



Természetes eredetű glikogén foszforiláz gátló analagonjainak szintézise

TDK dolgozat

Készítette:

Sztankovics Andrea

IV. Vegyészmérnök BSc.

Témavezető:

Dr. Juhász László

egyetemi adjunktus

Debreceni Egyetem
Természettudományi és Technológiai Kar
Szerves Kémiai Tanszék
Debrecen, 2011.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	3
2. Irodalmi áttekintés	3
2.1. A cukorbetegség típusai és háttere	3
2.2. A glükóz anyagcseréje és szabályozása	5
2.2.1. Glikogén szintézise	6
2.3. Glikogén lebontása: a glikogén foszforiláz	7
2.4. A GP enzim inhibitorai	8
2.5. Glikogéntárolási betegségek	12
3. Saját vizsgálatok	13
3.1. Célkitűzés	13
3.2. Szintézisterv és a DPM védett 3-hidroxipentándisav előállítása.....	14
3.3. Biológiai vizsgálatok és hatás-szerkezet összefüggés vizsgálatok.....	19
4. Kísérleti rész.....	20
5. Összefoglalás	27
6. Summary	28
7. Irodalomjegyzék	29
8. Köszönetnyilvánítás.....	30

1. Bevezetés

Az emésztési folyamatok során minden étel szénhidráttartalma (oligo- és poliszacharidok) monoszacharidokká (pl.: glükóz) bomlik, ami a véráramban kering, és a sejteknek szolgál táplálékkul. Az agy sejtjeinek kivételével a sejtek a glükózt nem tudják felvenni, csak a hasnyálmirigy által termelt inzulin nevű hormon közreműködésével. Amikor az inzulin a megfelelő sejt felszíni receptorhoz kapcsolódik, megindul a sejtek glükóz felvétele, és a szervezet vércukor szintje normalizálódik.

Cukorbetegség nem más, mint a szénhidrát anyagcsere krónikus zavara, aminek a következtében a szervezetben az úgynevezett célszervek (izom-, zsír- és májszövet) abszolút vagy relatív inzulinhiány miatt nem képesek felvenni és felhasználni a glükózt. Emiatt a vércukorszint emelkedik, a vizeletben cukor jelenik meg.^[1] A betegség diagnosztizálására mai napig a vércukorszint mérést használják, azonban a betegség kialakulásának biokémiai háttere a mai napig sem teljesen tisztázott. Figyelembe véve, hogy a szénhidrát anyagcsere szorosan összefügg a szervezet fehérje és zsír anyagcserével, így ennek a zavara kihat az utóbbiakra is, és a legnagyobb problémát nem csak a közvetlen vércukorszint ingadozás, hanem a betegség hosszú távú szövődményei jelentik.^[2]

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A cukorbetegség típusai és háttere

A WHO kritériumai szerint cukorbetegség állapítható meg, ha a típusos tünetek mellett az éhgyomri vércukorszint $\geq 7,0$ mmol/l, vagy ha a napközi (étkezés utáni) vércukorszint $\geq 11,1$ mmol/l. Diabetes mellitus állapítható meg akkor is, ha klasszikus tünetek nélkül az éhgyomri, illetve az étkezés utáni vércukorszint két különböző alkalommal egyenlő, vagy nagyobb, mint 7,0 illetve 11,1 mmol/l.^[1] Bizonytalan esetben standard vércukorterhelés végzendő 75 g glükózzal (1-es típusú diabetes esetén erre általában nincs szükség).

A glükóz koncentráció a normál vérplazmában 4,5-5,5 mM. A vércukorszint normál értéken belül tartása életfontosságú feladat, mert a glükóz koncentráció hirtelen csökkenése az idegsejtek glükóz függősége miatt súlyos következményekkel jár. Bármely irányban tér el a vércukorszint a normálistól, kompenzáló mechanizmusok lépnek életbe. Ebben a szabályozásban döntő szerepet játszik két hasnyálmirigy eredetű hormon a glukagon és az inzulin.^[2]

A szénhidrát anyagcsere egyike a szervezet legbonyolultabb mechanizmusainak. A szabályozás központi szerve a hasnyálmirigy (pancreas), amelynek hormonjai a Langerhans-

szigetek β -sejtjeiben termelődő inzulin, az α -sejtekben termelődő glukagon, a γ -sejtekben termelődő szomatosztatin szoros egységet alkotnak.

A tápanyagforgalom szabályozásának középpontjában az inzulin áll. Az inzulin kiválasztódás, vagy inzulin érzékenység csökkenése esetén a cukor és a zsírsavcsere felborul, kialakul a *diabetes mellitus*, melynek két lényeges formáját különítjük (1. táblázat) el.^[3]

- 1-es típusú diabetes mellitus (inzulinfüggő, IDDM, inzulindependens diabetes mellitus)

A β -sejtek autoimmun eredetű és progresszív (megállíthatatlan) pusztulásának következménye és így az inzulin termelésének kifejezett csökkenése vagy hiánya jellemző. Kezelése mindig inzulin adásával történik.

Két alcsoportja van:

- a) autoimmun forma
- b) idiopátiás forma.

Az autoimmun formára jellemző a megfelelő mennyiségben kimutatható autoimmun markerek jelenléte, addig az idiopátiás, jóval ritkább alcsoportban e markereket nem lehet kimutatni, de az inzulinhiány itt is jellemző. Ez utóbbi alcsoport elsősorban Japánban fordul elő. Kutatások során nyilvánvalóvá vált, hogy önmagában a genetikai hajlam még nem jelent feltétlenül későbbi diabetes kialakulását. A magyar lakosság jelentős része is hordoz diabetogén alléleket, de ezen egyének közül csak nagyon kevesen válnak cukorbeteggé. A genetikai hajlam mellett bizonyos környezeti tényezők is szerepet játszhatnak, pl. vírusok: parotitis epidemica, influenzavírusok. Megfigyelték, hogy influenzajárványok után bizonyos idővel az 1-es típusú diabetes gyakorisága emelkedett.^[4]

- 2-es típusú diabetes mellitus (nem inzulinfüggő, NIDDM, nem inzulindependens diabetes mellitus)

Ezen esetben az inzulinrezisztencia és inzulinhiány kombinációjáról beszélhetünk. Kezelése diétával és orális antidiabetikum adásával történik.

Feltehetően heterogén csoport, ahol autoimmun markereket nem lehet kimutatni. A betegek 80 %-a elhízott, és a vérben gyakran jelentős mennyiségű endogén inzulin található, mely provokációra tovább növekszik. Általában 35-40 éves kor felett alakul ki, bár serdülőkorban is előfordulhat, és inzulinrezisztencia jellemző. Ameddig a rezisztenciát a pancreas képes inzulin túltermeléssel kompenzálni, addig a diabetes nem alakul ki.^[4]

Jellegzetesség	1-es típusú diabetes	2-es típusú diabetes
Szinonimák	inzulin dependens diabetes mellitus	nem inzulin dependens mellitus
Életkor a betegség kezdetén	általában < 30 év, néha idősebb kor	általában > 40 év, néha fiatalabbak, sőt gyermekek
Genetikai hajlam	környezeti faktorok is szükségesek az expresszióhoz, egypetűjű ikrek 50 %-ában alakul csak ki, ha az egyik iker diabeteses	erős: egypetűjű ikrek 80-100 %-ában alakul ki, ha az egyik iker diabeteses
Kiváltó tényezők	vírus/toxikus/egyéb faktorok indítják el a kiváltó autoimmun folyamatot	elhízás, kor
Tünetek a diagnózis idején	a diagnózis megállapításakor a betegek 80 %-ában pozitív a szigetsejt ellenes antitest (ICA)	a betegek többségében a diagnózis megállapítása előtt 4-7 évig tünetmentes diabetes
Endogén inzulinszint	nagyon alacsony vagy nincs	kimutatható
Inzulinrezisztencia	csak magas vércukorszint esetén van jelen	csaknem mindig jelen van
Tartós éhezés következménye	hyperglykaemia, ketoacidosis	normális vércukorszint
Stressz, inzulinmegvonás következménye	ketoacidosis	ketosis nélkül hyperglykaemia

1. táblázat: A cukorbetegség típusai és jellemzőinek összehasonlítása

Magas vércukorszint számos egyéb ok következtében is létrejöhet, így például terhesség alatt, Cushing-kórban különböző gyógyszerek hatására - ilyenkor a lehetséges oki kezelés mellett a vércukorszint csökkentésére többnyire inzulinra van szükség.^[2]

