

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**ANTIHIPERGLIKAEMIÁS SZEREK TERVEZÉSE ÉS
VIZSGÁLATA A GLIKOGÉN FOSZFORILÁZRA HATÓ
INHIBITOROKKAL**

Docsa Tibor

Témavezető: Dr. Gergely Pál, akadémikus



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2011

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK	5
1. BEVEZETÉS	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
2.1. II. típusú diabétesz terápiás célpontjai	9
2.1.1. Glükagon receptor antagonisták	10
2.1.2 A glükóz-6-foszfátáz inhibitorai	11
2.1.3 A glükoneogenesis gátlása a fruktóz-1,6-biszfoszfátáz inhibitoraival	12
2.1.4 A glükokináz aktivátorai	13
2.2. A glikogénanyagcsere általános bemutatása	14
2.3. A glikogén foszforiláz jellemzése	16
2.3.1 A foszforiláz szerkezete: kontaktfelületek és kötőhelyek	17
2.4. Reverzibilis foszforiláció jelentősége a glikogénanyagcserében	20
2.5. A glikogén szintetáz	21
2.6. A glikogénanyagcsere szabályozása	22
2.7. A glikogén foszforiláz inhibitorai	24
2.7.1. Az aktív centrum gátlószerei	24
2.7.2. Az AMP kötőhely inhibitorai	26
2.7.3. Az indol kötőhely inhibitorai	29
2.7.4. A purin nukleotid kötőhely inhibitorai	31
2.7.5. Glikogénkötőhely inhibitorai	31
2.8. Állatkísérleti modellek a II. típusú diabétesz tanulmányozására	32
2.9. Célkitűzések	33
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	34
3.1. Anyagok	34

3.1.1. Glükopiranozilidén-spiro-tiohidantoin (TH)	34
3.1.2. Módosított glikogén előállítása	35
3.1.3. Pufferek	36
3.2. Enzimpreparátumok	36
3.2.1. Vázizom glikogén foszforiláz <i>b</i> nyúl vázizomból	36
3.2.2. Vázizom glikogén foszforiláz <i>a</i>	36
3.2.3. Máj glikogén foszforilázok	36
3.2.4. Foszforiláz kináz nyúl vázizomból	37
3.3. Enzimaktivitás meghatározások	37
3.3.1. Tisztított izom és máj glikogén foszforiláz aktivitásának meghatározása	37
3.3.2. Foszforiláz kináz	38
3.3.3. Glikogén szintetáz	38
3.3.4. Foszforiláz foszfatáz	39
3.3.5. Glikogén foszforiláz gátlószerek vizsgálata: K_i és IC_{50} meghatározása	39
3.4. Fehérjekoncentráció meghatározása	40
3.5. Enzim-ligand kölcsönhatás vizsgálata röntgenkristallográfiával	40
3.6. Állatkísérleti módszerek	41
3.6.1. Normál Wistar patkányok	41
3.6.2. Sztreptozotocin (STZ) kezelés	41
3.6.2.1. Sztreptozotocin kezelés és a TH hatása	41
3.6.2.2. Sztreptozotocin kezelés és inzulin implantátum	41
3.6.3. ZDF (Zucker diabetic fatty rat) patkányok	42
3.6.3. Állatkísérleti műtéti módszerek	42
3.6.4. Májszelet minták feldolgozása	42
3.6.5. Inzulinrezisztencia mérése glükóz-clamp módszerrel	43
3.7. Mérési adatok kiértékelése	43
4. EREDMÉNYEK	45
4.1. Glükopiranozilidén-spiro-tiohidantoin (TH) glikogén foszforilázra kifejtett gátlásának vizsgálata	45

4.2. Glükózanalóg inhibitorok kinetikai vizsgálata	48
4.3. TH hatása patkány máj glikogénanyagcsere enzimeire	57
4.4. TH hatásának vizsgálata sztreptozotocin-indukált diabéteszben	58
4.5. TH hatásának vizsgálata Zucker diabéteszes (ZDF) patkányokban	60
4.6. TH hatása Wistar patkányok vércukorszintjére és inzulinérzékenységére	62
5. MEGBESZÉLÉS	66
5.1. Glükózszármazék vegyületek szerkezet – gátlás vizsgálata	66
5.2. TH hatásának vizsgálata a máj glikogén anyagcseréjére	70
6. ÖSSZEFOGLALÁS	74
7. FELHASZNÁLT IRODALOM	76
8. TÁRGYSZAVAK	85
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	86
10. FÜGGELÉK	87
A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények	87
További közlemények	88
11. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK	92

RÖVIDÍTÉSEK

AC:	adenilát-cikláz
CMV:	citomegalovírus
<i>db/db</i> :	egértörzs – leptinreceptor mutációval
FK:	foszforiláz-kináz
F-6-P:	fruktóz-6-foszfát;
F-1,6-P ₂ :	fruktóz-1,6-biszfoszfát
F-1,6-bP-áz:	fruktóz-1,6-biszfoszfátáz
G-1-P:	glükóz-1-foszfát
G-6-P:	glükóz-6-foszfát
GFa:	glikogén foszforiláz <i>a</i> (aktív, foszforilált forma)
GFb:	glikogén foszforiláz <i>b</i> (inaktív)
GLUT:	glükóz transzporter
GK:	glükokináz
GKRP:	glükokináz regulátor fehérje
GR:	glükagon receptor;
GRA:	glükagon receptor antagonist
G _s :	aktivált G-fehérje
GSa:	glikogén szintetáz <i>a</i> (aktív, defoszforilált forma)
GSb:	glikogén szintetáz <i>b</i> (inaktív, foszforilált forma)
GSK-3:	glikogén szintáz-kináz 3
G-6-Páz:	glükóz-6-foszfátáz
HFD:	magas zsírtartalmú diéta (High Fat Diet)
HLA:	humán leukocita antigének
IDDM:	I. típusú diabétesz; inzulin-függő diabetes mellitus
INZ:	inzulin
NIDDM:	II. típusú diabétesz; nem inzulin-függő diabetes mellitus
<i>ob/ob</i> :	egértörzs – leptin mutációval
PEP:	foszfoenol-piruvát
P _i :	foszfát anion (anorganikus foszfát)
PK:	protein kináz

PKA:	cAMP-függő protein kináz
PP1:	protein foszfatáz-1
SGLT:	Na-glükóz kotranszport rendszer
STZ:	sztreptozotocin
TH:	glükopiranozilidén-spiro-tiohidantoin
UDPG:	uridin-difoszfát-glükóz
ZDF:	Zucker diabéteszes patkány (Zucker Diabetic Fat rat)
ME:	β -merkaptotanol

1. BEVEZETÉS

A cukorbetegség (*diabetes mellitus*) genetikai és környezeti tényezők együttes hatására alakulhat ki anyagcserezavarok és érrendszeri szövődmények képében. Az anyagcserezavart a hiperglikaemia okozza, ami együtt jár a fehérje- és zsíryanycsere, valamint a só-víz és sav-bázis háztartás zavaraiával. A magas vércukorszintet az inzulin hiánya vagy a meglévő inzulin hatástalansága okozza, aminek a következtében a glükóz nem képes belépni a szövetekbe. A szöveti glükózhány következményeként felgyorsulnak a glükoneogenetikus folyamatok. A kialakult hiperglikaemia a csökkent glükóz felhasználás és a fokozódó glükoneogenezis együttes eredménye. A diabétesz további tünete a poliuria, polidipszia, tömegvesztés, emelkedett szérumszirsav-szint és ketoacidózis.

A cukorbetegség és szövődményei Európában és Észak-Amerikában a népesség több mint 3 %-át, világszerte mintegy 285 millió embert érintenek, melynek előfordulását 2030-ra 438 millióra prognosztizálják [1]. Az Egészségügyi Világszervezet (1985) osztályozásának ajánlása alapján a diabétesznek 2 fő típusát különböztetjük meg: az *inzulin-függő diabetes mellitust* és a *nem inzulin-függő diabetes mellitust*.

Az I. típusú diabétesz: inzulin-függő diabetes mellitus (IDDM) a β -sejtek autoimmun eredetű szelektív és progresszív sejtpusztulása, a folyamat mindaddig tart, amíg a β -sejtek teljesen el nem pusztulnak és az inzulinszekréció megszűnésével kialakul az inzulinhiány. Megjelenése a fiatalkorra jellemző. Szerepe lehet meghatározott HLA-antigén típus meglétének. A statisztikai adatok szerint a HLA-DR3 és a HLA-DR4 típusú hisztokompatibilitási antigének jelenléte esetén gyakoribb a diabétesz [2]. Kialakulásában szerepe lehet egyes vírusfertőzéseknek is (pl. mumpsz, influenza, Coxsackie 4B, CMV). A vírusok lehetnek direkt β -sejt károsító hatásúak, vagy megváltoztathatják a sejtek antigén struktúráját, ami neoantigénként aktiválja az immunrendszert [3]. Terápiája a naponta többszöri inzulininjekcióval, testmozgással és szigorú diétával lehetséges.

A II. típusú diabétesz: nem inzulin-függő diabetes mellitus (NIDDM) lényege, hogy a hiperglikaemia részben az inzulin szekréció csökkent voltának és/vagy a perifériás sejtekben az inzulinhatás csökkenésének (inzulinrezisztencia és/vagy inzulinantagonisták) eredője [4]. Zsírsejtekben, a májban és az izomban már a betegség korai szakaszában inzulinrezisztencia mutatható ki, melynek eredményeként fokozódik az inzulintermelés. A korán jelentkező inzulinhiány először kompenzatórikus hiperinzulinaemiát, majd csökkent hormontermelést idéz elő. A kórkép kialakulásában örökletes és környezeti tényezők játszanak szerepet. Az életmód változtatáson alapuló terápia (diéta, testsúly csökkentése, rendszeres testmozgás) a betegség kezdeti szakaszában igen hatásosan befolyásolja a vércukorszintet. Amikor a vércukorszint ily módon már nem állítható be, orális antidiabetikumok alkalmazása válik szükségessé, illetve az újabb terápiákban a betegséget hipoglikaemiás gyógyszerek mellett orális hipolipidaemiás gyógyszerek együttes adásával kezelik. A betegség nem-inzulinfüggő formája (II. típusú diabétesz) a betegek ~75 %-ában jelenik meg. Ezekben az esetekben az inzulin nem fejt ki szokásos hatásait, azaz a glükóztermelés csökkentését a májban, illetve a glikogénszintézis serkentését az izmokban. Egyes felmérések szerint az Egyesült Államokban a diabétesz a 2000 után születettek kb. harmadát fogja érinteni és megközelítően 90% tekinthető II. típusú diabéteszes betegnek [5, 6]. Ha a betegséget elhanyagolják, diabétesz komplikációi léphetnek fel. Akut szövődményként hipoglikaemia, ketoacidotikus kóma, tejsavacidózis alakulhat ki. Késői szövődmény a neuropátia, a diabéteszes mikroangiopátia és szervi károsodások.

Mivel a diabétesz legjellemzőbb tünete a vércukor rendellenesen magas szintje, a terápia legfontosabb célja a vérplazma glükóz-koncentrációjának megfelelő szinten tartása. A hiperglikaemia orális antidiabetikumokkal kezelendő. Nagyszámú és különböző kémiai szerkezetű, valamint eltérő hatásmechanizmussal rendelkező gyógyszerek állnak rendelkezésre sokféle mellékhatással. A kezeléshez feltétlenül biztonságosabb és hatékonyabb terápiák bevezetése szükséges.

