

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

Potenciálisan glikogén foszforiláz enzimgátló O-heterociklusok szintézise és farmakológiai vizsgálata

Synthesis and Pharmacological Analysis of O-Heterocyclic Compounds with Potential Glycogen Phosphorylase Enzyme Inhibitor Activity

Czakó Zoltán

Témavezető/ Supervisor: Dr. Antus Sándor



DEBRECENI EGYETEM
Kémia Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2011

1. Az értekezés előzményei és célkitűzései

A cukorbetegség (*Diabetes mellitus*) napjainkban egyre súlyosbodó problémát jelent a fejlett nyugati társadalmakban. A WHO adatai szerint mintegy 171 millió ember szenved ebben a betegségben. Az érintettek 90%-ának 2. típusú cukorbetegsége van. Az előrejelzések alapján a betegek száma 2030-ra elérheti a 366 millió főt is.

A cukorbetegség a szénhidrát anyagcsere krónikus betegsége, melynek jellemzője a magas vércukorszint (krónikus hyperglycaemia), közvetlen oka pedig az abszolút vagy relatív inzulinhiány.

Megjelenési formáját tekintve két főcsoportra osztható:

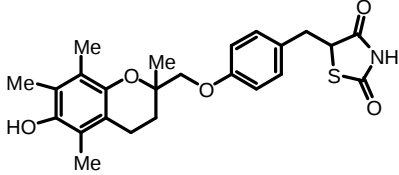
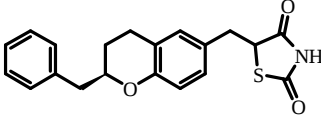
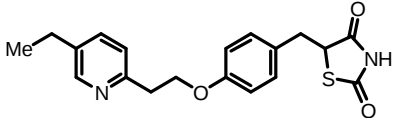
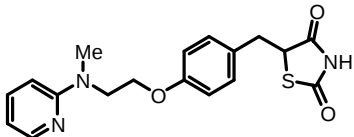
Az 1. típusú vagy inzulinfüggő *Diabetes mellitus* esetében a hasnyálmirigy β -sejtjeinek működése, és ezáltal az inzulin termelése csökken, szélsőséges esetben teljesen hiányzik, így nincs, ami elindítsa a sejtek glükóz felvételét és a glikogénszintézist. Leggyakrabban fiatal korban kezdődik, de alkalmanként előfordul felnőtteknél is. Inzulin adagolással a szervezet cukorháztartása egyensúlyban tartható.

A 2. típusú vagy nem inzulinfüggő *Diabetes mellitus* esetében a β -sejtek működnek, viszont a β -sejtek glükóz-érzékenysége, az inzulin-felszabadulás, valamint a szervek inzulin-érzékenysége romlik, végül inzulinrezisztencia lép fel. A szervezet szénhidrát egyensúlya inzulin adagolással nem tartható fent, csak diétával vagy pedig orális antidiabetikumok alkalmazásával.

A kialakult hyperglycaemia-rt elsősorban a máj megnövekedett glükóz-termelése a felelős, ami a glükoneogenezisre és a glikogénolízisre vezethető vissza.

Kezelésének egyik módja lehet, ha a glikogén foszforiláz (GP) enzim aktivitását valamelyik kórhelyhez kapcsolódó inhibitor molekulával csökkentjük. Az enzim aktivitásának gátlásával a glikogén lebontás visszaszorítható és ez a vércukorszint csökkenéséhez vezethet.

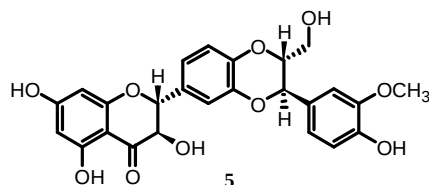
A nyolcvanas években számos inzulinrezisztenciát csökkentő tiazolidin-2,4-dion típusú vegyületet írtak le (**1. táblázat**).

Név	Szerkezet	Gyógyszergyár
Troglitazon (1)		Sankyo
Englitazon (2)		Pfizer
Pioglitazon (3)		Takeda
Rosiglitazon (4)		SmithKline-Beecham

1. táblázat

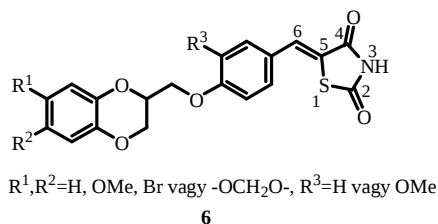
Később kiemelve a troglitazon (1), amely az USA-ban Rezulin[®] néven került forgalomba. 2000 márciusában azonban betiltották alkalmazását, mivel az Európai Unió bevezetése kapcsán kiderült, hogy a kezelt betegek 2%-ánál súlyos májkárosodást okozott.

A lilavirágmatyosbű (Silybum marianum) izolált, májvédő hatású (+)-szilibinnel (5) [Legalon[®], Madaus AG, Kín] kapcsolatos hatás-szerkezet összefüggés vizsgálatok azt mutatták, hogy a májvédő hatás szempontjából a molekula 1,4-benzodioxán részének szerepe van.



1. ábra: A lilavirágmatyosbű (Silybum marianum) izolált (+)-szilibin szerkezete

Kutatásunk a közelmúltban olyan troglitazon analogonokat [5-arilidion-tiazolidin-2,4-dion származékok (6)] állított elő, melyekben a vegyület kromán részt 1,4-benzodioxán gyűrűrendszerrel helyettesítették. E vegyületek farmakológiai adatai arról tanúskodtak, hogy az 1,4-benzodioxán gyűrűrendszer potenciális áptér lehet egy új típusú antidiabetikus gyógyszer kifejlesztésében.



2. ábra: A troglitazon rokon vegyületei

Doktori munkám során a felfedezés az englitazon (2) 1,4-benzodioxán analogonjainak vizsgálatával kívántuk megértesíteni.