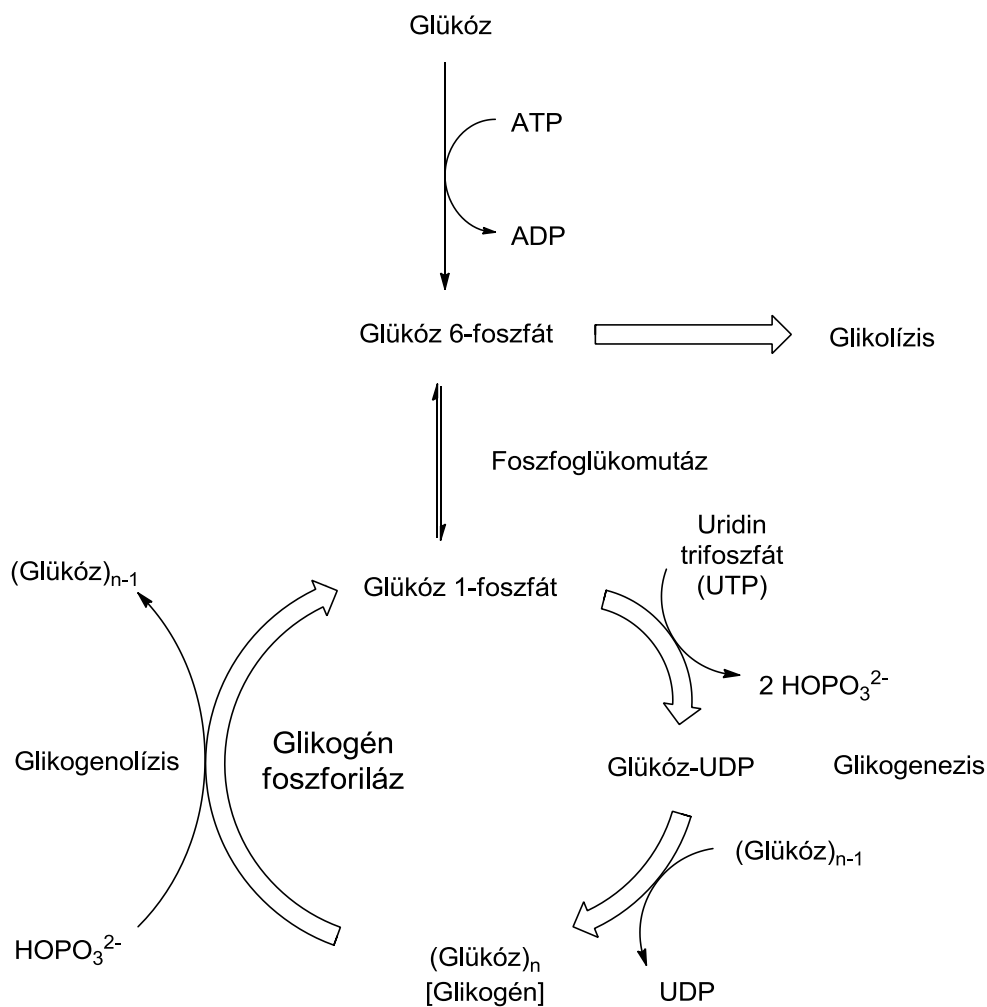
2.2. A glükóz anyagcseréje és szabályozása

A sejtek jelentős része képes a glükóz raktározására glikogén formájában. A két legfontosabb glikogénraktár a máj és a vázizom szövetei.

A glikogénben történő raktározás előnye, hogy igény szerint gyorsan mobilizálható a benne tárolt glükóz, hátránya azonban, hogy nagy a raktározás helyszükséglete.

2.2.1. Glikogén szintézise

A glükóz 6-foszfát, amely a glükóz foszforilációja során képződik (glukoneogenezis), glükóz 1-foszfáttá alakulhat foszoglukomutáz enzim hatására. A glükóz 1-foszfát UTP-vel (uridin-trifoszfát) nukleotidhoz kötött aktivált glükózt képez (UDP-glükóz), mely a folyamatot az UDP-glükóz-pirofoszforiláz enzim katalizálja.



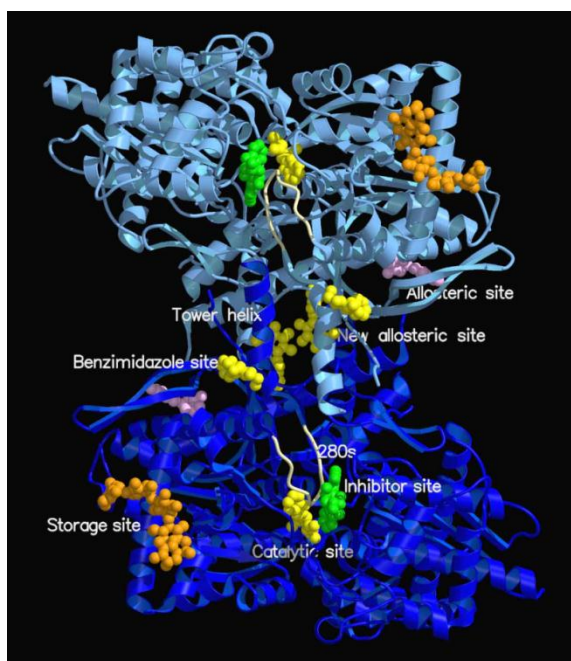
1. ábra: A glikogén anyagcseréje

Az aktivált 1-UDP-glükóz a glikogén nem redukáló végéhez kapcsolódik a glikogén-szintáz által katalizált reakcióban, ami hatására glikogén molekula hossza egy egységgel növekszik.^[3]

2.3. Glikogén lebontása: a glikogén foszforiláz

A sejtekben a glikogén lebontását a glikogén-foszforiláz enzim (GP) katalizálja. Ehhez a reakcióhoz nemcsak a glikogén-foszforiláz enzimre, hanem egy anorganikus (szervetlen) foszfátra is szükség van, ugyanis a lehasadó glükóz glükóz-1-foszfáttá alakul, mely folyamat energetikailag igen kedvező.^[3]

A glikogén-foszforiláz enzim (GP) dimer szerkezetű, két azonos alegységből áll. A katalízishez az enzimen túl egy *prosztetikus csoportra* is szükség van, a piridoxál-foszfátra, ami az enzim egy lizin oldalláncával Schiff bázist képezve fejti ki hatását.^[3]



2. ábra: A glikogén foszforiláz enzim szerkezete és kötőhelyei

A GP aktivitása kovalens módosítással szabályozható a Ser-14 oldallánc foszforilázkínáz enzim segítségével történő foszforilálás által (GP_a → GP_b).

A glikogén foszforiláz enzim izomerjei közül (máj, izom, agy) a vércukorszint szabályozása, a májban található enzim szelektív gátlásával elvileg megoldható, így a 2-es típusú diabetes mellitus kezelésére is lehetőséget nyithat.

A GP enzimen - részletes szerkezetvizsgálata során - az elmúlt években hat kötőhelyet fedeztek fel, amelyekhez kis molekulák kapcsolódása által, az enzim működése gátolható, így elviekben a vércukorszint is szabályozható.^[5]

Az enzim kötőhelyei a következők: a) katalitikus hely, b) glikogén kötőhely, c) purin kötőhely, d) allosztérikus (AMP) kötőhely, e) új allosztérikus (indol) kötőhely, f) benzimidazol kötőhely.

A katalitikus kötőhely a glikogén hasításában játszik döntő szerepet. Itt történik a glikogén hasítása, de ide kötődik a glükóz-1-foszfát, a glükóz, valamint a glükóz analóg inhibitorok. Ez utóbbiak hatására az enzim kevésbé aktív konformációban rögzül, ami meggátolja a szubsztrát (glikogén) kötődését a katalitikus helyhez. A glikogén kötőhelyen a katalitikus reakció előtt a glikogén kapcsolódik az enzimhez, és ezután következik a hasítása.^[6, 7]

A purin kötőhely az enzim felületén helyezkedik el, és a kötőhely közelében lévő hidrofób zseb és a kis molekulák aromás gyűrűje között fellépő kölcsönhatás következtében képes megkötni purin, nukleozid, nukleotid és flavopiridol típusú vegyületeket.

Az allosztérikus kötőhelyek (AMP kötőhely és indol kötőhely) az enzim felületén, illetve a két alegység összekapcsolódásánál találhatóak, melyekhez kötött inhibitor molekulák az enzim kevésbé aktív konformerét stabilizálják, így megakadályozva a glikogén lebontását.

A legújabban felfedezett kötőhely (benzimidazol) szintén egy felszíni kötőhely, és a két allosztérikus kötőhelytől azonos távolságban helyezkedik el.^[6, 7]

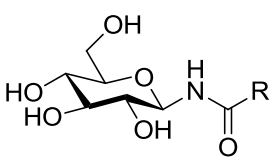
2.4. A GP enzim inhibitorai

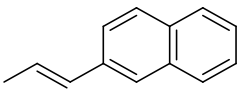
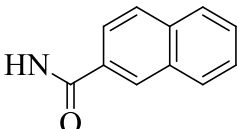
- Katalitikus hely:

A katalitikus hely a monomer középpontjába épült be, megközelítőleg 15Å távolságra van az enzim felületétől. Magába foglalja az esszenciális kofaktort, piridoxál-5'-foszfátot is. Széles körben tanulmányozták a katalitikus helyet glükóz analóg inhibitorokkal melyek elősegítik a kevésbé aktív T állapot stabilizálódását.^[5]

N-acil-glükopiranozil-amin származékok:

Az N-acetil-β-D-glükopiranozil-amin^[8] (2. táblázat, 1. sor) volt az első jól működő glükóz analóg inhibitor, de számos hasonló N-acil-β-D-glükopiranozilamin típusú vegyületet szintetizáltak és vizsgáltak (2. táblázat), melyek közül az N-acil-N'-β-D-glükopiranozil-karbamid származékok (3) bizonyultak az egyik legjobb inhibitor vegyületeknek.^[9]