A glikogén foszforiláz a II. típusú diabétesz gyógyításában az egyik, nemrég felismert lehetséges célmolekula, mivel az enzim alapvető szerepet játszik a máj glikogénanyagcserében és így a vércukorszint szabályozásában. Az értekezésben a foszforilázhoz specifikusan kapcsolódó új glükózszármazékok gátlóképességét vizsgálva *in vitro* és *in vivo* rendszerekben tanulmányozzuk a hatékony inhibitorok

antihyperglykaemiás hatását. Az egyik inhibitorvegyületet vizsgáljuk a glikogén metabolizmusra fiziológiai körülmények között is a diabétesz kezelésére való potenciális alkalmazhatóság feltérképezésére.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. II. típusú diabétesz terápiás célpontjai

Az emberi táplálék legfontosabb szénhidrátkomponensei a keményítő és a szacharóz, amelyek közvetlenül nem jutnak be a sejtekbe, hanem az emésztés során monoszacharidokká átalakulva szívódnak fel és jutnak a vérkeringésbe [7]. A diabétesz kezelésére alkalmas stratégia lehet a glükóz felszívódásának gátlása pl. az α -amiláz és az α -glükozidáz enzimek aktivitásának csökkentésével. Az elmúlt években nagyszámú és hatékony inhibitor molekulát írtak le és hatásukat *in vitro* és *in vivo* kísérletekben tanulmányozták. Ezen enzimek gátlásában az imino-cukorszármazékok bizonyultak hatékony hipoglykaemiás szereknek *in vitro* vizsgálatok alapján [8].

A vese Na^+ -glükóz kotranszport-rendszere (SGLT) is tevékeny szerepet vállal a glükóz homeosztázisában, naponta mintegy 180 g glükóz reabszorpcióját végezve a glomerulus filtráció során. Az elmúlt években jelentős figyelmet fordítottak az SGLT2 (vesében csak ez a forma található meg) farmakológiai vizsgálatára és számos gátlószert írtak le. A lehetséges terápiás célpontot a diabétesz terápiájában több összefoglaló is áttekinti [9].

A felszívódást követően a glükóz a sejtekbe jut és anyagcseréje összetett módon szabályozódik (1. ábra). Számos enzim, receptor/transzporter szabályozza átalakulását, vonzó terápiás célpontokat nyújtva a II. típusú diabétesz terápiájában.

1. ábra. A glükózanyagcsere szabályozásának lehetséges célenzimei II. típusú diabéteszben
[10] alapján

GRA: glükagon receptor antagonista; GR: glükagon receptor; G_s : aktivált G-fehérje ; AC: adenilát-cikláz; GK: glükokináz; GKR: glükokináz regulátor fehérje; PKA: cAMP-függő protein kináz; FK: foszforiláz kináz; GFa: glikogén foszforiláz *a* (aktív, foszforilált forma); GFb: glikogén foszforiláz *b* (inaktív); GSa: glikogén szintetáz *a* (aktív, defoszforilált forma); GSb: glikogén szintetáz *b* (inaktív); PK: protein kinázok; PP1: protein-foszfátáz-1; G-6-Páz: glükóz-6-foszfátáz; F-6-P: fruktóz-6-foszfát; F-1,6-P₂: fruktóz-1,6-biszfoszfát; F-1,6-bP-áz: fruktóz-1,6-biszfoszfátáz; PEP: foszfoenol-piruvát. A szaggatott vonal a GF és GS enzimek reverzibilis foszforilációját, míg a pontozott vonal közvetett hatásokat mutat.

2.1.1. Glükagon receptor antagonisták

A májban történő glükóz felszabadulásért és raktározásért, mint fő hormonális szabályozó, a glükagon a felelős. A glükagon receptor az adenilát-cikláz katalitikus aktiválásával megnöveli a cAMP koncentrációját a sejtben, amely a cAMP-függő protein kinázon keresztül foszforilációs kaszkádot indít el. A képződött aktív foszforiláz

kináz foszforilálja és ezáltal aktiválja a glikogén foszforilázt, ami glikogenolízist eredményez. Ezzel párhuzamosan többféle protein kináz foszforilálja és ezzel inaktiválja a glikogén szintetázt, leállítva a szöveti glikogén képződését. A glikogén szintetáz aktiválását és a foszforiláz inaktiválását defoszforilációs folyamatok végzik (ld. bővebben az 2.4.4. fejezetet).

A glükagon glükóz-koncentrációra kifejtett hatása szomatosztatin adásával befolyásolható, mivel a szomatosztatin gátolja az inzulin és a glükagon szekréciót mind humán szervezetben, mind állati modelleken [11].

Több kutatócsoport foglalkozott olyan vegyületek szintézisével, amelyek a glükagon receptorhoz kötődnek. Az egyik leghatékonyabb vegyület egy diazaspiro-származék, ami dóziszfüggően gátolja a glükagon kötődését a receptorhoz ($IC_{50} = 34$ nM). Elhízott egereket a vegyülettel kezelve az állatok májában csökkent a glükóz felszabadulása [12].

2.1.2 A glükóz-6-foszfátáz inhibitorai

A plazma glükóz-koncentrációjáért felelős két fő metabolikus útvonal a májban a glikogenolízis és a glükoneogenezis. A glükóz-6-foszfátáz a májban lejátszódó glükóztermelés, a glikogenolízis és a glükoneogenezis utolsó lépését a glükóz defoszforilációját katalizálja, és ezért az enzim a hiperglikaemia ellenes gyógyszerek elsődleges célpontjává vált [13, 14]. A glükóz-6-foszfátáz gén expressziója indukálódik inzulin hiányában, valamint hiperglikaemiában [15]. Ezért a gén expressziója várhatóan emelkedik a II. típusú diabéteszben is. Kísérleti adatok alapján a glükóz-6-foszfátáz mennyisége nagyobb mértékű elhízott ZDF patkányokban, mint normál Wistar állatokban és ennek hatására az állatokban megemelkedik a vér glükóz-koncentrációja, bizonyítva az enzim hiperglikaemiára kifejtett hatását [16].

A glükóz-6-foszfátáz a sejtek endoplazmás retikulumában található. Feladata a defoszforiláción kívül az enzim szubsztrátjának a glükóz-6-foszfátnak a citoplazmából az endoplazmás retikulum lumenjébe szállítása egy transzlokátor segítségével. Az irodalomban mind az enzim [17], mind a transzlokátor gátlószerei ismertek [18]. Az inzulinszerű hatással rendelkező peroxi-vanadát vegyületek, általános foszfo-tirozin protein foszfátáz gátló hatásuk miatt, a glükóz-6-foszfátáz katalitikus alegységének jó

inhibitorai. Az orto-vanadát fenantrénnel kapcsolt származéka dóziszfüggően csökkenti a glükagon vércukorszint növelő hatását, és ezzel párhuzamosan erőteljesen növeli a vérben a laktát koncentrációját [17]. A probléma ezen vanadát vegyülettel, hogy a glükóz-6-foszfát mellett a fruktóz-2,6-biszfoszfátot is gátolja [19], csökkentve ezzel a glükoneogenezist, így növelve a vérben a laktát koncentrációját, ami acidózishoz vezethet. A glükóz-6-foszfát gátlása jelentősen növeli néhány gén mRNS szintjét, többek között a Glut-2 transzporter, a glikogén szintetáz, a glükóz-6-foszfát katalitikus alegysége és az enzimhez tartozó transzlokátor, továbbá a glikolízis és a lipogenezis néhány enzimét (pl. piruvát kináz, glükokináz, acetyl koenzim-A karboxiláz, zsírsav szintetáz) [20].

Összegezve a glükóz-6-foszfát inhibitorai koncentrációtól függően két lehetséges módon hatnak a II. típusú diabéteszre:

- kis koncentrációban csökkentik a vér glükóz-koncentrációját és megváltoztatják a lipogenezis néhány génjének az expresszióját;
- nagy koncentrációban hipoglikémiás hatásuk van, mivel a glükóz-6-foszfát aktivitása nélkülözhetetlen a glükoneogenezisben és a glikogénolízisben.

2.1.3 A glükoneogenezis gátlása a fruktóz-1,6-biszfoszfát inhibitoraival

A glükoneogenezis enzimeinek (foszfoenol-piruvát karboxikináz és fruktóz-1,6-biszfoszfát) aktivitását a glükagon és az inzulin szabályozza. Az enzimek aktivitása megemelkedik inzulinrezisztens és diabéteszes állatmodellekben, ezért a két enzim az antihyperglykémikus kutatások lehetséges célpontja [21, 22].

A fruktóz-1,6-biszfoszfát a májban és a vesében expresszálódik: a fruktóz-1,6-biszfoszfát defoszforilációját katalizálja fruktóz-6-foszfáttá. Az enzim tetramer szerkezetű és két fontos fiziológiai inhibitora van: az AMP és a fruktóz-2,6-biszfoszfát, amelyek az enzim allosztérikus és katalitikus kötőhelyéhez kapcsolódnak. Az első ilyen gátlószer az AICAR-monofoszfát (ribóz 5-amino-4-imidazol-karboxamid származéka), amely a májban AMP analóggá, a vegyület foszfát származékává alakul, ami gátolja az enzim katalitikus aktivitását [23]. Ezzel párhuzamosan egy másik kutatócsoport olyan AMP származékokat vizsgált, amelyek az enzim allosztérikus helyéhez kötődve gátolják az aktivitást. A vegyületek primer hepatocitákban és elhízott ZDF állatokban

csökkentették a vércukor koncentrációját [21]. A glükoneogenezis gátlásával párhuzamosan a glikogenolízis aktiválódik. A metabolitok elemzése emelkedett fruktóz-1,6-biszfoszfát szintet mutatott és a glükoneogenezis más intermedierjeinek a szintje is megemelkedett (pl. glicerol-3-foszfát), ellenben a glükóz-6-foszfát szintje nem változott.

Elhízott ZDF patkányokat (II típusú diabétesz, vércukorszint 12 mmol/L) két hétig 40 mM MB06322-vel (fruktóz-1,6-biszfoszfátáz inhibitor) kezelve normalizálódott az állatok plazma glükóz-koncentrációja. Hat hét kezelés után növekedett az állatokban a plazma inzulin koncentrációja és csökkent a vér szabad zsírsav és triglicerid koncentrációja. A kezelés nem volt hatással az állatok izulinszenzitivitására [21]. A rendelkezésre álló adatok alapján elmondható, hogy a diabétesz kezelése fruktóz-1,6-biszfoszfátáz inhibitorral normalizálja a hiperglikaemia tüneteit, stimulálva a glikogenolízist és gátolva a glükoneogenezist.

2.1.4 A glükokináz aktivátorai

A glükokináz a glikolízis első lépését katalizálja a májban: a glükóz foszforilációját a hatodik szénatomon. Az enzim a májban a pankreász β sejtjeiben és egyéb glükózszenzitív sejtekben expresszálódik, ahol egyfajta glükózszenzorként viselkedik, ami az inzuliszekréciót aktiválja [24]. A glükokináz viszonylag magas K_M értéke magyarázza, hogy a vércukor-koncentráció kismértékű emelkedése fokozza a glükóz foszforilációját, vagyis a májban a glükózfelhasználást, ami a vércukorszint csökkenéséhez vezet [25]. Ennek megfelelően a glükokináz aktivitásának a változtatása jelentősen befolyásolhatja a vér glükóz-koncentrációját. A glükokináz lehetséges terápiás felhasználását a diabétesz kezelésében az is alátámasztotta, hogy az enzim egyik természetes mutációja csökkenti a glükóz iránti érzékenységet és ezzel diabétesz alakul ki (MODY, Maturity-Onset Diabetes of the Young) [24], [26].