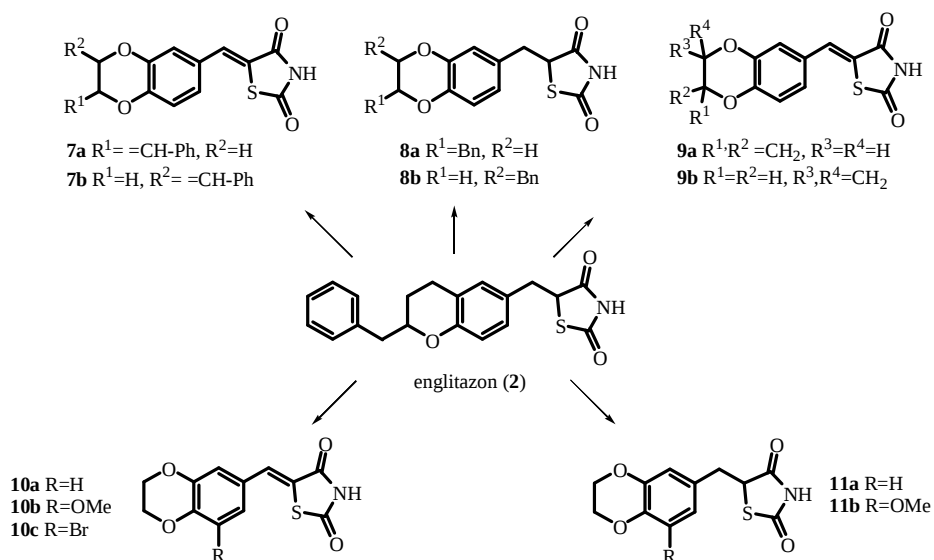
2. Az alkalmazott vizsgálati módszerek

Kutatási munkánk során a szerves kémia mikro-, félmikro- és makromódszereit alkalmaztuk. A reakciók nyomon követésére az elvárt termékek tisztaságának ellenőrzésére vörösnegy-kromatográfiával, a termékek tisztítását oszlopkromatográfiával és/vagy kristályosítással végeztük. Az új vegyületeket fizikai állandókkal (olvadáspont, forráspont) jellemeztük, szerkezetüket $^1\text{H-NMR}$ módszerrel igazoltuk.

3. Új tudományos eredmények

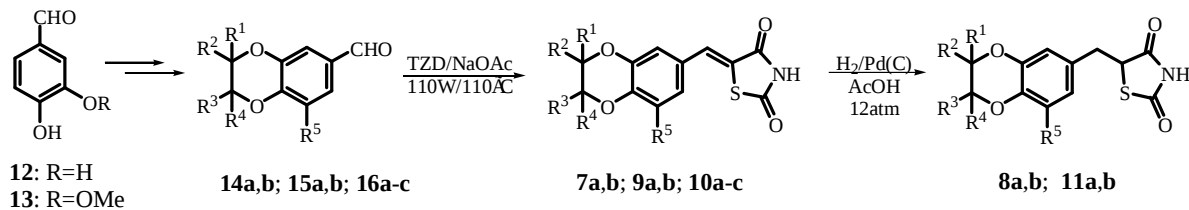
3.1. Englitazon analogonok szintézise és glikogén foszforiláz enzim gátló hatásuk vizsgálata

A hatóanyag-szerkezet átfogó felderítéséhez a 3. ábrán feltüntetett englitazon analogonok szintézisét végeztük meg.



3. ábra: Englitazon és rokon vegyületek szerkezete I.

A kereskedelmi forgalomban is kaphat¹ 3,4-dihidroxibenzaldehid¹ (12) vagy vanillinb¹ (13) kiindulva t¹bb l¹p¹sben v¹ltozatosan szubsztitu¹lt 1,4-benzodiox¹nv¹zas aldehideket¹ il¹tottunk el¹, melyeket mikrohull¹m³/₄ k¹l¹Ám¹nyek k¹l¹zt¹ tiazolidin-2,4-dionnal (TZD) kondenz¹lva 7a, b, 9a, b ¹s 10a-c englitazon analogonokhoz jutottunk. A 7a, b ¹s 10a, b vegy¹Ále-
tek nyom¹s alatti katalitikus hidrog¹nez¹se 8a, b ¹s 11a, b vegy¹Áleteket eredm¹nyezte (4. ábra).

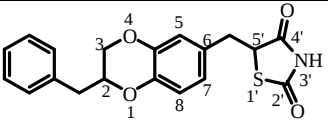
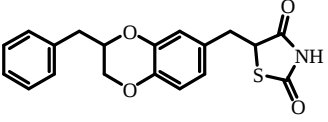
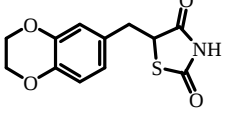
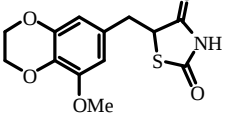
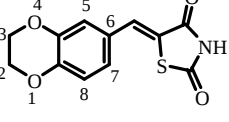
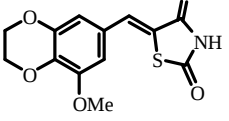
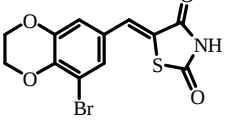
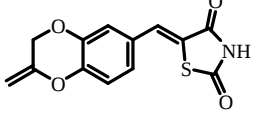
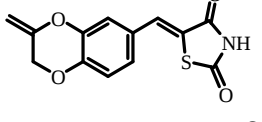
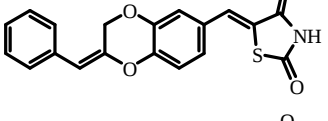
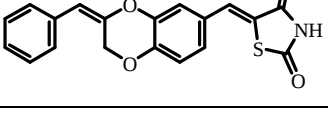


	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
14a ¹ 7a ¹ 8a	H	H	=CH-Ph		H
14b ¹ 7b ¹ 8b		=CH-Ph	H	H	H
15a ¹ 9a	H	H	=CH ₂		H
15b ¹ 9b		=CH ₂	H	H	H
16a ¹ 10a ¹ 11a	H	H	H	H	H
16b ¹ 10b ¹ 11b	H	H	H	H	OMe
16c ¹ 10c	H	H	H	H	Br

4. ábra: Englitazon analogonok el¹il¹t¹sa

A vegy¹Áleteink farmakol¹giai vizsg¹lat¹t a Debreceni Egyetem Orvos- ¹s Eg¹°szs¹g-
tudom¹nyi Centrum Orvosi Vegytani Int¹°zet¹ben v¹°gezt¹°k el.

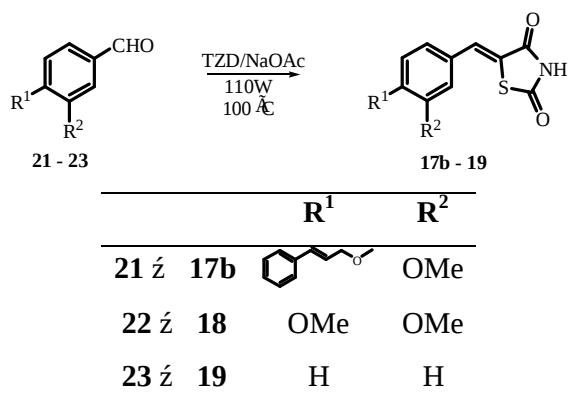
A GP enzim inhib¹ci¹j¹t 30 ¹°C-on 50 mM trietil-amin / HCl pufferben (pH=6,8)
1% glikog¹nnel 4 mM Ű-D-gl¹Ák¹ z-1-foszf¹t ¹s 1 mM AMP jelenl¹°°ben m¹°rt¹°k. Az eredm¹°nyeket
a 2. táblázatban t¹Ántett¹Ák fel.