	R	K _i [μM]
1	—CH ₃ (NAG)	32 ^[9]
2		3,5
3		0,35

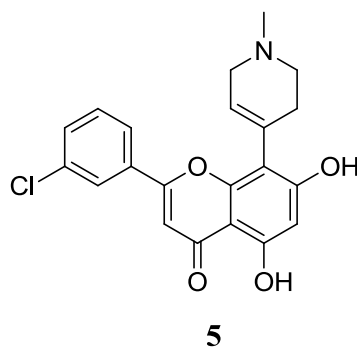
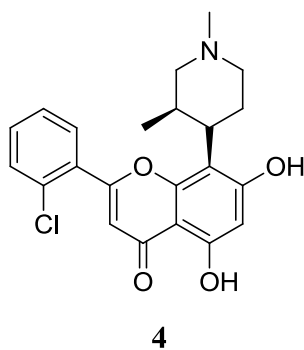
2. táblázat: N-acil-β-D-glükopiranozilamin típusú GP inhibitorok

- Glikogén kötőhely:

Glikogén szemcsékhez való kapcsolódásra szolgál, maltopenta- és -heptaózt, valamint ciklodextrineket is be tud fogadni fiziológias körülmények között. Az aktív centrumtól 30Å távolságra helyezkedik el.^[6]

- Inhibitor (vagy koffein) kötőhely:

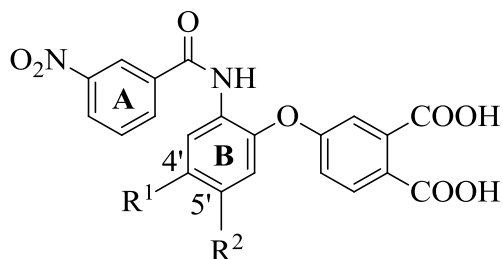
Az inhibitor vagy koffein kötőhely az enzim felületén a katalitikus hely belépésénél néhány 12Å távolságra van az enzim T állapotában. Purin származékok, nukleozidok és nukleotidok, illetve flavopiridol típusú vegyületek kötődnek ehhez a helyhez.^[6]



E származékok közül a flavopiridol (**4**) esetében 1,16 μM, míg a módosított **5** származék esetében 0,83 μM gátlási állandókat mértek.

- Allosztérikus (vagy AMP-kötési) hely:

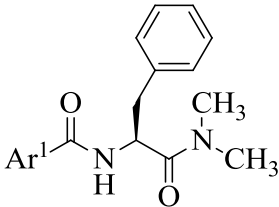
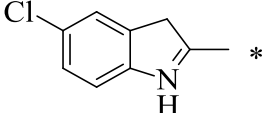
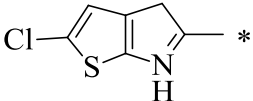
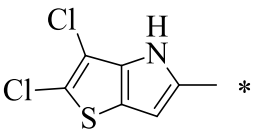
Az allosztérikus hely 30Å távolságra van a katalitikus helytől. A kötőhelyen aktiváló hatású AMP, illetve gátló hatású glükóz-6-foszfát, továbbá pl. dihidropiridin-disav, ftálsav, acilkarbamid, pentaciklusos triterpenoidtípusú inhibitorok képesek megkötődni.^[6, 7] A 3. táblázatban néhány ftálsav típusú vegyület szerkezetét (**6** - **9**) és inhibíciós állandóit tüntettük fel.



	R¹	R²	PLGPa
6	H	H	1,3
7	CH ₃	H	0,45
8	H	CH ₃	0,09
9	3-NO ₂ -C ₆ H ₄ -CONH	H	0,074

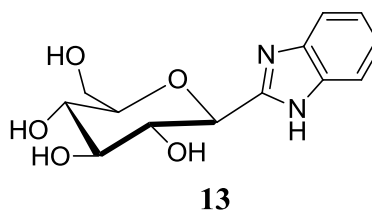
3. táblázat: Ftálsav származékok GP gátlása^[10] (IC₅₀ [μM])

- Új allosztérikus (indol) kötőhely a két alegység összekapcsolódásánál található a központi üregben. A vizsgálatok szerint az indol típusú vegyületek ehhez a kötőhelyhez kapcsolódva fejt ki hatásukat. Ezek közül néhánynak a szerkezete és IC₅₀ értékei láthatóak a 4. táblázatban.

	
Ar ¹	IC ₅₀ (μM), HLGPα
 10	0,051
 11	0,017
 12	0,005

4. táblázat: Az új allosztérikus hely inhibitorai^[11]

- Benzimidazol kötőhely az allosztérikus és új allosztérikus (indol) kötőhelytől és az aktív centrumtól is azonos 31-32 Å távolságra helyezkedik el az enzim felületén. Eddig egyetlen 2-(β-D-glükopiranozil)-benzimidazol (**13**) kapcsolódását figyelték meg.^[6, 7]



2.5. Glikogéntárolási betegségek

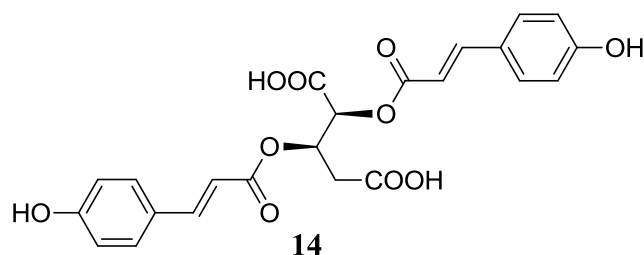
A glikogén foszforiláz enzim gátlása során, mint azt a bevezetőben is említettük a glikogéntárolás/lebontás befolyásolható, amin keresztül lehetőség van a vércukorszint befolyásolására is. Ezen alfejezetben azon betegségeket tekintjük át, melyek a glikogéntárolás/lebontás rendellenes működéséből fakadnak, ^[3] így a GP enzim gátlása során figyelni kell, hogy elkerüljük ezen betegség tüneteinek a kialakulását.

1. *Von Gierke-kor*: A betegség hátterében a glükóz 6-foszfátáz hiánya áll, aminek következtében a glikogén nem tud lebomlani, a máj glikogénnel telített. Súlyos hypoglykaemia, májmegnagyobbodás, laktacidózis, ketózis, hiperurikémia és a hiperlipémia lép fel.
2. *McArdle-szindróma*: Az izom glikogén-foszforiláz hiánya miatt alakul ki. Hiába magas az izom glikogéntartalma, a betegek képtelenek izommunkára. Az izomglikogén nem tudja fedezni az izomsejt energiaszükségletét. A GP enzim gátlása esetén fontos, hogy az előállított inhibitor molekula megfelelő szelektivitással rendelkezzen a máj GP enzim felé, így meggátolva ezen betegség kialakulását.
3. *Andersen-betegség*: Extrém módon ritka örökletes anyagcsere megbetegedés. Az amylo-1:4,1:6-transzglukozidáz enzim hiánya felelős a betegség kialakulásáért. A glikogénszintézist érinti, abnormális glikogén, amilopektin akkumuláció figyelhető meg a májban és a szívben. A betegség az első életévben halálos.

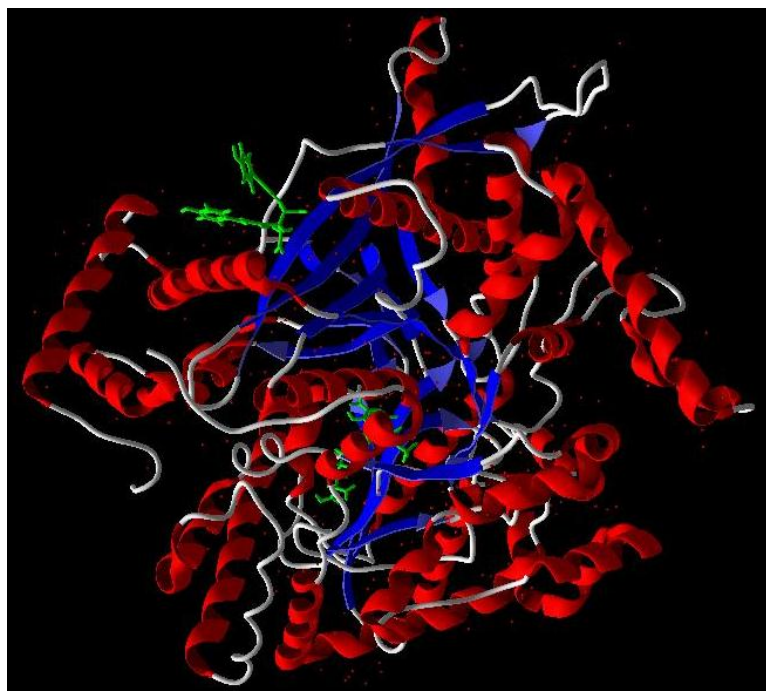
3. Saját vizsgálatok

3.1. Célkitűzés

A természetes eredetű biológiailag aktív vegyületek számos esetben szolgáltak gyógyszerhatóanyagok kidolgozásánál vezérmolekulaként. Furukawa és munkatársai az No.138354 gombából izolálták az FR258900 jelű molekulát (**14**), amely hatékonyan gátolja az emberi májból (HLGP) és a nyúl vázizomból (RMGP) izolált glikogén foszforiláz enzimeket.^[12,13]



A természetes vegyület és az enzim röntgen diffrakciós vizsgálat kimutatta, hogy a vegyület az enzim allosztérikus kötőhelyéhez kapcsolódik, és a kötődésben a karboxil csoportoknak kitüntetett szerepe van. A fahéjsav oldalláncok közül a C-2 szubsztituens az enzim felszínéből kifelé áll, így jelentős szerepe a kötődésben csak a C-3 oldalláncnak van.^[14]