A máj glükokináz szabályozásában egy 68 kDa tömegű fehérje játszik szerepet, ami a glükózzal kompetícióban feje ki a hatását. A glükokináz és a regulátor fehérje kötődése függ a glükóz, és a fruktóz-1-foszfát koncentrációjától. A glükokináz a regulátor fehérjéhez kötődve alacsony glükóz-koncentráció esetén (<5 mM) a magban

található inaktív állapotban, viszont ha növekedik a glükóz koncentrációja a glükokináz disszociálódik a regulátor fehérjéről és a citoplazmába transzlokálódik [27].

A glükokináz aktiválásának az egyik lehetséges módja, hogy az enzim és a regulátor fehérje disszociációját elősegítve az enzim aktív állapotba kerül [28]. Az enzim aktiválódásához nem elég leválasztani a regulátor fehérjéről, mivel az enzim konformációváltozása is szükséges a glükóz foszforilációjához: a glükokináznak az inaktív nyitott konformációból egy aktív, zárt konformációba kell átalakulnia. Jelenleg nem ismeretes olyan aktivátor, amely képes lenne a glükokináz konformációját megváltoztatni.

Ismeretes olyan glükokináz aktivátor (Ro-281675), ami másfélszeresére fokozza az enzim aktivitását. A vegyület dóziszfüggően csökkenti a vér glükóz-koncentrációját, diabéteszes állatokban és 40 hetes kezelés megelőzi a hiperglikemia kialakulását HFD etetett egerekben [29].

Azonosítottak egy triszubsztituált benzolszármazékot is, ami növeli a glükokináz aktivitását [30]. A vegyület hatása összetett, mivel hepatocitákban stimulálja a glükóz foszforilációját, a glikolízist, a glikogénszintézist és elősegíti az enzim transzlokációját a sejtmagból a citoplazmába [31].

Ismert olyan vegyület is (triazol-benzamid származék), amely a glükokináz glükóz iránti affinitását és a reakció sebességét is jelentősen fokozza. A vegyület hepatocitákban növeli a glükóz foszforilációját, a glikogén szintézist és gátolja a glükoneogenezist dihidroxi-acetonból [32].

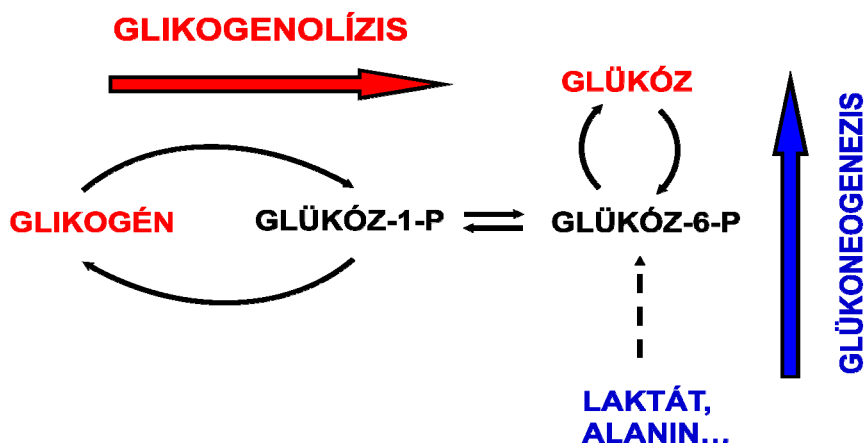
2.2. A glikogénanyagcsere általános bemutatása

Az emberi szervezetben a glükóz lebontása/raktározása/felhasználása bonyolult enzimatikus és hormonális szabályozás alá esik. A glükóz a májban és az izomban glikogén formájában raktározódik. A glikogén egy elágazásokat tartalmazó polimer, ahol a láncban a glükózmolekulák α -1,4 kötéssel, az elágazásokban pedig α -1,6 kötésekkel kapcsolódnak egymáshoz. Az izom- és májglikogén funkciója az anyagcserében különbözik egymástól, így a glikogén metabolizmus szabályozása is eltérő a májban és az izomban.

Az izomban a glikogénből felszabaduló glükóz-1-foszfát a glikolízisbe kerül. Az izomglikogén az izomsejt energiaraktára, amely a fokozott izomműködés megnövekedett energiaszükségletét fedezi. A szervezet vércukorszintjét és a glikogén metabolizmusát tanulmányozva a máj az egyik legfontosabb szerv, mivel a májban lévő glikogénraktárak nagymértékben felelősek a vér glükóz-koncentrációjának megfelelő szinten tartásában, itt szabályozódik a glükóz átalakítása glikogénné és trigliceridekké.

Szükség esetén a glükóz szintézise is a májban játszódik le glikogenolízissel és glükoneogenezissel. A szabad glükóz molekulák a glükóztranszporter-fehérjék (GLUT) segítségével jutnak át plazmamembránon, majd a különböző sejtekben más és más átalakulásokban vesznek részt. A legjelentősebb glükóztranszporter a GLUT2, ami a májsejtekben, hepatocitákban található [33]. Ez a transzporter kétirányú és szerepe a máj szinuszoidban a glükóz-koncentráció egyensúlyának fenntartása.

A glikogénszintézis és lebontás két kulcsenzime a glikogén foszforiláz (GF) és a glikogén szintetáz (GS). Mindkét enzim foszforilált és defoszforilált formában egyaránt létezhet, és a foszforiláció ellentétesen befolyásolja a két enzim aktivitását. A glikogén szintézise magában foglalja a glükóz glükokináz által katalizált átalakulását glükóz-6-foszfáttá, majd a glükóz-6-foszfát átalakulását glükóz-1-foszfáton keresztül UDP-glükózzá, ami a glikogén szintetáz közvetlen szubsztrátja. Májban glükóz keletkezhet glükoneogenezisen keresztül is pl. laktátból és egyéb prekursor molekulákból (2. ábra).

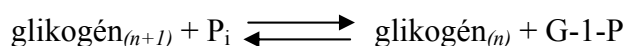


2. ábra. A glükóz és a glikogén átalakulásainak sémája májban

Májban, az adenilát-cikláz működését stimuláló glükagon a cAMP koncentrációjának növelésével aktiválja a cAMP-függő protein kinázt, ami a foszforiláz kináz foszforilációját követően GFa képződéséhez vezet és ez által a glikogén lebontása beindul.

2.3. A glikogén foszforiláz jellemzése

A GF a glikogén lebontásának első lépését katalizálja:



A reakcióegyenletben n a glikozilegységek számát jelöli. Mivel a katalizált reakció egyensúlyi állandója $K = [\text{P}_i]/[\text{G-1-P}] = 3,6$ és a sejtekben a P_i nagy feleslegben van, a reakció *in vivo* a glikogén lebontásának irányában játszódik le. A $\text{P}_i/\text{G-1-P}$ arány csökkentésével (pl. a G-1-P koncentráció növelésével) *in vitro* a GF a glikogén szintézisét is képes katalizálni.

Az enzim szisztematikus neve: 1,4- α -D-glükózil-transzferáz (EC 2.4.1.1), felfedezéséért C. F. Cori és G. T. Cori 1947-ben orvosi Nobel-díjat kapott. Az enzim foszforilációval és defoszforilációval történő regulációjának felismeréséért az 1992. évi orvosi Nobel-díjat két kutató vehette át megosztva: E. H. Fisher és E. G. Krebs [34, 35]. Kísérleteik bebizonyították, hogy a GF enzimaktivitását reverzibilis foszforiláció irányítja. A glikogén mobilizálása (szintézis és lebontás) két enzim (GF és GS) aktivitásának foszforilációval és defoszforilációval történő módosításán alapszik.

A GF glikogénnel összekapcsolódva ún. protein-glikogén-komplexben található. Legnagyobb mennyiségben, az izmokban és a májban fordul elő, de kis mennyiségben szinte minden szövetben megtalálható. Az emlősökben a GF három szervspecifikus izoenzimje ismert: vázizom-, máj-, és agyfoszforiláz. Ez utóbbit szív típusú vagy főtális izoenzimnek is nevezik [36]. Az aminosavszekvencia összehasonlítása alapján megállapították, hogy az izoenzimek szerkezete nagymértékben megőrződött az evolúció során és másodlagos szerkezetük is jelentősen hasonlít [37].

A GF enzimekről összegyűjtött ismeretanyag jelentős részben a nyúl vázizomból származó enzim vizsgálatán alapszik, lényegesen kevesebb adat áll rendelkezésünkre

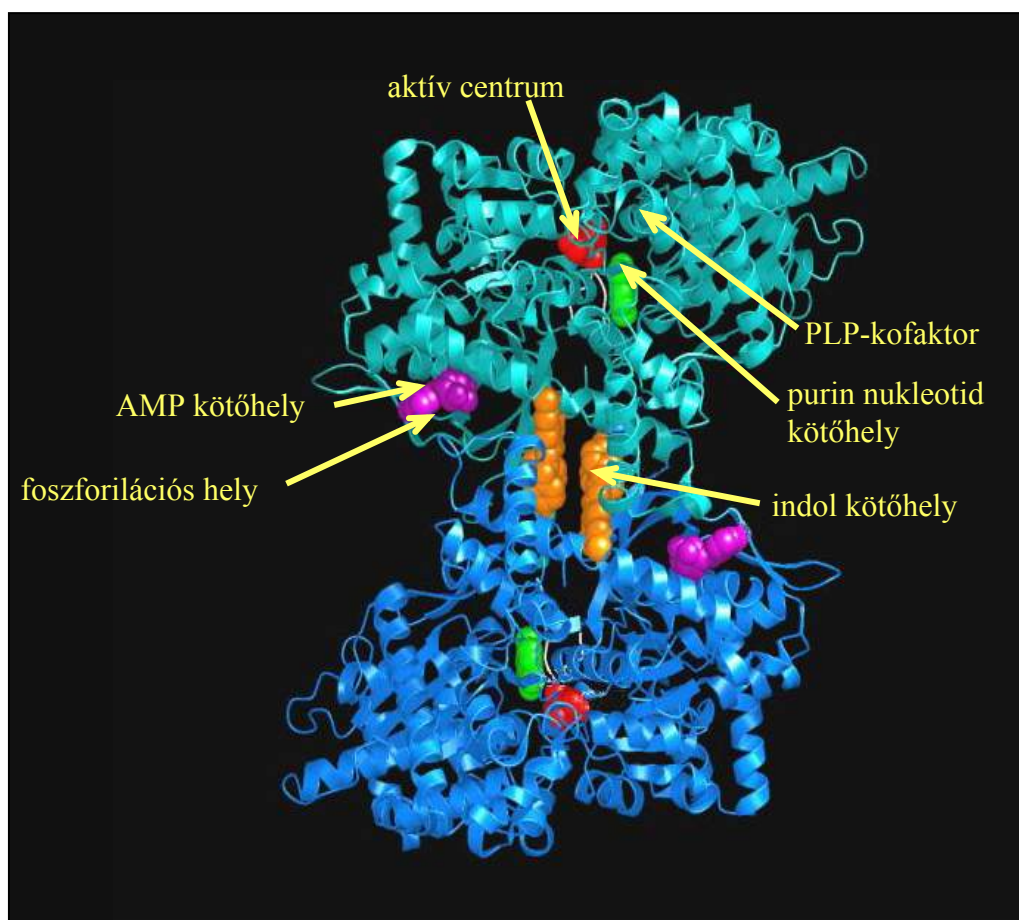
más szövetekből, ill. más élőlényekből nyerhető foszforilázokról. Alegységenként egy piridoxál-5'-foszfát prosztetikus csoportot és egy foszforilálható helyet (Ser-14) tartalmaz [38]. Fiziológias körülmények között két azonos alegységből álló dimer formájában fordul elő, de *in vitro* inaktív tetramert is képezhet. A dimer egy-egy alegységének a molekulatömege 97000 Da.