Molekulaszám	Szerkezet	K _i (μM)
8a		217
8b		217
11a		200
11b		257
10a		233
10b		243
10c		283
9a		nincs g [°] tl [°] s (625)
9b		nincs g [°] tl [°] s (625)
7a		100
7b		25

2. táblázat

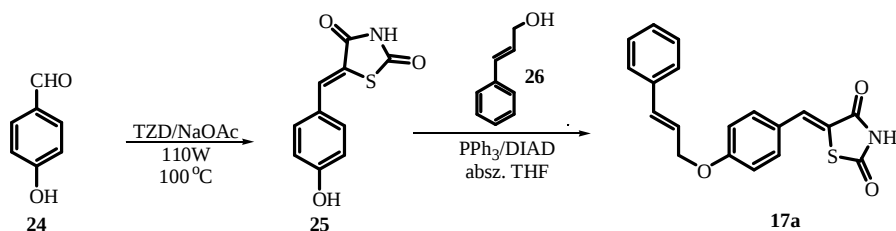
A 2. táblázatban ismertetett enzimkinetikai adatokból megállapítottuk, hogy az 1,4-benzodioxán gyűjtés szerzősége [(Ó)-8a: K_i = 217⁻ M,] a GP enzim természetes inhibitoránál, a •-

A **21** - **23** aldehidekből tiazolidin-2,4-dionnal a már ismert kék ammóniák kizárólag vögzett kondenzációt val **17b** - **19** vegyületekhez jutottunk (**7. ábra**).



7. ábra: A 17b-19 vegyületek előállítás

A 4-hidroxibenzaldehydet (24) tiazolidin-2,4-dionnal kondenzálva a 25 szűrmazót kaptuk, melyből fahőjalkohollal (26) Mitsunobu reakcióval jó hozammal izoláltuk a 17a szűrmazót (8. ábra).



8. ábra: A 17a englitazon analogon szintézise

A *racém*-16, 17a, b, 18, 19 tiazolidin-2,4-dion szűrmazók farmakológiai vizsgálatainak eredményeit a 3. táblázatban tártották fel.

Molekulaszám	Szerkezet	K_i (M)
16		nincs gátlás (625)
17a		nincs gátlás (625)
17b		nincs gátlás (625)

3. táblázat

Molekulaszám	Szerkezet	K_i (M)
18		nincs g ^{tl} s (625)
19		nincs g ^{tl} s (625)
27		nincs g ^{tl} s (625)

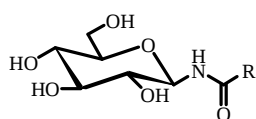
3. táblázat folytatása

Meglepő módon, a vegyületek 625 μ M-os koncentrációban sem csökkentették a glikogén foszforiláz enzim aktivitását. Ez egyértelműen arra utal, hogy a vegyületek GP enzim g^{tl} hatásaiban az 1,4-benzodioxán gyűrű és a benzilidénsoport együttes jelenléte a meghatározó a tiazolidin-2,4-dion gyűrű elhagyható.

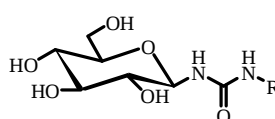
3.2. N-2-Naftil- β -D-glükopiranozilamin O-heterociklusos rokon vegyületeinek szintézise és farmakológiai vizsgálata

A tanszékünkön Somsóczy professzor irányításával már több mint tíz éve intenzív kutatások folynak a glikogén foszforiláz enzim glükóz analóg g^{tl} szereinek (potenciális antidiabetikumok) a szintézise és biológiai vizsgálata területén.

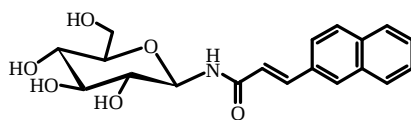
Nagyszámú szénhidrát szerkezeteket, többnyire O, N és C- β -D-glikozidokat állítottak már elő és megállapították, hogy a vegyületek közül az N-acil- β -D-glükopiranozilamid (28, 29) illetve N-szubsztituált-Nö-(β -D-glükopiranozil)karbamid szerkezetek (30) hatékony inhibitorok (9. ábra).



28: R=2-naftil K_i =9,7 μ M



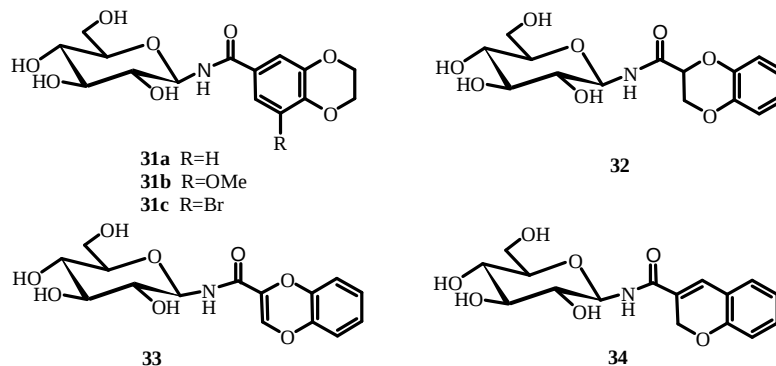
30: R=2-naftil K_i =0,4 μ M



29: K_i =3,5 μ M

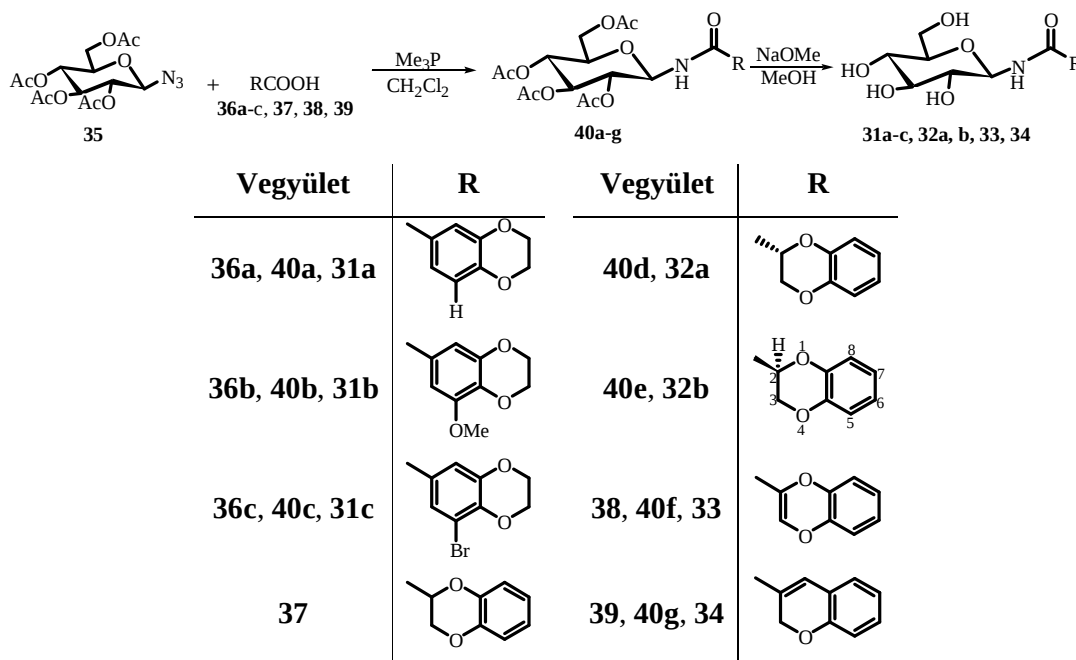
9. ábra: A glikogén foszforiláz glükóz analóg g^{tl} szereik

A határ-szerkezet 1/4szefÁgg°sek m°lyebb megismer°s°hez az *N*-2-naftil-•-D-glÁkopiranozilamin (28) *O*-heterociklusos analogonjait (31a-c, 32-34) is elŘll°tottuk (10. ábra).