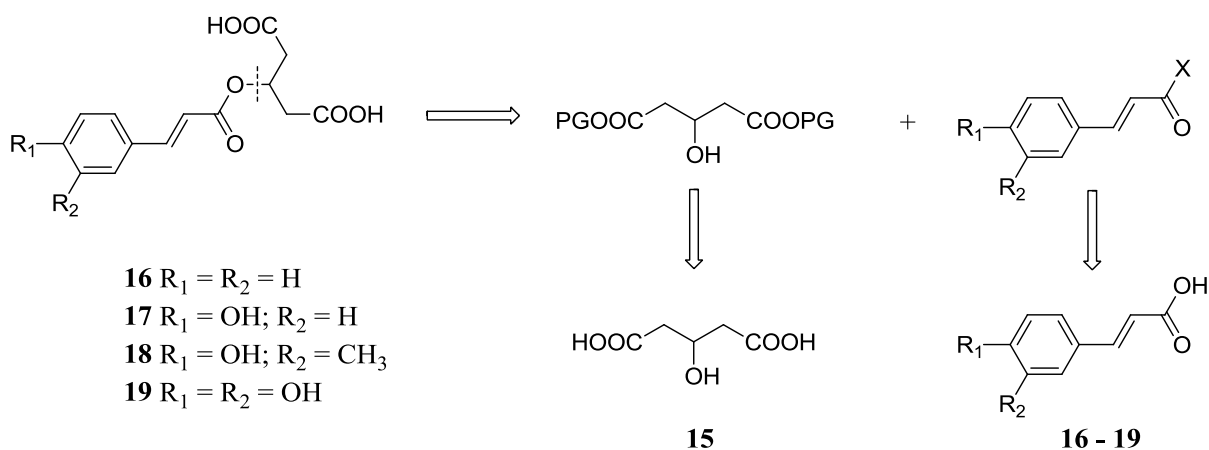


FR258900 enzim komplexe

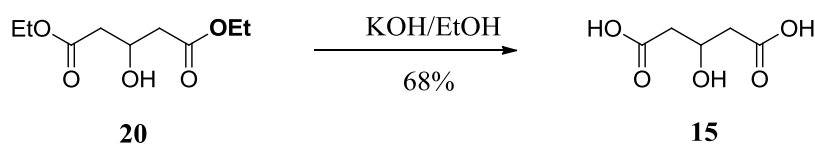
A munkám célja az volt, hogy a természetes vegyület olyan analogonjait állítsam elő, melyek a C-2 atomon nem tartalmaznak szubsztituenst. Ezen vegyületek biológiai vizsgálata lehetővé teszi a C-2/C-3 helyzetben lévő csoportok a kötődésre és ez által az inhibícióra gyakorolt hatásának a vizsgálatát. Cél volt továbbá a fahéjsav egység szubsztituens hatásának a vizsgálata, így különbözőképpen szubsztituált fahéjsav származékokkal kívántuk elvégezni a kísérleteinket.

3.2. Szintézisterv és a DPM védett 3-hidroxi-pentándisav előállítása

A célvegyületeink előállítására használható szintézistervet a következő ábrán mutatjuk be:



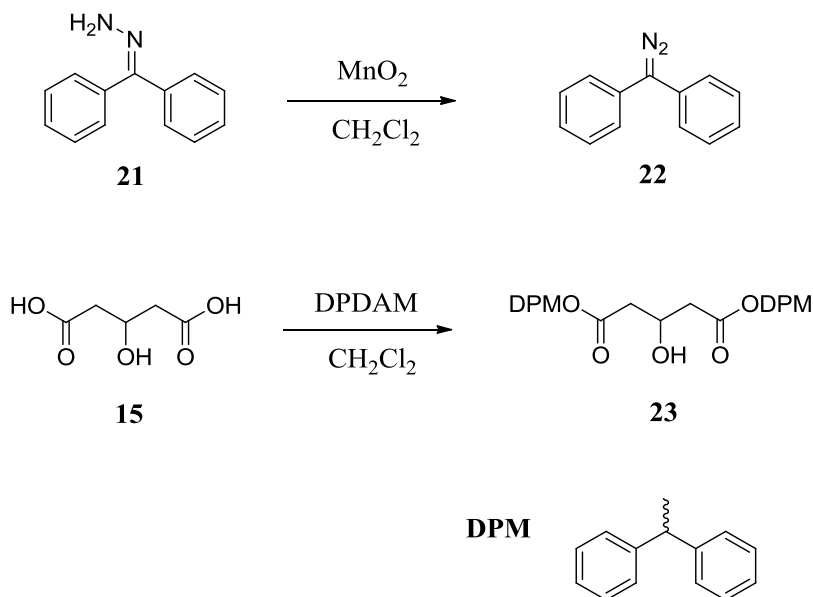
Az analogonok előállításához szükséges 3-hidroxi-pentándisav (**15**) a kereskedelemben nem kapható, csak a dietil észter (**20**) származéka. Mivel az etil észter hasítása szelektíven nem valósítható meg más típusú észter funkció mellett (fahéjsav észter) ezért a szintézis első feladata e funkciónak a konvertálása volt egy szelektíven eltávolítható védő csoporttá. Murphy és munkatársai 2009-ben közölték, hogy a 3-hidroxi-pentándisav (**15**) laktonizáció nélkül előállítható a megfelelő észter származék (**20**) lúgos hidrolízisével. Megismételtük az irodalomban leírt eljárást, és a kívánt származékot (**15**) jó hozammal izoláltuk (68 %).



E származék (**15**) továbbalakítása előtt a karboxil csoportot egy könnyen eltávolítható védőcsoporttal kellett átmenetileg blokkolni. A kutatócsoportunkban a természetes vegyület

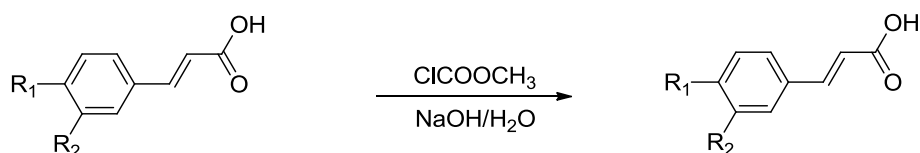
(14) más típusú analogonjainak előállítása során korábban azt tapasztalták, hogy difenilmetil észter (DPM) szelektíven hasítható egyéb észter funkció mellett, ezért mi is e védőcsoport alkalmazását láttuk célszerűnek.

A difenilmetil észter kialakításához a **15** dikarbonsavat reagáltattuk a benzofenon-hidrazonból (**21**) diklórmétánban aktivált MnO_2 jelenlétében *in situ* generált difenildiazometánnal (**22**, DPDAM), és a kívánt védett észter származékot (**23**) közepes hozammal kaptuk (38 %).



Ezen észterképzés lefutását a difenildiazometán színének (mély bíbor) eltűnése jelzi, azonban ezen karbonsavszármazék esetében a reakcióidő növelésével sem tudtuk növelni a konverziót, és ezáltal a hozamot. Az így előállított védett észter (**23**) már alkalmas volt arra, hogy a megfelelő fahéjsav származékokkal reagáltatva előállítsuk a célvegyületeinket.

A **23** karbonsavszármazék szabad hidroxil csoportját különböző fahéjsav származékokkal (**16** - **19**) történő acilezéssel kívántuk átalakítani. Ehhez a fahéjsav (**16**) kivételével a 4-hidroxi fahéjsav (**17**), a ferulesav (**18**) és kávésav (**19**) fenolos hidroxil csoportjait kellett védenünk, melyre a metoxikarbonil csoportot találtuk a legalkalmasabbnak. Választásunk azért esett erre a védőcsoportra, mivel kialakítása egyszerű, és szelektív eltávolítására is számtalan lehetőség kínálkozik.^[15]

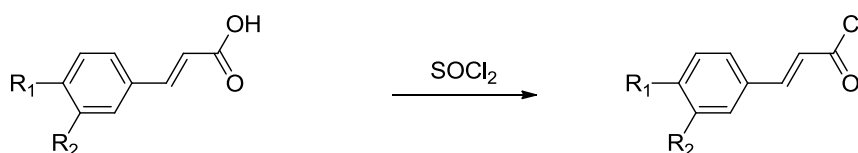


17 $R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{H}$
18 $R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{OCH}_3$
19 $R_1 = R_2 = \text{OH}$

24 $R_1 = \text{OCOCH}_3; R_2 = \text{H}$
25 $R_1 = \text{OCOCH}_3; R_2 = \text{OCH}_3$
26 $R_1 = R_2 = \text{OCOCH}_3$

A **17** – **19** fahéjsav származékokat 1M NaOH oldatban oldottuk, és 1,5 - 2,5 ekvivalens metil-klórformiátot adtunk az oldatokhoz 0° C-on. A reakcióelegyeket ezen a hőmérsékleten kevertetve a védett származékok (**24** - **26**) kristályos formában kiváltak az oldatból. Szűrés és szárítás után további tisztítás nélkül reagáltattuk tovább őket.