A táplálékból felszívódott glükóz a vérbe jut, koncentrációját a máj komplex enzimrendszere szabályozza. A felvett glükóz elsősorban glikogén formájában raktározódik, főként a májban, az izomban és más szövetekben.

2.3.1 A foszforiláz szerkezete: kontaktfelszínek és kötőhelyek

A nyúl vázizom GFb háromdimenziós szerkezete röntgendiffrakciós vizsgálatok alapján vált ismertté [39]. Egy alegység két fő szerkezeti egységre osztható: az N-terminális doménre (1-485 aminosav) és a C-terminális doménre (486-841 aminosav), melyek találkozási helyénél van az aktív centrum.

Röntgenkrisztallográfiás vizsgálatokkal öt ligandkötő helyet mutattak ki az enzim felszínén [40]. Az aktív centrumhoz kötődnek a szubsztrátok, valamint az ezekkel kompetitív módon ható inhibitorok. Itt található a piridoxál-5'-foszfát koenzim is, melynek foszfátcsoportja esszenciális az aktivitás szempontjából, ugyanis részt vesz a sav katalizálta foszforolitikus reakcióban (3. ábra).



3. ábra. A dimer glikogén foszforiláz szerkezete és kötőhelyei [41]

A vizsgálatok rámutattak arra a tényre, hogy a glikogén kötődését utánozó oligoszacharid egy, az aktív centrumtól távolabb található glikogén kötőhelyhez kapcsolódik. Valószínűsítik, hogy a GF ezen a kötőhelyén kapcsolódik nagy molekulatömegű szubsztrátjához a protein-glikogén komplexben is. Az így rögzített enzim képes bontani a nem redukáló végeket az elágazó szerkezetű glikogénben. A poliszacharid bontására azonban csak a glikogén 1-6 elágazási pontjától számított negyedik glükóz egységig képes a GF, a további lebontáshoz az elágazást megszüntető segédenzim jelenléte szükséges.

1. táblázat. Ligandok kötődése a glikogén foszforilázhoz

Ligand	Aktív centrum	AMP kötőhely	purin nukleotid kötőhely	Glikogén kötőhely	Indol kötőhely
Szubsztrát					
vagy termék					
G-1-P	+	(+)	-	-	-
P _i	+	(+)	-	-	-
glikogén	+	(+)	-	(+)	-
Aktivátor					
AMP	-	+	(+)	-	-
IMP	-	+	(+)	-	-
Inhibitor					
ATP, ADP	-	+	(+)	-	-
G-6-P	-	+	(+)	-	-
glükóz	+	-	-	-	-
UDPG	+	(+)	-	-	-
adenozin	-	+	-	-	-
koffein	-	(+)	+	-	-

+erős kötődés; (+) gyenge kötődés; - kötődés nem figyelhető meg.

A GF-ben két regulátor helyet találtak. Az aktív centrum kapujához közel található ezek egyike: a nukleozid kötőhely. Az ide kötődő anyagok gátolják a szubsztrát bejutását az aktív helyre, mely az enzim gátlásához vezet. Távolabb a két alegység kapcsolódási pontjához közel található a nukleotid kötőhely, ahová a GF aktivátorai az AMP és az IMP kötődnek. Az aktivátorokkal kompetitív módon kötődő inhibitorok képesek az aktivátorokat erről a helyről leszorítani, ezáltal fejtve ki gátló hatásukat. A nukleotid kötőhely közelében található az N-terminális farok a Ser-14

oldalláncsal, mely a foszforiláz kináz által katalizált reakcióban foszforilálódik, ill. a protein foszfataz-1 által katalizált reakcióban defoszforilálódik. A különböző ligandok kötődését a GF jellemző kötőhelyeihez az *1. táblázat* foglalja össze.

Az enzim újonnan felfedezett indol kötőhelyéhez hosszabb oldalláncot és heterociklusos gyűrűt tartalmazó vegyületek kapcsolódnak nagy affinitással. Az ide kapcsolódó inhibitorok nagyon kis gátlási állandóval rendelkeznek [40, 42, 43].

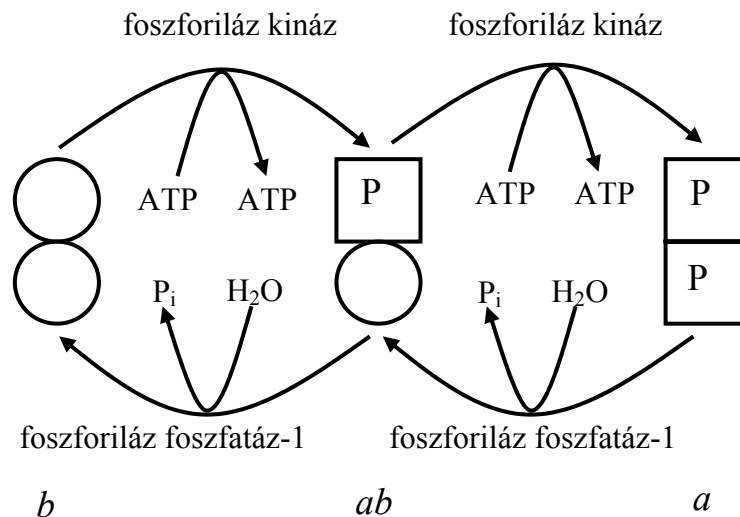
A GF natív formájában két azonos alegységből álló dimert képez. A dimerben az alegységek egymással komplementer felszínei egy kétforgású szimmetriatengely mentén érintkeznek egymással. A dimer enzim alegységeinek kapcsolódását elsősorban ionos, valamint hidrogén- és van der Waals-kötésekkel a „sapka” és a nukleotid kötőhely biztosítja [44].

In vitro körülmények között az enzim tetramert is képezhet. A GFb elsősorban dimer, nagy koncentrációban, AMP jelenlétében tetramert alkothat. A tetramer képződés összhangba hozható az enzim allosztérikus, ill. foszforilációval történő aktivitásával. A képződött GF tetramer formában nem mutat katalitikus aktivitást [45]. Tetramerizációját fokozza a növekvő enzimfehérje-koncentráció és az alacsony hőmérséklet [46]. A hőmérséklet emelése, glikogén, glükóz, koffein és a nagy sókoncentráció a dimerizáció irányába hat [47]. A glikogén hatásától eltekintve megállapítható, hogy az enzim aktív R (relaxed, lazított) konformációja inkább képez tetramert mint az inaktív T (tight, szoros) konformáció. A glikogén az ún. glikogén kötőhelyen keresztül kapcsolódik az enzimhez és nem a konformációváltozás, hanem a nagy térigénye miatt gátolja a tetramer képződést. Ez azt jelenti, hogy fiziológias körülmények között a GF dimer formában található a protein-glikogén komplexben.

2.4. Reverzibilis foszforiláció jelentősége a glikogénanyagcserében

Számos enzim ismert, melynek foszforilált és defoszforilált alakja eltérő katalitikus aktivitással bír. Ennek legrégebben ismert és legalaposabban tanulmányozott példája a glikogénlebontás kulcsenzime a GF, három egymásba alakítható formában létezik, melyek egymástól foszforiláltságuk mértékében különböznek (*4. ábra*).

A nem foszforilált *b* forma (GF_b) önmagában inaktív. Aktivitása csak AMP vagy IMP jelenlétében mutatható ki. A dimer fehérje egy alegységén részlegesen foszforilált *ab* forma már részben aktív, ami fokozható a fent említett aktivátorokkal [48, 49].



4. ábra. A glikogén foszforiláz különböző alakjai: defoszforilált *b*, részlegesen foszforilált (hibrid) *ab* és foszforilált *a*; □ foszforilált, aktív alegység; ○ nem foszforilált, inaktív alegység.

Teljes katalitikus aktivitással a maximálisan foszforilált GF_a rendelkezik. A három forma foszforilációs-defoszforilációs folyamatok révén alakulhat át egymásba. A foszforilációs folyamatot a foszforiláz kináz enzim katalizálja, mely egyetlen foszfátcsoportot épít be az ATP-ből a fehérje N-terminális szakaszán található Ser-14 oldalláncra. A beépülés olyan konformációváltozást idéz elő az alegységben, amely megnyitja a katalitikus centrumhoz vezető utat, így az enzim aktiválódik.

2.5. A glikogén szintetáz

A glikogén szintézisének kulcsenzime a GS egy 85 kDa tömegű oligomer, amely $\alpha(1,4)$ -glükózid kötések kialakulását katalizálja a glikogén primerhez, UDP-glükózt használva donorként. Az enzimnek két izoformája létezik az izom és a máj specifikus. A máj izoforma 70 % azonosságot mutat az izom formával és hét foszforilációs helyet

azonosítottak, kettőt az N-terminális szakaszon, ötöt az enzim C-terminális szakaszán [50]. A GS regulációja három mechanizmus szerint történhet: foszforilációval/defoszforilációval, allosztérikus effektorral pl. glükóz-6-foszfáttal, ami az élő szervezetben a fő fiziológiai regulátora az enzimnek [51], valamint az enzim szintézisével.

A GS foszforilációval/defoszforilációval a GF-hez képest ellentétesen szabályozható: a GS foszforilált formája inaktív (GSb) és defoszforilált formája aktív (GSa). A GS *in vitro* körülmények között számos kinázzal foszforilálható többek között cAMP-függő protein kináz, PKC, kazein kináz 1 és 2, foszforiláz kináz és GSK-3 enzimek [52]. Ezen foszforiláció inaktiválja az enzimet és csökkenti az enzim szubsztrát (UDP-glükóz) iránti affinitását. Az enzim foszforilált, inaktív formája aktiválható allosztérikus aktivátorral, a glükóz-6-foszfáttal, amely az enzim aktív centrumához kötődve szerkezetváltozást hoz létre: a GS aktív centruma „nyitott” állapotba kerül elindítva a glikogén szintézisét [51].

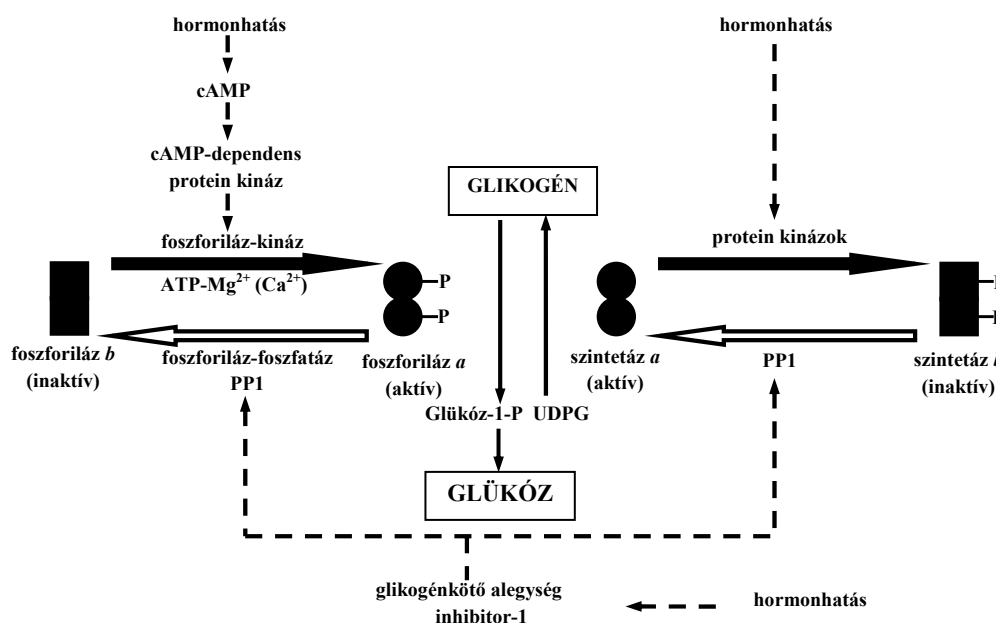
A glükóz-6-foszfátnak nemcsak mint allosztérikus aktivátornak van szerepe a glikogén szintézisében, hanem a foszforilált, inaktív enzimhez kötődve is segíti annak defoszforilációját (aktiválódását), mivel a térszerkezeti módosítások hatására az enzimet a PP1 könnyebben tudja defoszforilálni [51, 53]. A glükóz-6-foszfát aktiváló és defoszforilációt elősegítő hatását a szervezetben a hormonok működésével (glükagon, adrenalin) megnövekedett aktív, foszforilált GFa gátolja [53, 54].