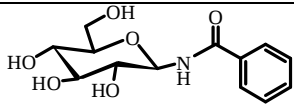
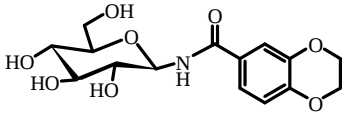
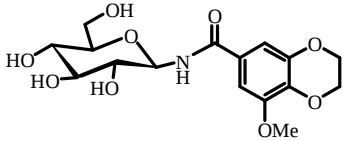
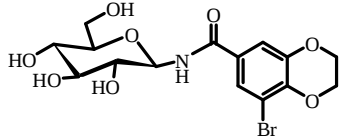
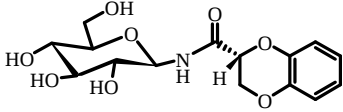
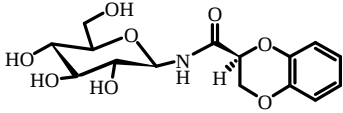
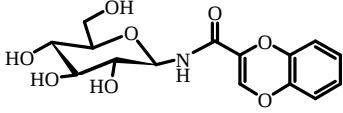
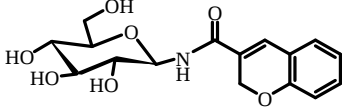
10. ábra: *O*-Heterociklusos *N*-•-D-glÁkozilamidok szerkezete

A tetra-*O*-acetyl-β-D-glÁkopiranozilazidot (35) a 36a-c, 37, 38 °s a 39 karbonsavakkal a m°dosított Staudinger-reakci° k°lÁm°nyei k°lÁt°t kapcsol°tuk °s magas hozammal a k°v°nt •-D-glÁkopiranozilaminokat kaptuk meg (40a-g). A *racém*-37 karbonsav eset°ben diasztereomerek (40d, e) keletkeztek, melyek elv°laszt°s°t oszlopkromatogr°fi°val sikerÁlt megoldanunk. Az 1,4-benzodiox°n gy°r°f°ben l°v°Ř kiralit°s centrum abszol°t konfigur°ci°j°t a CD sz°nk°pek alapj°n, a kutat° csoportunk °ltal megfogalmazott helicit°si szab°ly alkalmaz°s°val hat°roz°tuk meg. Az acetyl°d°Řcsoportok Zempl°n-f°le elszappanos°t°sa a k°v°nt glÁkozidokat eredm°nyezte (11. ábra).



11. ábra: Staudinger reakci° t k°lÁv°Ř Zempl°n-f°le elszappanos°t°s

A farmakol°giai vizsg°latok eredm°nyeit a 4. táblázatban foglaltuk 1/4sze.

Molekulaszám	Szerkezet	K_i (M)
41		144
31a		252
31b		232
31c		268
32a		128
32b		120
33		85
34		23

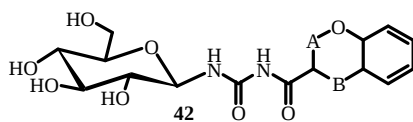
4. táblázat

Vegyületeink inhibíciós állandóját (K_i) az *N*-benzoyl- β -D-glükózamid^oval (**41**) összehasonlítva megállapítható, hogy a fenilcsoport szubsztitúciójával (**31a-c**) szignifikánsan csökkentette a molekula illeszkedését az enzim aktív centrumához. Az aromás és a szénhidrát farmakofor közötti kapcsolat kereszteződésének összekapcsolása hatékonyabbá tette az enzim inhibícióját (K_i : **31a** > **31b** > **32b**). Jelentős hatékonyabbá tette az enzim inhibícióját a nagy hidrofób csoport π -donor képességének növelése (**32a** vagy **32b** és **33**) is. Különösen fokozódott ez, ha a molekula π -donor képességét (lásd **33** és **34**) még a konjugációval is növelték.

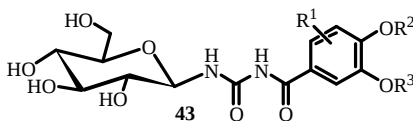
3.3. *N*-2-Naftoil-*N'*-(β -D-glükopiranozil)karbamid analógok szintézise és farmakológiai vizsgálata

Somszék professzor és munkatársai azt találták, hogy az *N*-2-naftoil-*N'*-(β -D-glükopiranozil)karbamid (**30**) már nanomólós koncentrációban is inhibítor a glikogén foszforiláz enzimnek ($K_i = 0,4 \text{ } \mu\text{M}$).

Doktori munkám során a vegyület **42** és **43** típusú szabadalomképes *O*-heterociklosos analógjainak szintézisét valósítottuk meg és ezek közül a **30** szerényebb is hatékonyabb ($K_i = 0,37 \text{ } \mu\text{M}$) vegyületet találtunk (**12. ábra**).



ahol: A = CH, CH₂ és B = CH, O



ahol: R¹ = H, halogén, alkil, O-alkil

R² = R³ = alkil vagy -(CH₂)_n-

12. ábra *N*-2-naftoil-*N'*-(β -D-glükopiranozil)karbamid *O*-heterociklosos analógjai

A fenti vegyületek részletes előállításait és farmakológiai adatait szabadalmi okok miatt doktori dolgozatomban nem ismertettük.

1. Background and aims of the dissertation

Nowadays *Diabetes mellitus* represents a serious problem in affluent western societies. 90% of these affected have type 2 *Diabetes mellitus*. According to WHO data, over 171 million people suffer from this disease, which is predicted to reach even 366 million patients by 2030.

Diabetes mellitus is the chronic disease of carbohydrate metabolism characterized by chronically elevated blood glucose level and its origin is the absolute and relative deficiency of insulin.

Considering its appearance *Diabetes mellitus* is divided into two main types:

Type 1 diabetes is the autoimmune mediated destruction of insulin producing β -cells in the pancreas resulting in absolute insulin deficiency. In this case glucose uptake and the synthesis of glycogen are hindered. Frequently it began in youth but occasionally it occurs at adults as well. By administration of insulin, the glucose level can be balanced.