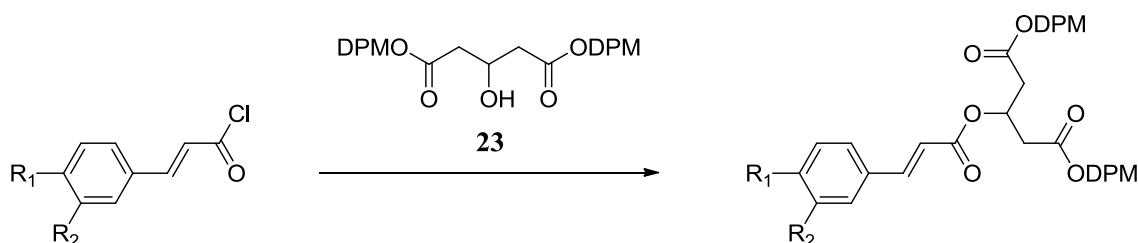
Először tionil-kloridban oldottuk a karbonsavakat (**16**, **24** - **26**) és forraltuk az elegyeket 1,5 órán keresztül, majd a fölös tionil-kloridot vákuumban eltávolítottuk.



16 $R_1 = R_2 = \text{H}$
24 $R_1 = \text{OCOCH}_3; R_2 = \text{H}$
25 $R_1 = \text{OCOCH}_3; R_2 = \text{OCH}_3$
26 $R_1 = R_2 = \text{OCOCH}_3$

27 $R_1 = R_2 = \text{H}$
28 $R_1 = \text{OCOCH}_3; R_2 = \text{H}$
29 $R_1 = \text{OCOCH}_3; R_2 = \text{OCH}_3$
30 $R_1 = R_2 = \text{OCOCH}_3$

Az így nyert sav-kloridokkal (**27** - **30**) acileztük a **23** karbonsavszármazékot. A **23** észter vízmentes toluolban készült oldatához vízmentes piridint, és a megfelelő sav-kloridokat adtuk, és szobahőmérsékleten kevertettük a reakcióelegyet.



27 $R_1 = R_2 = \text{H}$
28 $R_1 = \text{OCOCH}_3; R_2 = \text{H}$
29 $R_1 = \text{OCOCH}_3; R_2 = \text{OCH}_3$
30 $R_1 = R_2 = \text{OCOCH}_3$

31 $R_1 = R_2 = \text{H}$
32 $R_1 = \text{OCOCH}_3; R_2 = \text{H}$
33 $R_1 = \text{OCOCH}_3; R_2 = \text{OCH}_3$
34 $R_1 = R_2 = \text{OCOCH}_3$

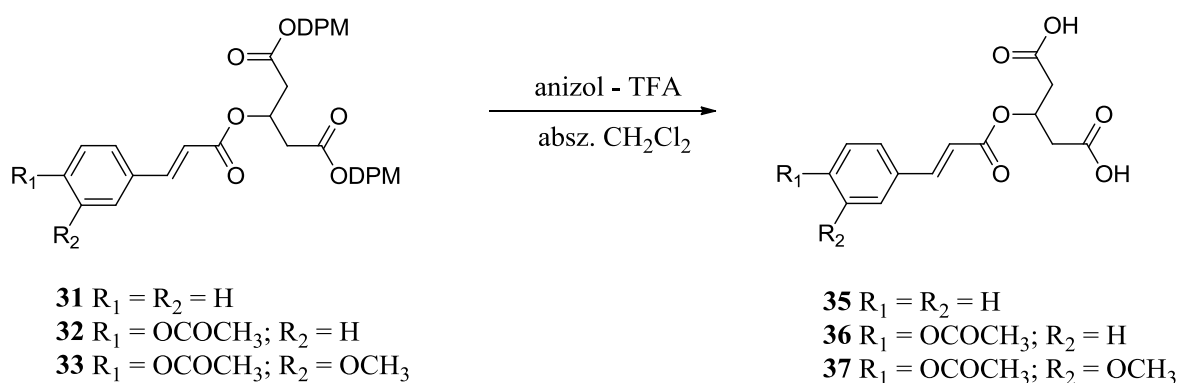
Az acilezési reakciókat vékonyréteg-kromatográfián követtük, és amikor azt tapasztaltuk, hogy a reakció megállt, az oldószert rotációs vákuumbepárlón eltávolítottuk, és a nyerstermékeket oszlopkromatográfián tisztítottuk. A kívánt származékokat kiváló (**33**: 89 %), jó (**31**: 65 %) és alacsony hozammal (**32**: 27 %; **34**: 31 %) tudtuk izolálni.

	Hozam (%)
31	65
32	27
33	89
34	31

A **32** és **34** vegyületek esetében (szemben a fahéjsavval) már a reakció előrehaladása során tapasztaltuk a sav-klorid jelentős hidrolízisét, amit vízmentes körülmények szigorú betartásával sem tudtunk csökkenteni.

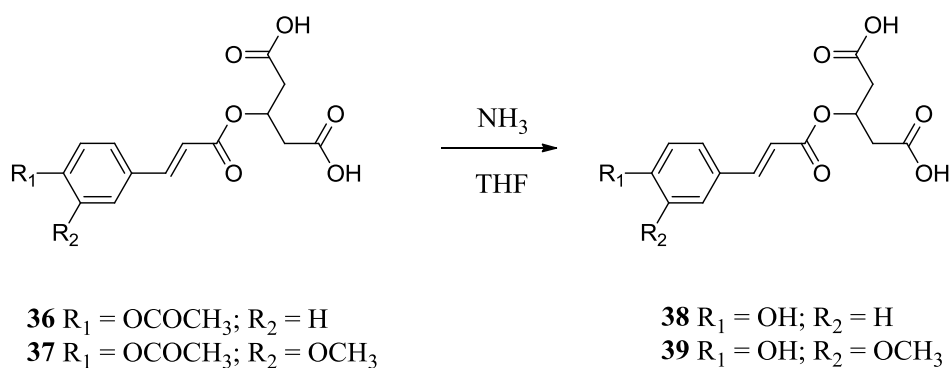
A következő lépésben a védőcsoportok eltávolítását kellett megvalósítanunk. A korábban a kutatócsoportban végzett szintézisek során kiderült, hogy először a difenilmetil észter eltávolítása a célszerű, amit követ a metoxikarbonil csoport hasítása.

A difenilmetil észter hasítását vízmentes diklórmétánban vízmentes anizol és trifluorecetsav jelenlétében végeztük. A kiindulási anyag teljes átalakulását követően a nyers termékeket oszlopkromatográfiás módszerrel tisztítottuk. A kívánt termékeket közepes hozammal (65 %, 50 %, 63 %) izoláltuk.



	Hozam (%)
35	65
36	50
37	63

A metoxikarbonil védőcsoport eltávolítása során tetrahidrofuránban oldottuk fel az anyagainkat és 25 %-os ammóniát adtunk a reakcióelegyekhez. A védőcsoport eltávolítását követően a végtermékek kiváltak az oldatból, melyeket kiszűrtünk és vízzel mostunk, és így a végtermékeket (**38**, **39**) jó, kiváló hozammal (72 % és 97 %) izoláltuk.



Hozam (%)	
38	72
39	97

A **39** vegyület NMR vizsgálatai során anomális viselkedést tapasztaltunk a vegyület C-NMR spektrumában, mivel a C-2; C-3 és C-4 szén jelei a spektrumban nem jelentek meg. Mivel hasonló származékok esetében már máskor is tapasztaltunk ilyen anomáliákat, ezért a vegyület szerkezetét szililezés után GCMS vizsgálatokkal is igazoltuk.

A **34** származék védőcsoportjainak eltávolítása folyamatban vannak.

3.3. Biológiai vizsgálatok és hatás-szerkezet összefüggés vizsgálatok

Vegyületeink glikogén foszforiláz inhibitor aktivitását a Debreceni Egyetem Orvosi Vegytani Intézetében vizsgálták. Várakozásainkkal ellentétben azonban mind három végterméknél (35, 38, 39) azt tapasztalták, hogy 625 μM koncentrációban sem gátolják jelentősen az enzim aktivitását.

Önmagában tekintve ez az eredmény nem felel meg a várakozásainknak, azonban a kutatócsoportunkban előállított hasonló típusú vegyületek eredményeivel összehasonlítva a szerkezet-hatás összefüggéseket kiegészíti. A munkánk kezdetén a kiindulópontunk az volt, hogy a C-2 szénatomon lévő szubsztituens, mivel az enzim felszínéből kifelé helyezkedik el, a kötődésben nem játszik szerepet. Ezen vizsgálatok azt mutatják, hogy ennek ellenére a szubsztituens hiánya a hatás elvesztését okozta.

Feltételezésünk szerint ennek a szubsztituensnek nem a szubsztrátnak az enzimhez való közvetlen kötődésében van szerepe, hanem a szubsztrát aktív konformációjának a kialakításában. Ezen kérdés eldöntése csak további vizsgálatokkal lehetséges. A szubsztrát konformációs viszonyainak tanulmányozása molekulamodellezéssel, konformáció eloszlás vizsgálatával lehetséges.

4. Kísérleti rész

A ^1H és ^{13}C NMR spektrumokat Bruker WP-360 készülékeken vettük fel, oldószerként CDCl_3 -t és DMSO-t használtunk TMS belső standarddal. A spektrumokon a kémiai eltolódásokat (δ) ppm-ben, a csatolási állandókat (J) Hz-ben adtuk meg. Az analitikai vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálatokhoz Kieselgel 60 F_{254} (Merck) lemezt, míg az oszlopkromatográfiás elválasztásokhoz Kieselgel 60 (Reanal) típusú szilikagélt alkalmaztunk. A vékonyréteg kromatogramokat melegítéssel, különböző előhívó szerekkel, valamint UV-fényben tettük láthatóvá. A reakciók feldolgozása során a szerves fázisokat izzított MgSO_4 -on szárítottuk. A vegyületek olvadáspontját Kofler készüléken mértük, és korrekció nélkül adtuk meg.