2.6. A glikogénanyagcsere szabályozása

A foszforilációs reakciósorozatban szereplő protein kinázok aktivitását elsődlegesen a cAMP és a Ca^{2+} -ion szabályozza. A májban a GF aktiválódásának (foszforilációjának) fő hormonális serkentője a glükagon. A glükagon stimulálja az adenilát-cikláz működését, mely emeli a cAMP koncentrációt. Ez utóbbi aktiválja a cAMP-függő protein kinázt, ami a foszforiláz kináz foszforilációját követően a GFa képződéséhez vezet, így a glikogén lebontása beindul. A foszforiláz kináz aktivitását a Ca^{2+} -koncentráció módosítja, pl. májban vazopresszin hatására is fokozódik az enzim aktivitása [55]. Az adrenalin hatására megemelkedő Ca^{2+} -ion koncentrációval szintén

fokozható az enzim aktivitása. Hasonló hatású a vazopresszin, az oxitocin és az angiotenzin II is [56].

A máj GFa allosztérikusan is szabályozódik a glükóz által. Emelkedett vérglükóz-koncentráció esetén a glükóz bekerülve a májsejtbe a GFa-hoz kötődve konformációváltozást okoz. A konformációváltozás miatt a PP1 könnyen tudja defoszforilálni a GF enzimet és a glikogén lebontás leáll (5. ábra).



5. ábra. A glikogénanyagcsere vázlatos sémája májban

A glikogén lebontásának (és szintézisének) sebességét nemcsak a foszforilációs reakciók határozzák meg, hanem a defoszforilációs folyamatok is. Így a szabályozásban szerepet játszanak a foszfoprotein foszfatazok is. A glikogén mobilizálása szempontjából különösen jelentős a GFa defoszforilációja (inaktiválása), mivel ez biztosíthatja a szövetekben képződött GFa „élettartamát” és ezzel a glikogénlebontás mértékét. Az inzulin hatására bekövetkező defoszforilációs folyamatok fontos résztvevője a PP1 enzim. A PP1 katalizálja a GF aktív formájának a defoszforilációját (inaktiválódását) és vele párhuzamosan a GS aktiválódását [57]. Ez a defoszforilációs

kaszkád leállítja a glikogén lebontását és elindítja a glikogén szintézisét. A PP1 specificitását a glikogénkötő alegység kötődése a foszfatáz katalitikus alegységéhez befolyásolja. Ez a szövetspecifikus fehérje (izomban G_L , májban G_M) irányítja a PP1 katalitikus alegységét a GF-hez, a foszforiláz kinázhoz vagy a GS-hez [58].

A máj glikogénanyagcserében a foszforiláz kináz, a GFa és a GSb defoszforilációját a PP1 enzim katalitikus alegységének és a glikogénkötő alegységének komplexe katalizálja. Míg a máj foszforiláz kináz defoszforilációjáról keveset tudunk, a májban a GF és a GS aktivitásának összehangolt szabályozási mechanizmusa jól ismert. A májban a GS aktivitásában latencia figyelhető meg, mivel a GFa allosztérikus gátlószere a szintetáz foszfatáznak: a GS defoszforilációja csak akkor kezdődhet meg, amikor a GFa koncentrációja már jelentősen lecsökkent [53, 59]. A latencia csökkenthető a GFa defoszforilációjának fokozásával, pl. glükóz vagy glükózszármazékok hozzáadásával [60]. A latencia oka kettős: a GFa természetes gátlószere a GS-nek (az IC_{50} nanomól koncentrációtartományba esik) [61]. A második ok egy kicsit összetettebb: a GFa megköti a májban a glikogénkötő alegységet (G_L), így nem tud létrejönni a G_L -PP1 komplex ilyen módon „gátolva” a PP1 GS foszfatáz aktivitását [58].

2.7. A glikogén foszforiláz inhibitorai

A GFa a glikogén lebontásának az első lépését katalizálja, ezért közvetlenül felelős a vér glükóz-koncentrációjának emeléséért. Számos munkacsoport célozta meg a glikogén foszforilázt, mint lehetséges célmolekulát, mivel gátlásával csökkenthető a májglikogénből felszabaduló glükóz mennyisége. Az enzim dimer formáján öt olyan helyet fedeztek fel (3. ábra), amely alkalmas arra, hogy megfelelően tervezett gátlószerekkel az enzim katalitikus aktivitását gátoljuk.

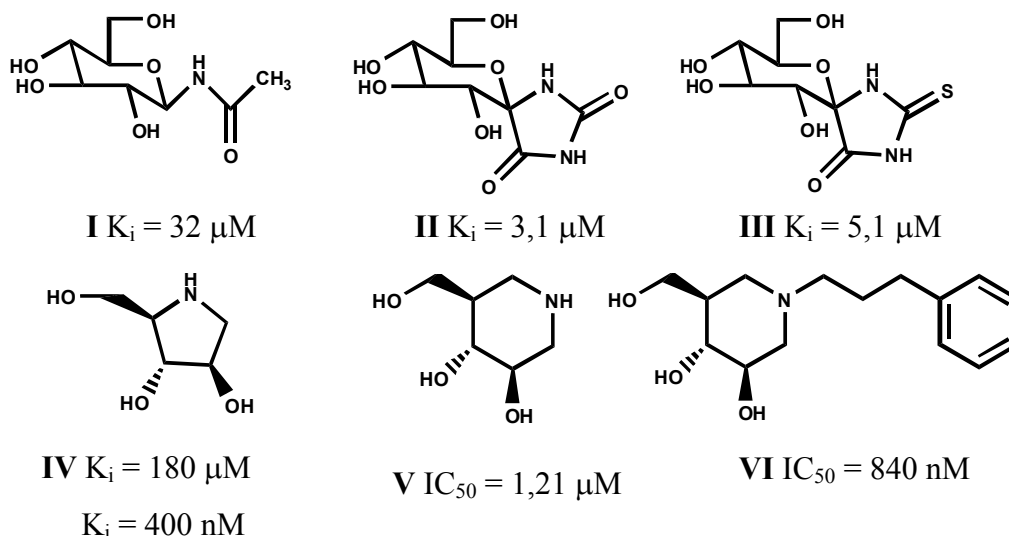
2.7.1. Az aktív centrum gátlószerei

Az inhibitorok tervezésének egyik lehetséges módja, hogy az enzim szubsztrátjának a szerkezetét alapul véve hasonló szerkezetű molekulákat terveznek,

amelyek az enzimek aktív centrumához kapcsolódva fejtik ki gátló hatásukat. Mivel a GF természetes gátlószere a glükóz és katalitikus működése során glikogénből glükóz-1-foszfátot készít, így egyértelmű volt, hogy a gátlószerek tervezésénél a különböző munkacsoportok a glükóz szerkezetű molekulákat részesítik előnyben.

A glükóz az enzim aktív centrumához kötődve, képes az enzimet gátolni (α -D-glükóz, $K_i = 1,7$ mM; β -D-glükóz, $K_i = 7,4$ mM) [62]. A glükóz gyenge inhibitor, ezért számos kutatócsoport a glükózból kiindulva olyan molekulákat szintetizált, amelyek a GF jobb gátlószerei.

Az első glükóزالapú inhibitor, amelynek gátlási állandója a mikromól koncentrációtartományban volt ($K_i = 32$ μ M) az N-acetil- β -D-glükopiranozil-amin (6. *ábra I* molekula) [63]. Ezt követően a glükóz 1-es C-atomján végzett módosításokkal állítottak elő hatékonyabb inhibitorokat. Ezeknek a módosításoknak köszönhetően az 1-es C-atomon hidantoin-gyűrűt tartalmazó vegyületet (6. *ábra II* molekula) [64], illetve egy O-atom S-atomra cserélésével tiohidantoint tartalmazó molekulát szintetizáltak (6. *ábra III* molekula) [65]. A kéntartalmú analóg gátlási állandója hasonló, de szintézise gyors, sztereoszelektív és hatékony [66]. A vegyület biokémiai és élettani jellemzőit az Eredmények fejezetben mutatjuk be. Hatékonyabb gátlószerek szintetizálásához nem feltétlenül kell új csoportot kapcsolni a glükóz 1-es C-atomjához, hanem a már korábban említett acetyl- β -D-glükopiranozil-amin molekulájában a metilcsoport cseréjével számos új hatékony gátlószert állítottak elő [67-69]. Az utóbbi években több munkacsoport számos glükóزالapú vegyületet tervezett és szintetizált, amelyek gátlási állandói igen széles tartományba esnek [68-70].



6. ábra. A glikogén foszforiláz aktív centrumához kötődő inhibitorok és gátló hatásuk (K_i vagy IC_{50}) nyúl vázizomból preparált GFb-re

A glükózanalóg vegyületek mellett iminocukrok hatását is vizsgálták a foszforiláz enzim aktivitására. A kereskedelmi forgalomban kapható didezoxi-imino-D-arabinitol (DAB), az enzim jó gátlószere (6. ábra IV molekula). A molekula a röntgenkristallográfiás adatok alapján a GF aktív centrumához kötődik nagy affinitással ($K_i = 400 \text{ nM}$ a glikogén lebontás irányában és $K_i = 180 \mu\text{M}$ a glikogén szintézis irányában [71, 72]). Egy másik hasonló vegyület az izofagomin (6. ábra V. molekula) és N-szubsztituált származéka (6. ábra VI molekula), amely vegyületek szintén a GF aktív centrumához kötődnek (izofagomin: $\text{IC}_{50} = 1,21 \mu\text{M}$, származéka: $\text{IC}_{50} = 840 \text{ nM}$). Mindkét vegyület már mikromól koncentrációban gátolja a glükagon aktivált glikogenolízist patkány májból izolált hepatocitákban [73, 74].

2.7.2. Az AMP kötőhely inhibitorai

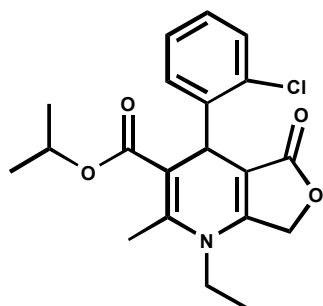
Az AMP a GF allosztérikus aktivátora. A nukleotid az enzim felületéhez kötődve olyan szerkezeti változást hoz létre, amely az enzim inaktív formájánál megnyitja az aktív centrumot és aktiválja az enzimet [67]. Az AMP a GF aktív

foszforilált formájához (GFa) is kötődik, és annak katalitikus aktivitását tovább növeli. Néhány munkacsoport olyan vegyületek szintézisével próbálkozott, amelyek az allosztérikus kötőhelyhez kapcsolódva olyan térszerkezet változást hoznak létre, amivel az enzim katalitikus aktivitása gátolható.