In type 2 diabetes or non-insulin dependent *Diabetes mellitus*, the β -cells are functioning but their glucose-sensitivity, insulin-discharge and the insulin-sensitivity of the organs fail and insulin-resistance occurs. Only diet, exercise and oral hypoglycaemic agents can help and the glucose-balance can not be maintained by the administration of insulin.

The high glucose production of liver is mainly responsible for hyperglycaemia, which can be attributed to glycogenesis and glycogenolysis.

A possible way of treatment is to reduce the activity of the glycogen phosphorylase (GP) enzyme by bonding an inhibitor to one of its active sites.

In the eighties many thiazolidin-2,4-dione-type derivatives reducing insulin resistance were reported (**Table 1.**).

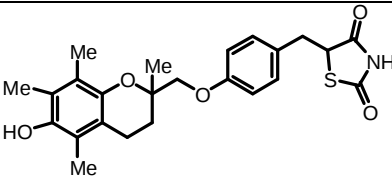
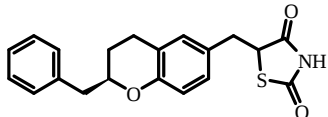
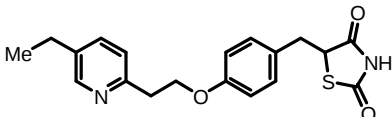
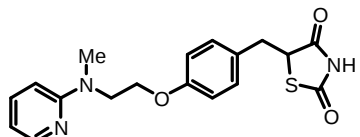
Name	Structure	Pharmaceutical factory
Troglitazon (1)		Sankyo
Englitazon (2)		Pfizer
Pioglitazon (3)		Takeda
Rosiglitazon (4)		SmithKline-Beecham

Table 1

From these, troglitazone (1), introduced as Resulin[®] in the year 2000 in USA, was found outstanding. In March of the same year, it was withdrawn because it turned out that it caused serious liver damage at 2% of the treated patients when introduced in Europe.

The structure-activity study of (+)-silybin (5) [Legalon[®], Madaus AG, Köln], isolated from the purple-flowered variant of the milk thistle (*silybum marianum*), showed that the 1,4-benzodioxane moiety has a decisive role in its liver-protecting effect.

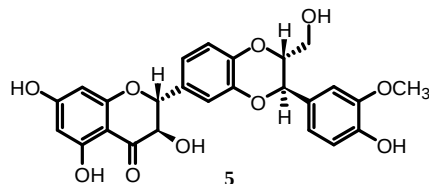


Figure 1: The structure of the (+)-silybin

Our research group has synthesized recently some troglitazone analogues (6), in which the chromene moiety was replaced by a 1,4-benzodioxane ring system. The GP enzyme-inhibitory effect of these compounds showed that the 1,4-benzodioxane moiety might be potential building block for the development of a new anti-diabetic drug.

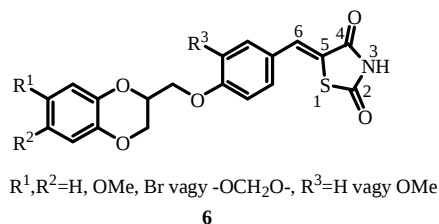


Figure 2: Troglitazon analogous

In the present dissertation we aimed to confirm this supposition by the synthesis and investigation of the 1,4-benzodioxane analogous of englitazone (2).

2. Applied methods

The micro-, semi micro- and macro-methods of modern preparative organic chemistry were applied. Reactions were followed and the purity of products checked by thin layer chromatography. Purification of products was performed by column chromatography and/or by crystallization.

New compounds were characterized by physical constants (melting point, optical rotation), their structures were verified by ^1H -NMR spectra.

3. New scientific results

3.1. Synthesis of englitazon analogs and investigation of their GP enzyme inhibiting activity

For the structure-activity relationship studies, we synthesized the following englitazon analogous (**Figure 3**).

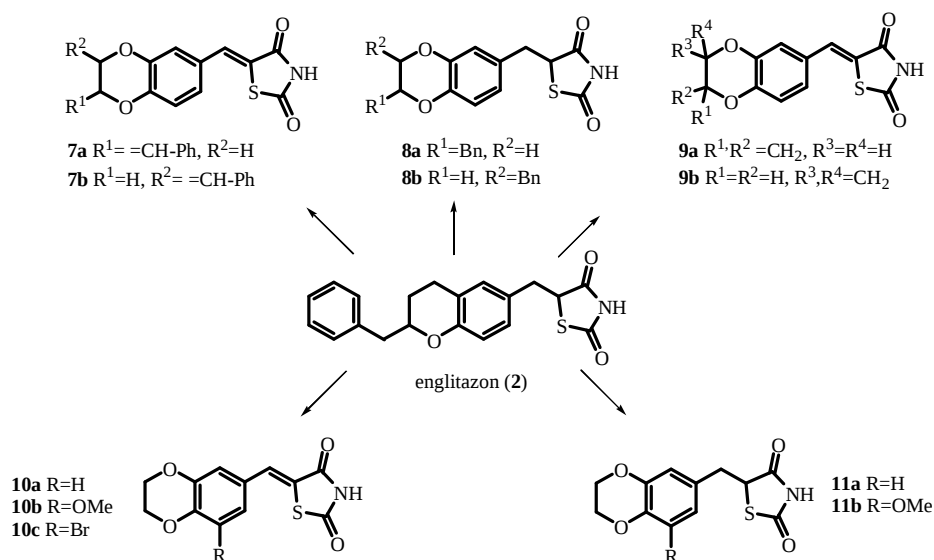
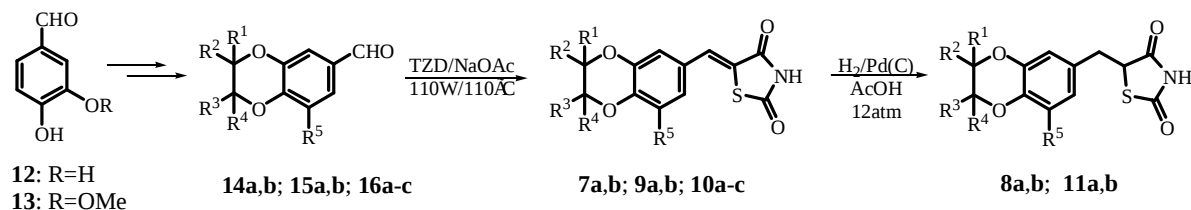


Figure 3: Structure of englitazon and its analogous I.

From the commercially available 3,4-dihydroxy-benzaldehyde (12) or vanilline (13) aldehydes containing a 1,4-benzodioxane skeleton with versatile substitution pattern were synthesized. Microwave-assisted condensation reactions of these aldehydes with thiazolidin-2,4-

dione (TZD) gave the **7a, b, 9a, b** and **10a-c** englitazon analogous. Catalytic hydrogenation of **7a, b** and **10a, b** under pressure resulted in compounds **8a, b** and **11a, b** (Figure 4).