3-Hidroxipentándisav (15)

1,0 g (4,9 mmol) dietil-3-hidroxipentadioátot (**20**) oldottunk 10 cm^3 vízmentes etanolban és 0°C -on hozzáadtunk 550 mg (9,82 mmol) kálium-hidroxidot. A reakcióelegyet ezen a hőmérsékleten kevertettük 30 percig, majd hagytuk szobahőmérsékletűre felmelegedni, és 2 órán át kevertettük ezen a hőmérsékleten. Ezután az oldószert vákuumban eltávolítottuk, és a maradékot oldottuk 100 cm^3 vízben, és az oldat pH-ját tömény sósavval ~ 2 -re állítottuk be. Az oldatot etil-acetáttal extraháltuk ($3 \times 20\text{ cm}^3$) és az egyesített szerves fázisokat MgSO_4 felett szárítottuk, majd az oldószert szűrés után vákuumban eltávolítottuk. A terméket további tisztítás nélkül alakítottuk tovább.

Difenil-diazometán (22)

3,19 g benzofenon-hidrazon (**21**) (16,3 mmol) vízmentes diklórmetánnal (50 ml) készült oldatához, 7,82 g vízmentes magnézium-szulfátot (65,2 mmol) adtunk és 30 percig 0°C -on kevertettük. Ezután az oldathoz 5,66 g (65,2 mmol) aktivált mangán dioxidot adtunk és 0°C -on kevertettük. A diazovegyület (**22**) keletkezését az intenzív lila szín megjelenése jelezte. 4 óra múlva az elegyet szűrtük, és a difenil-diazometán oldatát azonnal felhasználtuk.

^1H -NMR: (DMSO); δ (ppm): 2,21 – 2,42 (4H, m, H-2; H-4); 4,18 (1H, m, H-3); 4,88 (1H, bs, OH); 12,18 (2H, bs; COOH)

Bisz(difenilmetil)-3-hidroxipentándioát (23)

A 1,0 g (6,75 mmol) 3-hidroxipentándisav (15) oldottunk a 80 cm³ 2,2 ekvivalens difenildiazometánt tartalmazó vízmentes diklórmetánban és szobahőmérsékleten kevertettük, míg az oldat intenzív színe el nem tűnt (3 – 5 nap). Ezután az oldószert vákuumban eltávolítottuk, majd a visszamaradt szilárd anyagot hexánnal mostuk. A termék fehér kristályos anyag, amit további tisztítás nélkül alakítottunk tovább. 1,017 g (32 %), Op.: 102-105 °C.

¹H-NMR: (CDCl₃); δ (ppm): 2,62 – 2,76 (4H, m, H-2; H-4); 3,3 (1H, d, J = 3,6 Hz? OH); 4,56 (1H, m, H-3); 6,95 (2H, s, CHPh₂); 7,2 – 7,4 (20H, m, Ph)

¹³C NMR (CDCl₃); δ (ppm): 40,81 (C-2; C-4); 64,90 (C-3); 77,34 (CHPh₂); 126,96; 127,03; 127,98; 128,49; 139,73 (aromás szenek); 170,67 (C=O)

Általános előírat fenolos hidroxilcsoportok metoxikarbonilezésére

10 mmol fenolt oldunk 10 cm³ 1 M NaOH oldatában és jeges hűtés közben hozzá csepegtetünk 1,5 – 2,5 ekvivalens metil-klórformiátot. Tovább folytattuk a kevertetést szobahőmérsékleten, és másnap a kivált terméket szűrtük, vízzel mostuk, majd légszárítást követően további tisztítás nélkül alakítottuk tovább.

(2E)-3-{4-[(metoxikarbonil)oxi]phenil}prop-2-énsav (24)

8,0 g (48 mmol) 4-hidroxifahéjsavból (17) kiindulva az általános előírat szerint 9,38 g (86,6 %) fehér kristályos anyagot kaptunk (op.: 92 – 94 °C).

(2E)-3-{3-metoxi-4-[(metoxikarbonil)oxi]phenil}prop-2-énsav (25)

2,0 g (10,3 mmol) ferulesavból (18) kiindulva az általános előírat szerint 2,07 g (80 %) fehér kristályos anyagot kaptunk.

(2E)-3-{3,4-bisz[(metoxikarbonil)oxi]phenil}prop-2-énsav (26)

3,6 g (20 mmol) kávéssavból (19) kiindulva az általános előírat szerint 4,32 g (73 %) kristályos anyagot kaptunk.

Általános előírat sav-kloridok előállítására (A)

20 mmol karbonsavat tionil-kloriddal (20 cm³) készült oldatát forraltuk 3 órán át. Ezután lehűtöttük az oldatot, és a tionil-klorid feleslegét vákuumban eltávolítottuk. 2 x 5 cm³ vízmentes toluolt húztunk le vákuumban a nyers sav-kloridról, amit ezután további tisztítás nélkül alakítottunk tovább.

Általános előírat a bisz(difenilmetil-3-hidroxi-pentándioát (23) acilezéséhez (B)

2 mmol **23** észter származékot oldottunk vízmentes toluolban (10 cm³), és 2,2 mmol sav-kloridot és 1,2 ekvivalens vízmentes piridint (vagy DMAP-t) adtunk a reakcióelegyhez. A reakciót vékonyréteg-kromatográfiásan követtük. Miután a reakciókban nem tapasztaltunk további átalakulást, a reakcióelegyet mostuk 1 M sósav oldattal (3 x 10 cm³), és vízzel (2 x 10 cm³). A szerves fázist MgSO₄ felett szárítottuk, majd az oldószer bepárlása után kapott nyersterméket oszlopkromatográfiásan tisztítottuk.

Bisz(difenilmetil) 3-[(2E)-3-fenilprop-2-enoil]oxi}pentándioát (31)

32 mg (0,21 mmol) fahéjsavból (**16**) az általános előírat alapján előállítottuk a megfelelő sav-kloridot (**27**), majd vízmentes toluolban oldottuk (2 cm³) és hozzáadtunk 1,2 ekvivalens DMAP-t majd 94 mg (0,19 mmol) védett észter származékot (**23**) és szobahőmérsékleten kevertettük. A reakció feldolgozása, és a termék tisztítása a **B** általános előírat szerint történt. A tisztításhoz hexán – etil-acetát = 6:1 eluenst használtunk. A termék sárga színű kristályos anyag (74 mg; 65 %; Op.: 91-95 °C).

¹H-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 2,96 – 2,99 (4H, m, H-2; H-4) ; 5,78 – 5,82 (1H, m, H-3); 6,25 (1H, s, J = 16,0 Hz, H-2'); 6,96 (2H, s, CHPh₂); 7,33 (25H, m, 5 x Ph) ; 7,59 (2, d, J = 16,0 Hz, H-3').

¹³C-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 38,54 (C-2; C-4); 67,09 (C-3); 77,48 (CHPh₂); 117,40 (C-2'); 127,06; 127,91; 127,94; 128,16; 128,48; 128,79; 130,36; 134,15; 139,78 (aromás szenek); 145,35 (C-3'); 165,68; 168,79 (C=O).

Bisz(difenilmetil) 3-[[[(2E)-3-{4-[(metoxikarbonil)oxi]fenil}prop-2-enoil]oxi}pentándioát (32)

210 mg (0,92 mmol) fahéjsav származékából (**24**) az általános előírat alapján előállítottuk a megfelelő sav-kloridot (**28**), majd vízmentes toluolban oldottuk (20 cm³) és hozzáadtunk 1,2 ekvivalens DMAP-t majd 400 mg (0,83 mmol) védett észter származékot (**23**) és szobahőmérsékleten kevertettük. A reakció feldolgozása, és a termék tisztítása a **B** általános előírat szerint történt. A tisztításhoz hexán – etil-acetát = 4:1 eluent használtunk. A termék fehér kristályos anyag (147 mg; 27 %; Op.: 97 – 102 °C).

¹H-NMR (CDCl₃) δ ppm: 2,89 (4H, s, H-2, H-4); 3,88 (3H, s, OCH₃); 5,73 (1H, m, H-3); 6,12 (1H, d, J = 16,0 Hz, H-2'); 6,89 (2H, s, CHPh₂); 7,18 - 7,32 (23H, m, 4 x Ph, H-3'', H-5''); 7,41 (2H, d, J = 8,2 Hz, H-2''); H-6''); 7,50 (1H, d, J = 16,0 Hz, H-3').

¹³C-NMR (CDCl₃) δ ppm: 38,32 (C-2; C-4); 55,30 (OCH₃); 66,98 (C-3); 77,16 (CH(Ph)₂); 117,57 (C-2'); 121,25 (C-3''; C-5''); 128,31 (4xPh); 131,91 (C-2''; C-6''); 139,59 (C-3'); 152,25 (C-4''); 153,63 (C-1''); 165,30 (C-1'); 168,58 (C-1; C-5).