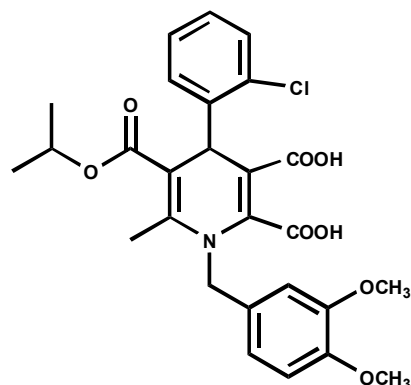
Kutatók egy dihidropiridin származékot állítottak elő (BAY W 1807), ami az enzim AMP kötőhelyéhez kötődik és stabilizálja a T-szerkezetet (7. ábra VII molekula: $K_i = 1,6 \text{ nM}$) [75]. A röntgenkristallográfiás adatok alapján a molekula a GFb-hez kötődve kiszorítja az AMP-t és stabilizálja a T-állapotot, gátolva ezzel a glikogénlebontást.

Más kutató csoport is próbálkozott hasonló vegyületek szintézisével és találtak egy módosított dihidropiridin származékot, ami szintén az enzim allosztérikus AMP kötőhelyéhez kapcsolódva fejt ki gátló hatását (7. ábra VIII molekula: $IC_{50} = 4 \text{ nM}$ humán máj GFa-ra) [76].

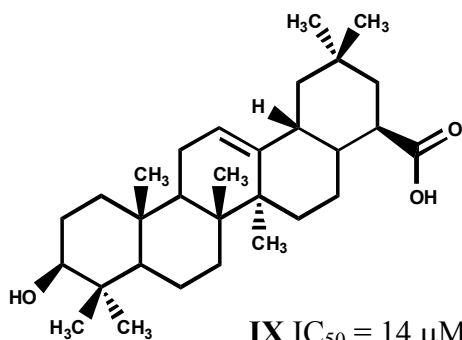
Mindkét molekula hatását vizsgálták patkány májból izolált primer hepatocitákban a glükagon hatására bekövetkező glikogenolízisre. Az eredmények alapján mindkét vegyület hatásosan gátolja májsejtekben a glükóz felszabadulást [76].



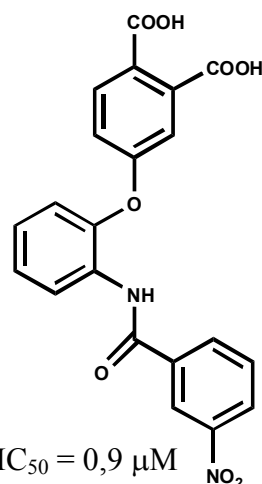
VII $K_i = 1,6 \text{ nM}$



VIII $IC_{50} = 4 \text{ nM}$



IX $IC_{50} = 14 \text{ }\mu\text{M}$



X $IC_{50} = 0,9 \text{ }\mu\text{M}$

7. ábra. A glikogén foszforiláz AMP aktivátor helyéhez kötődő gátlószerek

Az oleánsav ma is használatos hepatitisz ellenes gyógyszer Kínában. A vegyület egy pentaciklusos triterpén (7. ábra IX molekula) [77, 78], amelynek csak nemrég fedezték fel az *in vivo* hipoglikaemiás hatását, valamint a GF-re gyakorolt gátló hatását [78]. Előállították a vegyület több szubsztituált származékát is, amelyek gátlási állandóit jelentősen befolyásolják a pentaciklushoz kapcsolt szubsztituensek [79].

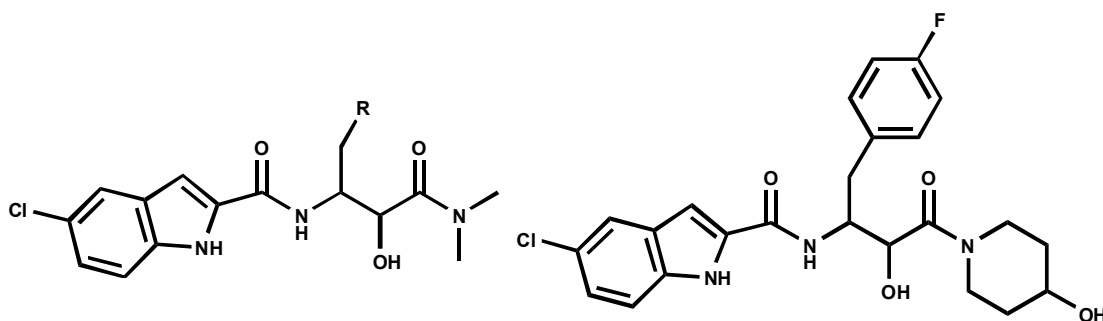
Több kutatócsoport nem csak egy lehetséges gátlóhelyre tervez és szintetizál gátlószereket, hanem több gátlóhelyhez is terveznek lehetséges inhibitorokat. Olyan ftálsavat tartalmazó vegyületcsoportot is szintetizáltak, amely elsősorban az AMP kötőhelyhez kapcsolódva fejti ki gátló hatását (alapvegyület a 7. ábra X molekula: $IC_{50} = 0,9 \text{ }\mu\text{M}$) [80].

2.7.3. Az indol kötőhely inhibitorai

2000-ben azonosították a GF egy addig nem ismert inhibitor kötőhelyét a monomerek kapcsolódásánál. Az új kötőhely felismerésénél már korábban azonosítottak egy indol-származékot (innen az indol kötőhely elnevezés), amely az enzim nagyon jó gátlószerének bizonyult [81]. A Pfizer kutatói által szintetizált molekulákat a 8. ábra mutatja be a gyógyszergyári elnevezést használva (CP-91149: **XI** molekula; CP-316819: **XII** molekula; CP-320626: **XIII** molekula). A leghatékonyabb inhibitornak a **XII** molekula bizonyult.

A vegyületek fiziológiai hatását, mint lehetséges orális antidiabetikumot, vizsgálták mind hepatocitákban, mind C57BL/6J (*ob/ob*) elhízott egerekben. Az eredmények alapján megállapították, hogy a vegyületek különböző koncentrációtartományban már 3 óra alatt dóziszfüggően csökkentették a plazma glükóz-koncentrációját [82], aktiválták a glikogén szintézisét [83]. A vegyületek nem csak az aktív GFa katalitikus aktivitását csökkentik, hanem az aktív GFa-hoz kötődve elősegítik az enzim inaktiválódását is [84-86].

Egy másik kutatócsoport is hasonló, jó gátlási tulajdonságokkal rendelkező vegyületet szintetizált (8. ábra **XIV** molekula) [87]. Az eddig bemutatott molekulák közös jellemzője, hogy a szerkezeti sajátosságaik alapján a GF indol kötőhelyéhez kapcsolódnak.



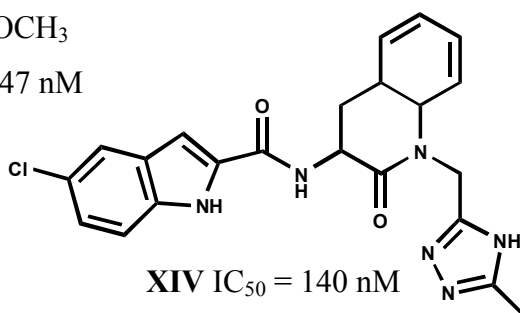
XI R = CH₃

IC₅₀ = 110 nM

XII R = OCH₃

IC₅₀ = 47 nM

XIII IC₅₀ = 205 nM

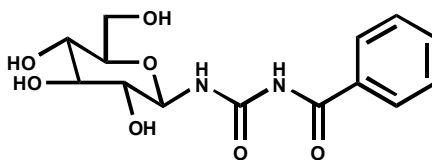


XIV IC₅₀ = 140 nM

8. ábra. A glikogén foszforiláz indol kötőhelynek inhibitorai

A gátlási állandók humán máj GFa-ra vonatkoznak.

Magyar kutatók olyan molekulát terveztek és szintetizáltak, az N-benzoil-N'-β-D-glükopiranozil karbamidot (9. ábra), ami az enzim két különböző kötőhelyéhez is kapcsolódik. A molekula a két funkciós csoportot (szénhidrát, illetve aromás) összekötő, egyszeres kötéseket tartalmazó rész rotációjából bekövetkező szerkezetváltozás miatt a GF két különböző gátlóhelyéhez is kapcsolódhat [40]. A molekula részletes vizsgálatát az Eredmények fejezetben mutatjuk be.



9. ábra. Az N-benzoil-N'-β-D-glükopiranozil karbamid

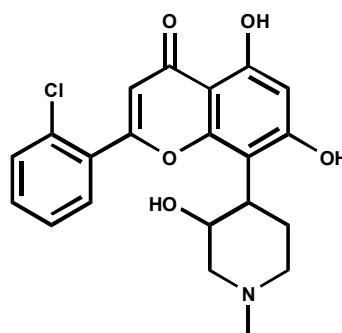
2.7.4. A purin nukleotid kötőhely inhibitorai

A GF kötőhelyei közül az egyik kevésbé „foglalkoztatott” gátlóhely a purin nukleotid kötőhely. A kötőhely az enzim katalitikus helyéhez közel helyezkedik el [38], ezért az ide kötődő molekulák allosztérikus hatással fejtik ki gátlásukat. A legismertebb, de nem a legjobb ide kötődő inhibitor a koffein (10. ábra XV vegyület), a molekula gátlási állandója glükóz jelenlétében $K_i = 1 \text{ mM}$ [88].

Egy másik vegyület a flavopiridol (10. ábra XVI vegyület), ami a purin kötőhelyen fejt ki a hatását, azonos a már korábban azonosított CDK2 (ciklin-dependens kináz) inhibitorral [89, 90]. Mindkét vegyület az aromás hidrofób csoportja segítségével kötődik az enzim apoláris csoportjaihoz [91] és úgy fejt ki a gátló hatását, hogy a glükózzal együtt kötődve stabilizálja az enzim T-állapotát [89].



XV $K_i = 100 \text{ mM}$



XVI $K_i = 1,16 \text{ }\mu\text{M}$

10. ábra. A purin nukleozid kötőhely inhibitorai

2.7.5. Glikogénkötőhely inhibitorai

Az enzimnek ehhez a kötőhelyéhez kapcsolódó gátlószerek igen gyenge inhibitorok. Az irodalomban nagyon kevés olyan vegyületet tartanak számon, ami ide kötődik. Ezek a vegyületek szerkezetileg a glikogénhez hasonlítanak. Ilyen inhibitorok pl. a γ -ciklodextrin ($K_i = 7,4 \text{ mM}$) és a maltoheptaóz ($K_i = 1 \text{ mM}$) [92, 93].

2.8. Állatkísérleti modellek a II. típusú diabétesz tanulmányozására

Az elmúlt évtizedekben számos állatkísérleti modellt állítottak be, amelyek alkalmasak a humán betegség patogenezisének tanulmányozására. Ezek a modellek igen eltérőek, és természetesen a molekuláris hátterük különböző. Közös jellemzőjük a magas vércukorszint és/vagy az inzulinrezisztencia. Az állatmodellekben genetikai módosításával, kémiai szerrel vagy táplálkozás következtében alakítanak ki a II. típusú diabétesz tanulmányozására alkalmas kísérleti hátteret.