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
14a $\acute{z}$ 7a $\acute{z}$ 8a	H	H	=CH-Ph		H
14b $\acute{z}$ 7b $\acute{z}$ 8b		=CH-Ph	H	H	H
15a $\acute{z}$ 9a	H	H	=CH ₂		H
15b $\acute{z}$ 9b		=CH ₂	H	H	H
16a $\acute{z}$ 10a $\acute{z}$ 11a	H	H	H	H	H
16b $\acute{z}$ 10b $\acute{z}$ 11b	H	H	H	H	OMe
16c $\acute{z}$ 10c	H	H	H	H	Br

Figure 4: Preparation of englitazon analogs

The pharmacological studies of our compounds were carried out at the Medical Chemistry Department of University of Debrecen.

The inhibition of GP enzyme was measured at 30 $\acute{C}$, in 50 mM triethyl amine / HCl buffer solution (pH=6.8), in the presence of 1% glycogen and 4 mM $\acute{U}$ -D-glucose-1-phosphate and 1 mM AMP. The results are summarized in Table 2.

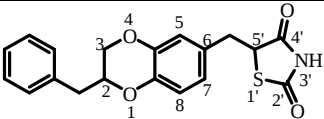
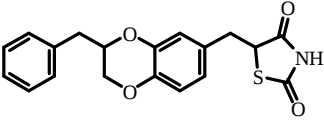
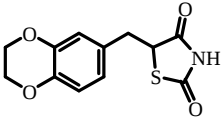
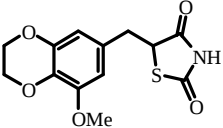
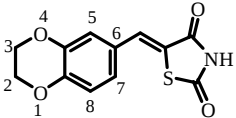
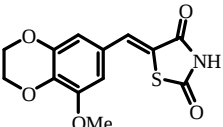
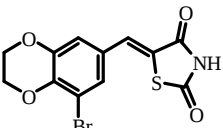
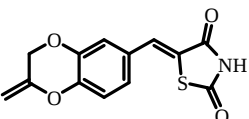
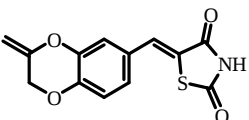
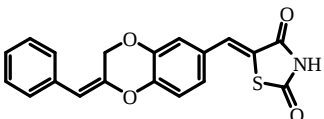
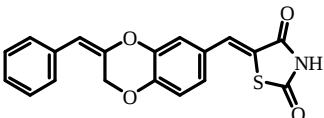
Number of molecule	Structure	K _i (μM)
8a		217
8b		217
11a		200
11b		257
10a		233
10b		243
10c		283
9a		no inhibition (625)
9b		no inhibition (625)
7a		100
7b		25

Table 2

The enzyme-kinetic data proved that *racemic* **8a** englitazon analogous ($K_i = 217 \text{ } ^{-} \text{M}$) are eight times more efficient than the natural GP enzyme inhibitor D-glucose ($K_i = 1700 \text{ } ^{-} \text{M}$), and the position of the benzyl group connected to the 1,4-benzodioxane ring system either at C-2 or at C-3, does not have an important role. Moreover, the lack of this group leads to a somewhat increased activity [(**11a**: $K_i = 200 \text{ } ^{-} \text{M}$)]. By introduction of a methoxy group at C-8 [(**11b**: $K_i = 257 \text{ } ^{-} \text{M}$)] or of a double bond at C-5 on the thiazolidin-2,4-dione ring (**10a**: $K_i = 233 \text{ } ^{-} \text{M}$), the binding to the active site of the enzyme became worse. The presence of a methoxy group (**10b**: $K_i = 243 \text{ } ^{-} \text{M}$) or bromine (**10c**: $K_i = 283 \text{ } ^{-} \text{M}$) on the C-8 of the 1,4-benzodioxane ring leads to remarkably smaller activity. The methylene group at C-2 or C-3 caused complete loss of the effect (**9a** and **9b**: $K_i > 625 \text{ } ^{-} \text{M}$). Unexpectedly, the phenyl derivatives of these compounds (**7a**: $K_i = 100 \text{ } ^{-} \text{M}$, **7b**: $K_i = 25 \text{ } ^{-} \text{M}$) showed considerable inhibitory activity.

These pharmacological results raised some questions as listed below:

- How is the activity related to the 2-benzylidene-1,4-benzodioxane skeleton?
- Is the role of the thiazolidine-2,4-dione ring system?

In order to address these questions compounds **16-19** were synthesized and their GP inhibitory activities were investigated (**Figure 5**).

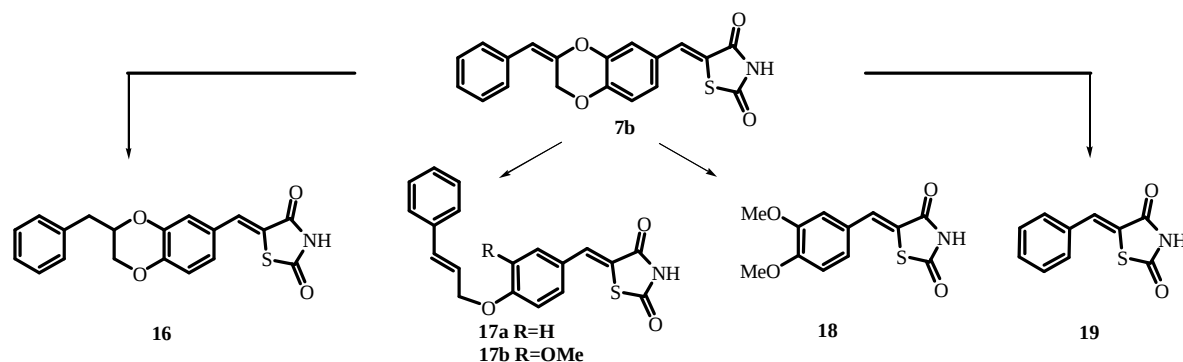


Figure 5: Structure of englitazon and its analogous II.

The preparation of *racemic*-**16** was achieved from the available 1,4-benzodioxane derivative (**14b**) as show in Figure 6.

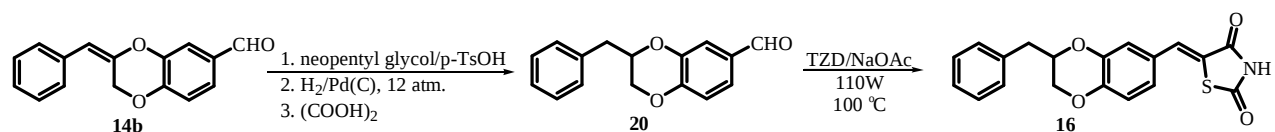


Figure 6: The synthesis of the *racemic*-**16**

The condensation of aldehydes **21-23** with thiazolidin-2,4-dione under the described reaction conditions gave compounds **17b - 19** (**Figure 7**).