Bisz(difenilmetil) 3-[[[(2E)-3-{3-metoxi-4-[(metoxikarbonil)oxi]fenil}prop-2-enoil]oxi}pentándioát (33)

155 mg (0,6 mmol) fahéjsav származékából (**25**) az általános előírat alapján előállítottuk a megfelelő sav-kloridot (**29**), majd vízmentes toluolban oldottuk (5 cm³) és hozzáadtunk 1,2 ekvivalens piridint majd 260 mg (0,54 mmol) védett észter származékot (**23**) és szobahőmérsékleten kevertettük. A reakció feldolgozása, és a termék tisztítása a **B** általános előírat szerint történt. A tisztításhoz hexán – etil-acetát = 3:1 eluent használtunk. A termék sárga olaj (340 mg, 89 %; Rf: 0,63; eluens: hexán : etil-acetát = 1 : 1).

¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 2,72 – 2,89 (4H, m, H-2, H-4); 3,78 (3H, s, OCH₃); 3,83 (3H, s, OCH₃); 5,60 – 5,70 (1H, m, H-3); 6,06 (1H, d, J = 16,0 Hz, H-2'); 6,81 (2H, s, CH(Ph)₂); 6,92 (1H, d, J = 2,3 Hz, H-2'') 6,93 (1H, dd, J = 7,2 és 2,3 Hz, H-6''); 7,06 (1H, d, J = 7,2 Hz; H-4''), 7,09 – 7,26 (20H, m, Ph); 7,41 (2H, d, J = 16,0 Hz, H-3').

Bisz(difenilmetil) 3-[[[(2E)-3,4-bisz[(metoxikarbonil)oxi]fenil}prop-2-enoil]oxi}pentándioát (34)

544 mg (0,6 mmol) fahéjsav származékából (**26**) az általános előírat alapján előállítottuk a megfelelő sav-kloridot (**30**), majd vízmentes toluolban oldottuk (10 cm³) és hozzáadtunk

1,2 ekvivalens piridint majd 800 mg (0,54 mmol) védett észter származékot (**23**) és szobahőmérsékleten kevertettük. A reakció feldolgozása, és a termék tisztítása a **B** általános előírat szerint történt. A tisztításhoz hexán – etil-acetát = 2:1 eluent használtunk. A termék sárga olaj (398 mg, 31 %).

¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 2,86 – 3,03 (4H, m, H-2, H-4); 3,91 (3H, s, OCH₃); 3,92 (3H, s, OCH₃); 5,71 – 5,86 (1H, m, H-3); 6,14 (1H, d, J = 16,0 Hz, H-2'); 6,95 (2H, s, CH(Ph)₂); 7,15 – 7,42 (23H, m, Ph); 7,47 (2H, d, J = 16,0 Hz, H-3').

Általános előírat difenilmetil védőcsoport eltávolítására

A védett észter származék (1 mmol) vízmentes diklórmetánban (2 cm³) készült oldatához 0,21 cm³ (1,88 mmol, 7 eq.) vízmentes anizolt adtunk, és az elegyet kevertettük 0 °C-on 30 percig. Ezután 0,51 cm³ (6,72 mmol, 25 eq.) trifluorecetsavat adtunk a reakcióelegyhez, és vékonyréteg-kromatográfián követtük a reakció előrehaladását. A kiindulási anyag átalakulása után a reakcióelegyet bepároltuk, és oszlopkromatográfián tisztítottuk (eluens: toluol : ecetsav = 3 : 1).

3-[(2E)-3-fenilprop-2-enoil]oxi}pentándisav (35**)**

0,1g (0,16 mmol) **31** észter származékból kiindulva az általános előírat alapján 29 mg (65 %; Op.: 166 – 170 °C) fehér kristályos terméket kaptunk.

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 2,58 – 2,76 (4H, m, H-2; H-4) ; 5,40 – 5,52 (1H, m, H-3); 6,57 (1H, s, J = 16,0 Hz, H-2'); 7,35 – 7,47 (3H, m, aromás hidrogének); 7,62 (2, d, J = 16,0 Hz, H-3'); 7,66 – 7,74 ((2H, m, aromás hidrogének).

¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 38,37 (C-2; C-4); 67,59 (C-3); 118, 30 (C-2'); 128,60; 129,21; 130,83; 134,04; (aromás szén); 145,13 (C-3'); 165,58; 171,54 (C=O).

3-[(2E)-3-{4-[(metoxikarbonil)oxi]fenil}prop-2-enoil]oxi}pentándisav (36**)**

0,5g (0,73 mmol) **32** észter származékból kiindulva az általános előírat alapján 130 mg (50 %) fehér kristályos terméket kaptunk. (Op.: 120 – 122 °C).

¹H-NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 2,37 – 2,48 (4H, m, H-2, H-4) ; 3,54 (3H, s, OCH₃); 5,20 – 5,32 (1H, m, H-3); 6,13 (1H, d, J = 16,0 Hz, H-2'); 6,88 (2H, d, J = 8,6 Hz, H-3''; H-5''); 7,28 (2H, d, J = 8,6 Hz, H-2'', H-6''), 7,32 (1H, d, J = 16,0 Hz, H-3')

^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ (ppm): 29,68 (C-2; C-4); 46,60 (OCH₃); 59,48 (C-3); 109,36 (C-1'); 113,24 (C-3''; C-5''); 121,06 (C-2''; C-6''); 124,06 (C-1''); 135,80 (C-3'); 144,57 (C-4''); 145,62 (OCOOCH₃); 157,93; 164,27 (C=O)

3-[(2E)-3-{3-metoxi-4-[(metoxikarbonil)oxi]fenil}prop-2-enoil]oxi}pentándisav (37)

2,0 g (2,8 mmol) **33** észter származékból kiindulva az általános előírat alapján barna olajat kaptunk (0,28 g, 26 %, Rf: 0,43; eluens : toluol : ecetsav = 3 : 1).

^1H -NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 2,71 – 2,87 (2H, m, H-2, H-4); 3,87 (3H, s, OCH₃); 3,88 (3H, s, OCH₃); 5,56 – 5,70 (1H, m, H-3); 6,52 (1H, d, J = 16,0 Hz, H-2') ; 7,08 – 7,22 (2H, m, H-5'', H-6'') 7,32 (1H, s, H-2''); 7,65 (1H, d, J = 16,0 Hz, H-3').

^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ (ppm): 29,63 (C-2; C-4); 46,71 (OCH₃); 47,09 (OCH₃); 59,43 (C-3); 103,34 (C-2'); 109,76; 112,89; 114,26; 125,49; 133,57; 143,45 (aromás szenek); 136,22 (C-3'); 145,62; 157,97; 164,21 (C=O)

Általános előírat a metoxikarbonil védőcsoport eltávolításához

10 mmol védett származék 5 ml tetrahidrofuranban készült oldatához 10 ml 25%-os ammónia oldatot adtunk, majd 12 órán át szobahőmérsékleten kevertettük a reakcióelegyet. A reakciót vékonyréteg-kromatográfiásan (toluol – ecetsav = 3 : 1) követtük, és a kiindulási anyag teljes átalakulása után a reakcióelegyet bepároltuk, és maradékot hexánnal mostuk.

3-{[3-(4-hidroxifenil)propanoil]oxi}pentándisav (38)

0,1g (0,28 mmol) **36** dikarbonsavból kiindulva az általános előírat alapján 60 mg (72 %) fehér kristályos anyagot kaptunk (op: 162 – 165 °C).

^1H NMR (CDCl₃): 2,50 (4H, s, H-2, H-4); 5,34 (1H, m, H-3); 6,27 (1H, d, J = 15,7 Hz; H-2'); 6,78 (2H, d, J = 8,8; Hz, H-3'', H-5''); 7,49 (2 H, d, J = 8,8 Hz, H-2'', H-6''); 7,48 (1H, d, J = 15,7 Hz; H – 3')

^{13}C NMR (CDCl₃): 114,38 (C-2'); 115,94; 124, 70; 130,21 (aromás szenek); 144, 55 (C-3'); 160,44; 165,98 (C=O)

GCMS (szililezett származék): M^+ : 510,3 (M + 3 x TMS)

3-[[**(2E)**-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)prop-2-enoil]oxi}pentándisav (**39**)

1,0 g (2,62 mmol) **37** dikarbonsavból kiindulva az általános előírat alapján 827 mg (97 %) fehér kristályos anyagot kaptunk (op: 140 – 142 °C)

¹H NMR (360 MHz, CDCl₃) δ ppm: 2,35 (4H, m, H-2, H-4); 3,77 (3H, s, OCH₃) ; 5,34 (1H, m, H-3); 6,32 (1H, d, J = 15,9 Hz, H-2'); 6,49 (1H, brs, OH); 6,79 (1H, d, J = 8,1 Hz, H-6''); 7,07 (1H, d, J = 8,1 Hz, H-6''); 7,29 (1H, s, H-3'); 7,48 (1H, d, J = 15,9 Hz, H-3').

¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 42,14 (C-2; C-4); 55,68 (OCH₃); 70,75 (C-3); 111,04 (C-2'); 114,90; 115,72; 123,24; 125,04; 148,38; 150,43 (aromás szenek); 144,66 (C-3'); 166,25; 173,89; 174,34 (C=O).

5. Összefoglalás

A természetes eredetű biológiailag aktív vegyületek számos esetben szolgáltak gyógyszerhatóanyagok kidolgozásánál vezérmolekulaként. Furukawa és munkatársai az No.138354 gombából izolálták az FR258900 (**14**) jelű molekulát, amely hatékonyan gátolja az emberi májból (hlGP) és a nyúl vázizomból (rmGP) izolált glikogén foszforiláz enzimeket.