Néhány egér és patkány törzset kiterjedten használnak a NIDDM patológiás állapotainak utánzására. Az *ob/ob* egerek a C57BL/6J eredeti törzs 6. kromoszóma autoszomális recesszív mutációja miatt leptint nem termelnek és elhíznak. Az egerekben enyhe hiperglikaemia és súlyos inzulinaemia alakul ki. A *db/db* egerekben a leptinreceptor mutációja figyelhető meg és 3-4 hónapos korban súlyos hiperglikaemia és hiperinzulinaemia alakul ki. A Zucker diabéteszes patkányok egyik beltenyésztett változata az eredeti Zucker patkányoknak (ezekben szintén leptinreceptor mutálódik és az elhízott felnőtt állatokban hiperglikaemia és inzulinrezisztencia alakul ki). A Zucker diabéteszes hím patkányokat magas vércukorszint és inzulinrezisztencia jellemzi, általánosan használják a II. típusú diabétesz modelljeként [94].

A kémiai és speciális diétával indukált diabétesz modellek [95] is elterjedtek a különböző vizsgálatokban. A kémiai anyagok közül az alloxán pankreász β -sejteket nekrotizáló hatását régen ismerik. A sztreptozotocin hasonló hatású, azonban molekuláris mechanizmusa összetettebb [96]. Mind az alloxán-, mind a sztreptozotocin-indukált állatkísérleti modelleket kiterjedten használják antihiperglikaemiás vegyületek tesztelésére az I. típusú diabéteszben.

2.9. Célkitűzések

A hiperglikaemia a II. típusú cukorbetegségben szenvedőknél elsősorban orális antidiabetikumokkal befolyásolható. A máj glükóztermelését komplex enzimszabályozza, amelynek egyik legfontosabb enzime a GF. A glikogén metabolizmusban betöltött központi szerepe miatt a GF-ra ható molekulák a gyógyszertervezésben jelentős figyelmet kapnak. Az enzim térszerkezete ismeretében a fehérje–ligandum kölcsönhatás sajátosságai jól vizsgálhatóak, ami elősegíti hatékony antihiperglikaemiás szerek kifejlesztését. A molekulák tervezésekor ismert GF-inhibitor komplexek röntgenkristallográfiával nyert, finomított szerkezetét vettük alapul.

Az értekezésben bemutatott vizsgálatok egyik célja az alábbiakban fogalmazható meg.

- Ismert szerkezetű glükózszármazékok hatása a GF katalitikus aktivitására. Az újonnan szintetizált vegyületek gátlóképességének meghatározása tisztított nyúl vázizom és máj foszforiláz enzimekkel. A gátlási adatok összehasonlítása az enzim aktív (GFa) és inaktív (GFb) formáira.
- A gátlási adatok kinetikai analízise: K_i , és/vagy IC_{50} meghatározása.
- A glükózszármazékok szerkezetének és gátlóképességének összehasonlítása.

A viszonylag jelentős mennyiségben előállítható és jó gátlási tulajdonságokkal rendelkező vegyülettel állatkísérletek végzése a molekula antihiperglikaemiás tulajdonságainak megismeréséhez.

- Wistar patkányok májában a glikogénanyagcsere tanulmányozása (vércukorszint, májglikogén-koncentráció meghatározása; GF és GS enzimek aktivitásának mérése, a két enzim defoszforilációjában bekövetkező latencia tanulmányozása a vegyület jelenlétében).
- Diabétesz modellek (sztreptozotocin-indukált és spontán diabéteszes Zucker patkányok) alkalmazása a vegyület vizsgálatában.
- A TH hatásának vizsgálata diabéteszes állatokban a plazma inzulinszintjére és az állatok inzulinszenzitivitására.

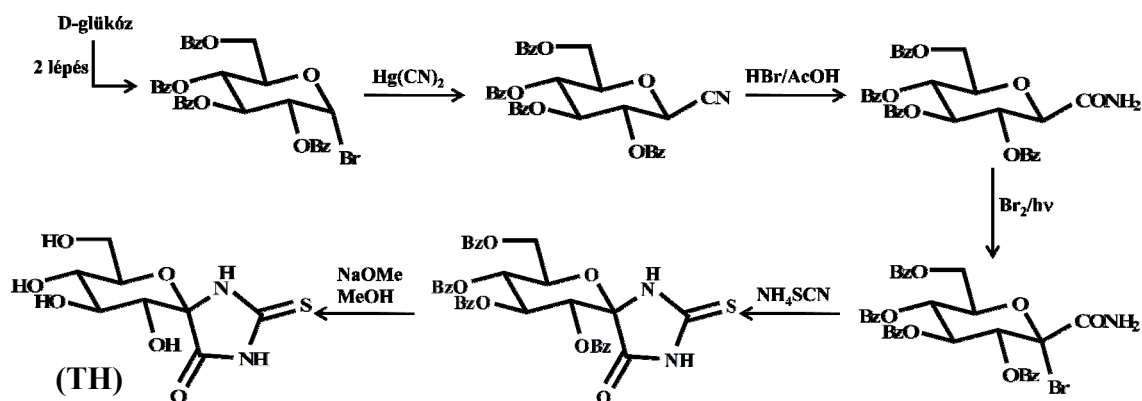
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Anyagok

A kísérletek során analitikai minőségű vegyszereket használtunk, amelyek a következő cégek termékei voltak. Sigma: β -D-glükóz-1-foszfát (G-1-P), glikogén, glükagon, inzulin, adenozin-5'-monofoszfát (AMP), ditioneitol (DTT), glükóz-6-foszfát (G-6-P); Spektrum 3D: Na- β -glicerofoszfát, sztreptozotocin, vas(II)-szulfát, tris-hidroxi-aminometán (TRIS), triklór-ecetsav (TCA); Reanal: etilén-diammin-tetraacetát (EDTA), *o*-fenantrolin-klorid, trietanol-amin, dimetil-szulfoxid (DMSO), digitonin; Merck: 2-merkapto-etanol (ME), benzamidin-klorid, fenilmetil-szulfonil-fluorid (PMSF); Pharmacia: Sephadex G-25, DEAE Sephacel; Serva: bovine-serum-albumin (BSA), Norrit A; Izotóp Intézet Kft.: [^{32} P]-ATP (10 TBq/mmol); Izinta Kereskedelmi Kft.: [^{14} C]-UDP-glükóz (10 TBq/mmol).

3.1.1. Glükopiranozilidén-spiro-tiohidantoin (TH)

Az első jó gátlási állandóval ($K_i < 10 \mu\text{M}$) rendelkező glükóزالapú GF gátlószer a glükopiranozilidén-spiro-hidantoin [64, 65]. Azonban a vegyület szintézise során a sztereoszelektivitás miatt a vegyület C6 epimere a fő termék, amelynek gátló hatása csekély. Somsák László és munkacsoportja a vegyületben egy O atom S atomra cserélésével az előzőhöz hasonló gátlási állandóval rendelkező molekulát szintetizált [65, 66]. Ennek a tioszármazéknak az előnye, hogy a szintézise egyszerű és sztereoszelektív, hét lépésen keresztül történik szabad cukorból (11. ábra).



11. ábra. A glükopiranozilidén-spiro-tiohidantoin (TH) kémiai szintézise
(Bz: benzoil-védőcsoport)

3.1.2. Módosított glikogén előállítása

500 mg glikogén, 50 mM G-1-P és AMP elegyét 0,5 mg nyúl vázizom GFb-vel inkubáltunk 40 mM Tris-HCl (pH= 6.8), 2 mM EDTA, 10 mM ME (TEM) pufferben, 20 cm³ térfogatban 30°C-on mindaddig, amíg a G-1-P mintegy 50%-a át nem alakult. A reakció lejátézkodását a glikogén jódreagenssel képződött színének a glikogénre jellemző mahagónibarnából a keményítőre jellemző ibolyaszínűvé való átalakulása is jelzi.

Az ilyen módon módosított glikogéntartalmú oldathoz 10 cm³ 10 % TCA oldatot adtunk, az esetleges csapadékot centrifugálással (3000xg, 10 perc, 20°C) eltávolítottuk. A felülúszóhoz 1,5 térfogat 96 %-os etanolt adtunk, ami a glikogént kicsapja. A tömörödő csapadékot 0°C-on állni hagytuk és centrifugálás után (3000xg, 10 perc, 4°C) 20 cm³ TEM pufferben oldottuk 30°C-on. A nem oldódó részt centrifugálással (3000xg, 10 perc, 20°C) eltávolítottuk, az opálos felülúszót 0°C-on állni hagytuk. A módosított glikogén könnyen ülepedő gélle alakult át, amely vízben, ill. TEM pufferben 30°C-on sem oldódik. 1 M NaOH oldatban szobahőmérsékleten azonban oldható és TCA-val való semlegesítés után mennyisége meghatározható [97].

3.1.3. Pufferek

TM: 40 mM Tris, 0,1% ME, pH= 7,4

TEM: 40 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 10 mM ME, pH= 6,8

3.2. Enzimpreparátumok

3.2.1. Vázizom glikogén foszforiláz *b* nyúl vázizomból

Homogén GFb-t nyúl vázizomból Fischer és Krebs szerint [98] állítottunk elő, háromszor átkristályosítottuk és a kristályokat TEM pufferben oldottuk. A nukleotidokat (elsősorban AMP-t) Norit A cellulóz kezeléssel távolítottuk el. A preparátumok specifikus enzimaktivitása 48-55 E/mg volt 16 mM G-1-P és 1 mM AMP jelenlétében. A homogenitást SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel ellenőriztük és egyetlen kb. 95 kDa molekulatömegű fehérje festődését észleltük.

3.2.2. Vázizom glikogén foszforiláz *a*

A GFa-t nyúl vázizom GFb-ből állítottunk elő. Az átalakítást nem aktivált foszforiláz-kinázzal végeztük 10 mM Mg^{2+} és 3 mM ATP jelenlétében (pH= 8,2). Az előállított GFa-t háromszor átkristályosítottuk, a nukleotidokat Norit A cellulóz kezeléssel eltávolítottuk. A GFa aktivitása 55-60 E/mg fehérje volt. A [^{32}P]-vel jelzett GFa-t szintén ezen a módon állítottuk elő, annyi különbséggel, hogy 1mM ATP használtunk, amelyben a [^{32}P]-ATP specifikus aktivitása: 10 TBq/mmol volt. Az enzim tisztaságát SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel, míg a ^{32}P -kihasadását foszforiláz foszfatáz reakcióval ellenőriztük (3.3.4. fejezet).

3.2.3. Máj glikogén foszforilázok

Egy napig éheztetett hím Wistar patkányokat nyugodt alvás állapotában *i.v.* 20 μ g/testsúly kg glükagonnal kezeltük. 10 perc elteltével a májszeleteket kimetszettük, majd 2,5 térfogat 50 mM NaF tartalmú TEM pufferben homogenizáltuk. A szövetmaradékok eltávolítása után a felülúszót a 3.1.2. fejezetben előállított módosított glikogénnel kevertük össze és 24 óráig 4°C-on állni hagytuk, majd a szuszpenziót

centrifugáltuk (3000xg, 10 perc, 4°C). Centrifugálást követően a csapadékot, amely a szintetikus glikogént és a hozzákötődő GF-t tartalmazta 30 % maltózt tartalmazó TEM pufferben szuszpendáltuk. A szuszpenziót 24 óráig 4°C-on állni hagytuk, majd centrifugáltuk és a felülúszót összegyűjtve TEM pufferrel szemben dializálva eltávolítottuk a maltózt. A máj GF-t tartalmazó elegyet DEAE Sephacel oszlopon tisztítottuk Na-β-glicero-foszfát gradienssel (0-150 mM) eluálva a GFa enzimet. A legmagasabb enzimaktivitású frakciókat összegyűjtöttük, majd Millipore® berendezésben N₂ atmoszférában nagy nyomáson töményítettük. Ezt követően 50 % glicerint tartalmazó TEM pufferrel szemben dializáltuk és -20°C-on tároltuk. A GF inaktív formájának (GFb) tisztításához az állatokat nem éhezettük és a nyugodt alvás elérése után az állatokat glükagonnal nem kezeltük. Az eljárás többi része a fent leírtak alapján történt.