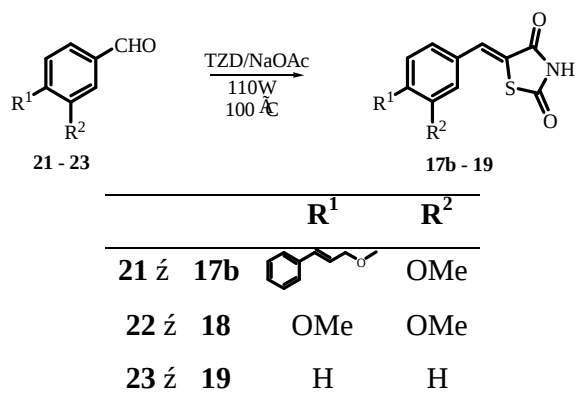


Figure 7: Preparation of the **17b-19** compounds

Condensation of 4-hydroxy benzaldehyde (**24**) with thiazolidin-2,4-dione resulted in compound **25**, which reacted under Mitsunobu conditions with cinnamyl alcohol (**26**) to afford derivative **17a** with good yield.

The results of pharmacological tests of *racemic*-**16**, **17a**, **b**, **18**, **19** thiazolidin-2,4-dione derivatives are shown in Table 3.

Number of molecule	Structure	K_i (μ M)
16		no inhibition (625)
17a		no inhibition (625)
17b		no inhibition (625)
18		no inhibition (625)
19		no inhibition (625)
27		no inhibition (625)

Table 3

Surprisingly, these compounds did not inhibit the activity of GP enzyme even at a concentration of $625 \mu\text{M}$.

This revealed unambiguously that in the inhibitory activity of GP enzyme the 1,4-benzodioxane ring and benzylidene group are both responsible, while the thiazolidin-2,4-dione moiety can be omitted.

3.2. Synthesis of *O*-heterocyclic derivatives of *N*-2-Naphthyl- β -D-glucopyranosyl amines

The synthesis and pharmacological investigations of glucose analogue inhibitors of the GP enzyme (potential antidiabetics) have been pursued for more than ten years under the supervision of Prof. Soms'k at our department.

A great number of carbohydrate derivatives, mostly *O*-, *N*- and *C*- β -D-glycosides were prepared and it was found that the *N*-acyl- β -D-glucopyranosyl amides (**28**, **29**) and *N*-substituted-*N*-(β -D-glucopyranosyl)urea derivatives (**30**) were efficient inhibitors (**Figure 9**).

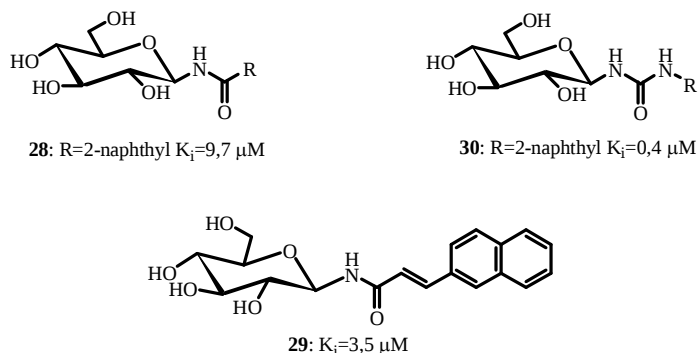


Figure 9: The inhibitors of the GP enzyme glucose analogous

For a deeper understanding of the structure-activity relationships, the *O*-heterocyclic analogous of the *N*-2-naphthyl- β -D-glucopyranosyl amine (**28**) were synthesized (**Figure 10**).

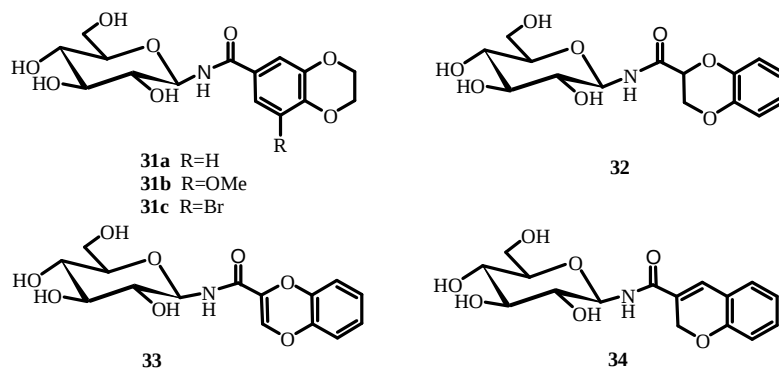


Figure 10: Structures of *O*-heterocyclic *N*- β -D-glucosyl amides

Tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl azide (**35**) was coupled under modified Staudinger reaction conditions with carboxylic acids **36a-c**, **37**, **38** and **39** and the desired β -D-glucopyranosyl

amines (**40a-g**) were isolated in high yields. In the case of racemic carboxylic acid **37**, diastereomers (**40d, e**) were formed, which could be separated by column chromatography.

The absolute configuration of the chirality centre of the 1,4-benzodioxane ring system was determined on the basis of its CD spectra, using the helicity rule established by our research group.

After removing the acetyl protecting groups according to Zempl^on method, the desired glycosides were obtained (**Figure 11**).

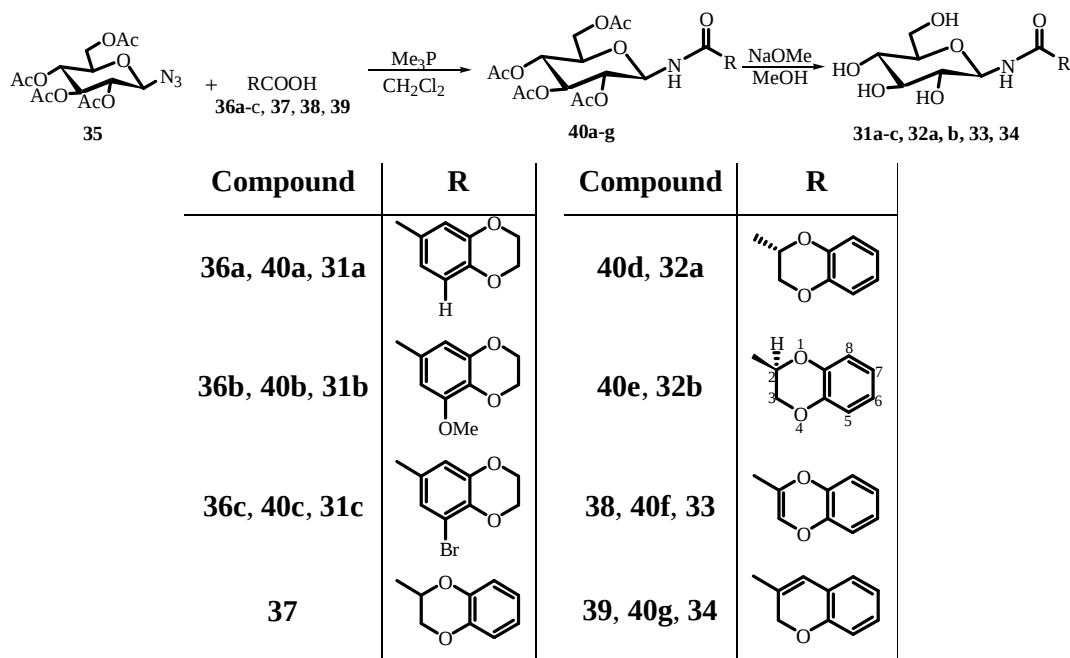


Figure 11: Zempl^on saponification method following the Staudinger reaction

The pharmacological results are shown in **Table 4**.