A munkám célja volt a szerkezet-hatás összefüggés vizsgálatok kiterjesztéséért a természetes vegyület a C-2/C-3 szubsztituenseiknek a kötődésre és ez által az inhibícióra gyakorolt hatásának a vizsgálata. E cél érdekében a természetes vegyület olyan analogonjainak a szintézisét terveztük, melyekben a C-2 hidroxilcsoport hiányzik, így tanulmányozhatjuk ezen szubsztituens hiányának hatását a kötődésre, inhibícióra.

Az analogonok előállításához szükséges 3-hidroxipentándisav (**15**) a kereskedelembe nem volt kapható, azonban a **20** dietil észter származék lúgos hidrolízissel laktonizáció nélkül jó hozammal (68 %) a **15** dikarbonsavvá alakítható.

15 dikarbonsavat a benzofenon-hidrazonból (**21**) *in situ* generált difenildiazometánnal (**22**, DPDAM) reagáltatva közepes hozammal (38 %) a **23** észter származékká alakítottuk.

A **22** karbonsavszármazék szabad hidroxilcsoportját különböző fahéjsav származékokkal (**16** - **19**) történő acilezéssel kívántuk átalakítani. Ehhez a fahéjsav (**16**) kivételével a 4-hidroxifahéjsav (**17**), ferulesav (**18**) és a kávéssav (**19**) fenolos hidroxilcsoportjait metoxikarbonil csoporttal védtük, és az így nyert származékokból (**16**, **24-26**) előállított sav-kloridokkal (**27-30**) acileztük a **23** karbonsavszármazékot. A kívánt termékeket kiváló (**33**: 89 %), jó (**31**: 65 %) és alacsony hozammal (**32**: 27 %; **34**: 31 %) izoláltuk. E két utóbbi esetben a reakciókörülmények további optimalizálásával előreláthatólag növelhető a reakciók kitermelése.

A **31** – **33** vegyületek védőcsoportjainak eltávolításával előállított származékok (**35**, **38**, **39**) és a hozzájuk vezető intermedierek az irodalomban eddig nem ismert vegyületek, melyeknek új és hatékony szintézismódszerét dolgoztuk ki.

Vegyületeink glikogén foszforiláz inhibitor aktivitását a Debreceni Egyetem Orvosi Vegytani Intézetében vizsgálták. A végtermékeknél (**35**, **38**, **39**) azt tapasztalták, hogy 625 µM koncentrációban sem gátolják jelentősen az enzim aktivitását. Feltételezésünk szerint ennek a szubsztituensnek nem a szubsztrátnak az enzimhez való közvetlen kötődésében van szerepe, hanem a szubsztrát aktív konformációjának a kialakításában. Ezen kérdés eldöntése csak további vizsgálatokkal lehetséges. A szubsztrát konformációs viszonyainak tanulmányozása molekulamodellezéssel, konformáció eloszlás vizsgálatával lehetséges.

6. Summary

Naturally occurring biologically active compounds in several times served as a lead compound for drug discovery. FR258900 (**14**), as a natural product, was isolated from a fungi No.138354 by Furukawa and co-workers. This compound possessed enzyme inhibitor activity against human liver and rabbit muscle glycogene phosphorylase.

The goal of my thesis was the synthesis of analogues of **14** to study the structure – activity relationship of these types of compounds. In this project we wanted to study of the enzyme inhibitor activity of analogues in the absence of C-2 substituent.

The results of these works can be summarized as follows:

1. Commercially available diethyl 3-hydroxypentandioate (**20**) was transformed into **23** diphenylmethyl ester in a two-steps procedure. First, alkaline hydrolysis of **20** served unprotected carboxylic acid (**15**) in good yield (68 %), which was then transformed into **23** by diphenyldiazomethane (**22**) generated *in situ* from benzophenone-hydrazone in moderate yield (38 %).
2. Phenolic hydroxyl groups of cinnamic acid derivatives (**17** - **19**) were protected with methyl chloroformate in good yield. Carboxylic acid derivatives (**16**; **24** - **26**) were transformed into the corresponding acid-chloride (**27** - **30**) which were reacted with **23** diphenylmethyl ester. These compounds were isolated in moderate to excellent yields (**31**: 65 %; **32**: 27 %; **33**: 89 %, **34**: 31 %).
3. Cleavage of diphenylmethyl esters of **31** - **33** were carried out in dry CH₂Cl₂ in the presence of dry anisole and trifluoroacetic acid (TFA) in good yields (50 – 65 %).
4. Cleavage of methoxycarbonyl ester of **38** and **39** were carried out in the mixture of 25% aqueous solution of ammonia and THF in excellent yields (75 and 97 %).
5. Biological study of **35**, **38** and **39** clearly showed that - in contrast of X-ray structure of FR258900 and enzyme complex: the C-2 substituent does not bond to the enzyme – these compounds lost their biological activity in the absence of C-2 substituent. Our point of view that the substituent at C-2 play central role in the stabilization of active conformer of these types of compounds. The studies of the conformation equilibrium of these compounds are in progress.

7. Irodalomjegyzék

- [1] Kerpel-Fronius Sándor: Farmakoterápia ,**2008**, Medicina Könyvkiadó, 188.
- [2] Ádám Veronika: Orvosi biokémia, **2006**, Medicina Könyvkiadó, 126-134.
- [3] Gyires Klára, Fürst Zsuzsanna: Farmakológia, **2007**, Medicina Könyvkiadó, 767.
- [4] Tompa Anna: Népegészségtani ismeretek, **2008**, Semmelweis Kiadó, 249-250.
- [5] Somsák, L.; Bokor, É.; Czifrák, K.; Juhász, L.; Tóth, M. / Book 3, InTech Open Access Publisher, 2011. ISBN 979-953-307-129-8.
- [6] Somsák, L.; Czifrák, K.; Tóth, M.; Bokor, É.; Chrysina, E. D.; Alexacou, K.-M.; Hayes, J. M.; Tiraidis, C.; Lazoura, E.; Leonidas, D. D.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G., *Curr. Med. Chem.*,**2008**, 15, 2933-2983.
- [7] Oikonomakos, N. G. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2002**, 3, 561-586.
- [8] Watson, K. A.; Mitchell, E. P.; Johnson, L. N.; Cruciani, G.; Son, J. C.; Bichard, C. J. F.; Fleet, G. W. J.; Oikonomakos, N. G.; Kontou, M.; Zographos, S. E. *Acta Cryst.* **1995**, D51, 458-472.
- [9] Györgydeák, Z.; Thiem, J. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **2006**, 60, 103-182.
- [10] Kristiansen, M.; Andersen, B.; Iversen, L.F.; Westergaard, N. *J. Med. Chem.*,**2004**, 47, 3537-3545.
- [11] Whittamore PR, Addie MS, Bennett SN, Birch AM, Butters M, Godfrey L, Kenny PW, Morley AD, Murray PM, Oikonomakos NG, Otterbein LR, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16(21):5567-5571.
- [12] Furukawa, S.; Tsurumi, Y.; Murakami, K.; Nakanishi, T.; Ohsumi, K.; Hashimoto, M.; Nishikawa, M.; Takase, S.; Nakayama, O.; Hino M.; *J. Antibiot.*, **2005**, 58(8): 497–502.
- [13] Furukawa, S.; Murakami, K.; Nishikawa, M.; Nakayama, O.; Hino F.; *J. Antibiot.*, **2005**, 58(8): 503–506.
- [14] Tiraidis, C.; Alexacou, K.-M.; Zographos, S.E.; Leonidas, D.D.; Gimisis, T. Oikonomakos N.G.; *Protein Science*, **2007**, 16, 1773–1782.
- [15] Corr, M.J.; Roydhouse, M.D.; Gibson, K.F.; Zhou, S.; Kennedy, A.R.; Murphy, J.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 17980–17985.

8. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik segítségemre voltak e szakdolgozat elkészítésében:

Köszönettel tartozom *Prof. Dr. Patonay Tamás* tanszékvezető egyetemi tanárnak, aki lehetővé tette, hogy a szakdolgozatomat a Debreceni Egyetem Szerves Kémia Tanszékén készíthessem el.

Köszönettel tartozom *Prof. Dr. Somsák László* egyetemi tanárnak, aki lehetővé tette, hogy a szakdolgozatomat a kutatócsoportjában készíthessem el.

A legtöbb köszönettel témavezetőmnek, *Dr. Juhász László* egyetemi adjunktusnak tartozom, aki bevezetett a szerves kémiai kutatómunkába, munkámat irányította és értékes útmutatásaival, szakmai tapasztalatával segített a munkám során tapasztalt problémák megoldásában, valamint e dolgozat összeállításában.

Megköszönöm *Varga Gergely* doktorandusz hallgatónak, hogy napról-napra segítette munkámat tanácsaival és az NMR spektrumok felvételeivel és azok kiértékelésében nyújtott segítségével.

Köszönetemet fejezem ki az E-422 laboratórium összes dolgozójának és hallgatójának a produktív munkához nélkülözhetetlen jó hangulat megteremtéséért és a dolgozat elkészítéséhez nyújtott mindennapi segítségükért.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni a családomnak és a barátaimnak az elmúlt években nyújtott támogatást.