphenyl-

phosphonylierung des *manno*-Iodimidazols **91**, gefolgt von einer Umesterung zum Diethylester **192**. Die anschliessende Entalkylierung lieferte **114** in einer Gesamtausbeute von 15% über acht Stufen aus dem Thionolactam **29**. Alternativ führt eine konvergente Synthese, die auf einer Kondensation des Thionolactams **29** mit dem α -Aminophosphonat **200** in THF beruht, in vier Stufen und in gleicher Gesamtausbeute zu **114**. Das Thionolactam **29** reagierte bei 80° in Gegenwart von HgCl₂/Et₃N mit 2-Methoxyethanol und ergab in 66% Ausbeute eine 64:36 Mischung der *gluco*- und *manno*-Iminoether **203/204**. Bei 22° bildete sich bevorzugt das *gluco*-Isomere **203** (86%, 84:16).