Number of molecule	Structure	K_i ($\bar{M}$)
41		144
31a		252
31b		232
31c		268
32a		128
32b		120
33		85
34		23

Table 4

The inhibition constants (K_i) of our compounds compared to that of *N*-benzoyl- α -D-glucose amide showed that the substitution of the phenyl group (**31a-c**) reduced considerably the binding of the molecule to the active site of the enzyme.

The five-bond connection of the aromatic and carbohydrate pharmacophore resulted in increased activity (K_i : **31a** > **31a** ζ **32b**). The extension of the π -donor capacity of this large hydrophobic group caused a remarkable better activity. This effect was enhanced further when the π -donor capacity of the molecule was increased by conjugation.

3.3. Synthesis and pharmacological studies of *N*-2-naphthoyl-*N'*-(β -D-glucopyranosyl)urea analogous

Professor Soms"ık and co-workers found that *N*-2-naphthoyl-*N'*-(β -D-glucopyranosyl)urea (**30**) inhibited GP enzyme in even nanomole concentrations.

During our research, the syntheses of patent susceptible *O*-heterocyclic analogous (**42**, **43**) were achieved, and among them some were found to have similar activity then compound **30**.

Due to the patentable results, the synthesis and the pharmacological data of the above compounds are here not described.

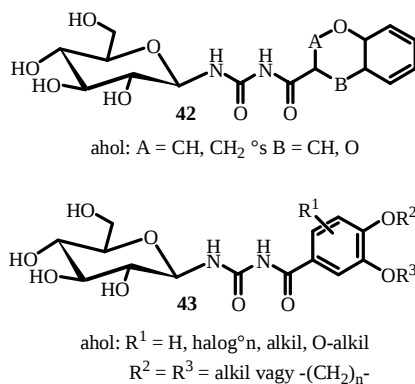


Figure 12: *N*-2-naphthoyl-*N'*-(β -D-glucopyranosyl)urea analogous

4. Közlemények és előadások jegyzéke / List of Publications

4.1. Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények / Papers

1. **Z. Czakó**, L. Juhász, C. Kenéz, K. Czifrik, L. Somsk, T. Docsa, P. Gergely, S. Antus: Synthesis and Glycogen Phosphorylase Inhibitory Activity of N-(α -D-glucopyranosyl)amides Possessing 1,4-Benzodioxane Moiety, *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, 17, 6738-6741.
2. **Z. Czakó**, T. Docsa, P. Gergely, L. Juhász, S. Antus: Synthesis and phosphorylase inhibitor activity of functionalized 1,4-benzodioxanes, *Pharmazie*, 2009, 65, 1-4

4.2. Az értekezés témájához kapcsolódó előadások / Lectures

1. **Z. Czakó**, L. Juhász, T. Docsa, P. Gergely, S. Antus: Synthesis and SAR Study of 2,3-Dihydrobenzo[1,4]dioxine-type Analogues of Englitazone, 3rd German-Hungarian Workshop Paderborn, Germany, 15-17. May 2008.
2. **Z. Czakó**, L. Juhász, T. Docsa, P. Gergely, S. Antus: Synthesis and SAR Study of 2,3-Dihydrobenzo[1,4]dioxine-type Analogues of Englitazone and Glycogen Phosphorilase Inhibitors, *MTA Workshop on Heterocyclic Chemistry*, Balatonszemes, Hungary, 21-23. May 2008.
3. **Z. Czakó**, G. Varga, L. Juhász, I. Szatmári, T. Docsa, Zs. Varga, L. Nagy, P. Gergely, S. Antus: Synthesis of Biologically Active 2,3-dihydrobenzo[1,4]dioxine-type compounds, *MTA Flavonoid Chemistry Workshop*, Debrecen, Hungary, 20. October 2008.
4. **Z. Czakó**, G. Varga, L. Juhász, I. Szatmári, T. Docsa, Zs. Varga, L. Nagy, P. Gergely, S. Antus: Synthesis of Biologically Active 2,3-dihydrobenzo[1,4]dioxine-type compounds, *Kisfaludy Lajos Foundation Workshop*, Richter Gedeon Rt., Budapest, Hungary, 09. March 2009.
5. **Z. Czakó**, L. Juhász, T. Docsa, P. Gergely, S. Antus.: Synthesis of Biologically Active 2,3-dihydrobenzo[1,4]dioxine-type compounds, *MTA Workshop on Heterocyclic Chemistry*, Balatonszemes, Hungary, 20-22. May 2009.
6. **Z. Czakó**, L. Juhász, T. Docsa, P. Gergely, S. Antus.: The Synthesis and Structure-Effect Relationship Study of O-Heterocyclic Compounds with Potential Phosphorylase Inhibitor Activity, *MTA Flavonoid Chemistry Workshop*, Budapest, Hungary, 7. December 2009.

4.3. Az értekezés témájához kapcsolódó posztterek / Posters

1. L. Juhász, **Z. Czakó**, T. Docsa, A. Brunyánszki, P. Gergely, S. Antus: Synthesis and Glycogen Phosphorylase Inhibitor Activity of 1,4-benzodioxane Derivatives, *2nd German-Hungarian Workshop*, Debrecen-Eger, Hungary, 2006
2. L. Juhász, **Z. Czakó**, T. Docsa, A. Brunyánszki, P. Gergely, S. Antus: Synthesis and Glycogen Phosphorylase Inhibitor Activity of 1,4-benzodioxane Derivatives, *13th FECHM Conference on Heterocycles in Bioorganic Chemistry*, Sopron, Hungary, 2007
3. **Z. Czakó**, L. Juhász, T. Docsa, P. Gergely, S. Antus: Synthesis and SAR Study of 2,3-Dihydrobenzo[1,4]dioxine-type Analogues of Englitazone, *3rd German-Hungarian Workshop*, Paderborn, Germany, 15-17. May 2008.
4. **Z. Czakó**, L. Juhász, T. Docsa, P. Gergely, S. Antus: Synthesis of 2,3-Dihydrobenzo[1,4]dioxine-type Analogues of Englitazone and Glycogen Phosphorylase Inhibitors, *Chemistry Conference*, Hajdúszoboszló, Hungary, 19-21. June 2008.