3.2.4. Foszforiláz kináz nyúl vázizomból

A foszforiláz kinázt (a GFb → GFa átalakításra használtuk) nyúl vázizomból preparáltuk Cohen szerint [99]. Az izomkivonat izoelektromos lecsapása (pH= 6,1), a csapadék szuszpendálása, ultracentrifugálása (78000xg, 100 perc, 4°C) és ammónium-szulfátos kicsapása (35%-os telítés) után részlegesen tisztított foszforiláz kinázt nyertünk. A preparátumot 50 % glicerolt tartalmazó 50 mM Tris-HCl, 50 mM Na-β-glicero-foszfát (pH= 6,8), 0,1 % ME tartalmú pufferben -20°C-on tároltuk. A preparátum pH= 6,8/8,2 aktivitáshányadosa 0,1-nél kisebb volt, ennek megfelelően a preparátum nem-aktivált foszforiláz kináznak tekinthető. Az enzim specifikus aktivitását pH= 8,2 értéken határoztuk meg és 6,5-8 E/mg volt.

3.3. Enzimaktivitás meghatározások

3.3.1. Tisztított izom és máj glikogén foszforiláz aktivitásának meghatározása

A tisztított glikogén foszforilázokkal végzett kinetikai méréseket az irodalomból ismert módszer alapján végeztük [65]. Az enzim aktivitását a glikogén szintézis irányába (az *in vivo* folyamattal ellentétesen) mértük. A vázizom és máj GFa aktivitását

különböző koncentrációjú (2-16 mM) G-1-P és állandó koncentrációjú (1 %) glikogén jelenlétében határoztuk meg 50 mM trietanol-amin, 100 mM KCl, 1 mM EDTA (pH=6,8) puffer jelenlétében. Vázizom GFb esetében 1 mM, míg máj GFb esetében 2 mM AMP-t (mint aktivátort) is tartalmazott az inkubációs elegy. Az aktivitást 30°C-on határoztuk meg és az inkubációs időt úgy állítottuk be, hogy a szubsztrátnak (G-1-P) legfeljebb 20 %-a alakuljon át. Egységnyinek tekintettük a GF azon mennyiségét, amely egy perc alatt 1 μ mol foszfát átalakulását katalizálja 30°C-on.

3.3.2. Foszforiláz kináz

A foszforiláz kináz aktivitását Cohen módszere [99] alapján határoztuk meg. Az inkubációs közeg (0,3 ml) összetétele: 5 mg/ml foszforiláz *b*, 0,125 mM CaCl₂, 3 mM ATP, 10 mM Mg-acetát, 45 mM Tris-HCl, 45 mM Na- β -glicero-foszfát puffer (pH=6,8 vagy 8,2) és megfelelő hígítású foszforiláz kináz. A reakciót Mg-ATP hozzáadásával indítottuk és az elegyet 30°C-on inkubáltuk. A reakcióközeggől mintákat vettünk, 100 mM NaF, 4 mM EDTA, 2 mM EGTA, 10 mM ME, 20 mM Tris-HCl (pH=6,8) pufferbe és meghatároztuk a képződött foszforiláz *a* aktivitását.

Egységnyinek tekintettük a foszforiláz kináz azon mennyiségét, amely egy perc alatt 1 μ mol GFb monomer GFa-vá történő átalakulását katalizálja 30°C-on.

3.3.3. Glikogén szintetáz

Máj kivonatban a GS aktivitását Doperé és mtsai (1980) [100] módszerével határoztuk meg. Az inkubációs elegy összetétele: 5 mM UDP-[¹⁴C]-glükóz (specifikus aktivitása: 10 Bq/nmol), 1 % glikogén, 50 mM Tris (pH= 7.8), 5 mM EDTA, szintetáz, valamint 10 mM Na₂SO₄ (GSa) vagy 10 mM G-6-P (GSa+GSb).

Egységnyinek tekintettük azt a GS mennyiséget, amely 1 perc alatt 1 μ mol [¹⁴C]-glükóz beépülését katalizálja UDP-[¹⁴C]-glükózból glikogénbe 30°C-on.

3.3.4. Foszforiláz foszfataz

A foszforiláz foszfataz aktivitását [^{32}P]-vel jelzett GFa szubsztrátot alkalmazva határoztuk meg. Kísérleteinkben 1 mg/ml [^{32}P]-GFa-t inkubáltunk 30°C-on különböző májfrakciókkal (extrakt, citoszol, pellet). A különböző időpontokban vett mintákat 10 %-os TCA-ba pipettáztuk és a csapadék felülúszójában a [^{32}P] radioaktivitását a Cserenkov-sugárzás felhasználásával, vizes közegben, folyadékszintilláció alapján mértük [101].

A foszforiláz foszfataz aktivitását májkivonatban az endogén GFa forma defoszforilációjával, aktivitásának csökkenéséből határoztuk meg. Egységnyinek tekintettük azt a foszfataz aktivitást, amely 1 perc alatt 1 egység GFa defoszforilációját katalizálta.

3.3.5. Glikogén foszforiláz gátlószerek vizsgálata: K_i és IC_{50} meghatározása

A vizsgált vegyületek (lehetséges GF inhibitorok) gátlási állandóinak meghatározásához a Dixon-féle ábrázolást használtuk. A feltevésünk az volt, hogy a glükózból szintetizált molekulák a GF-hez kötődnek követve a Michaelis-Menten kinetikát. A Michaelis-Menten egyenlet egy hiperbola, amelyből az enzimreakció maximális sebessége ($V_{\max}$) és a Michaelis-Menten (K_m) állandó meghatározható. Az állandók grafikus meghatározásának egyik lehetősége az eredeti egyenlet linearizálása, az úgynevezett Lineweaver-Burk ábrázolás. Ez a linearizálás azon alapul, hogy az eredeti egyenlet reciprokát vesszük, az így kapott egyenes tengelymetszeteiből már pontosabban határozható meg az enzimreakció állandói. Ha az enzimreakció sebességét több különböző inhibitor- és szubsztrátkoncentrációnál is megmértük, akkor a linerizált Lineweaver-Burk ábrázolásnál is több egyenest kapunk a gátlószer többféle koncentrációjának megfelelően. Az így kapott egyenesek meredekségét a hozzájuk tartozó inhibitor koncentráció függvényében ábrázolva egy új görbét kapunk, aminek az x-tengely metszete adja a gátlási állandót (K_i). A mérési adatok számítógépes kiértékelésével (GraphPad Prism) határoztuk meg a gátlási állandókat.

Olyan vegyületek esetén, amelyek még nagy koncentrációban sem gátolják jól a GF enzimet a maximálisan elérhető aktivitás 50 %-os gátlásához szükséges

inhibitor-koncentráció (IC_{50}) meghatározása az elterjedt módszer. A mérés lényege azonos a K_i meghatározásával, a különbség annyi, hogy az IC_{50} meghatározásához egyetlen szubsztrát-koncentráció mellett változtatjuk az inhibitor koncentrációját és az 50 %-os reakciósebességhez szükséges gátlószer koncentrációját nevezzük IC_{50} -nek.

3.4. Fehérjekoncentráció meghatározása

A tisztított enzimek fehérjekoncentrációját közvetlen UV fotometriával 280 nm hullámhosszon határoztuk meg a megfelelő moláris abszorpciós koefficiensek segítségével [102]. Különböző sejtfrakciók és más nem tisztított minták fehérjetartalmát a módosított Bradford módszerrel mértük [103].

3.5. Enzim-ligand kölcsönhatás vizsgálata röntgenkristallográfiával

A nyúl vázizom natív T-állapotú GFb kristályokat egyik együttműködő partnerünk kutatócsoportja (National Hellenic Research Center, Athén, Görögország) állította elő [104]. A GFb-inhibitor komplex létrehozásához egy vékony falú kapilláris csőben a GFb kristályokat 100 mM koncentrációjú inhibitort tartalmazó pufferben (10 mM Bis, 0,1 mM EDTA, 0,02 % nátrium azid, pH= 6,7) áztatták 1,5-3,5 óráig. A GFb-inhibitor komplex röntgenkristallográfiás adatait Hamburgban X-31 sugárnyaláb használatával gyűjtötték ($\lambda = 1,05\text{-}1,97 \text{ \AA}$). A módszer lehetővé tette, hogy a maximális felbontás elérje a $2,26 \text{ \AA}$ értéket is. Az így kapott adatokat a SYBYL (Tripos Associates Inc., St Louis, MO, USA) program segítségével értékelték ki. Munkacsoportunk megkapta az elektrondenzitás adatokat, valamint a fehérjeszerkezet és a gátló ligand térbeli koordinátáit is. Az enzim-ligand kölcsönhatásokat közösen értékeltük ki.

3.6. Állatkísérleti módszerek

3.6.1. Normál Wistar patkányok

220-250 g súlyú hím Wistar patkányokat (Charles River Magyarország Kft.) kontrollált körülmények között tartottunk (26°C, 50–70 % páratartalom, 12 órás világos/sötét ciklus, víz-étel állandóan elérhető volt számukra) az Élettudományi Épület állatházában. A különböző vizsgálatokhoz a Debreceni Egyetem Állatkísérleti Etikai Bizottságának engedélyével rendelkezünk (29/2007 DE MÁB).

3.6.2. Sztreptozotocin (STZ) kezelés

Hím Wistar patkányokban a diabéteszt egyszeri intravénás sztreptozotocin (50 mg/kg testsúly 50 mM Na-citrát pH=4.5 pufferben oldva, NaCl oldattal kiegészítve izoozmotikus koncentrációra) injekcióval váltottuk ki. A kontroll állatcsoportban az injekció sztreptozotocint nem tartalmazott. A diabétesz kialakulását glükózuria megjelenésével ellenőriztük (Macherey-Nagel, Dören, NSZK). Általában egy héttel a kezelés után a vizelet glükóz-koncentrációja elérte vagy meghaladta 0,3 mg/ml értéket.

3.6.2.1. Sztreptozotocin kezelés és a TH hatása

Az STZ-állatokat két csoportra osztottuk: kontroll diabéteszes és TH-kezelt diabéteszes patkányok. A kontroll diabéteszes csoport kétnaponta *s.c.* 0,9 % NaCl oldatot kapott (2 ml/testsúly kg), míg a TH-kezelt diabéteszes csoport *s.c.* 50 µM TH oldatot (100 µmol/testsúly kg). TH-oldatot a kezelés előtt frissen készítettük oldószerként steril 0,9 % NaCl-ot használva. A kezeléseket tíz alkalommal végeztük reggel 8-9 óra között. Az utolsó kezelést követő második napon az altatott állatokból a májat eltávolítottuk és feldolgoztuk (ld. 3.6.4).

3.6.2.2. Sztreptozotocin kezelés és inzulin implantátum

24 tetszőlegesen kiválasztott állatot sztreptozotocinnal kezelve (100 µmol/kg, *i.v.*) STZ-indukált diabéteszt hoztunk létre (STZ csoport). Tíz hét elteltével az STZ csoportot két részre osztottuk, az egyik állatcsoport egyedeibe inzulin implantátumot

(Linplant[®], LinShin Inc. Kanada) ültettünk az altatott állatok nyakának hátsó részébe a bőr alá (INZ csoport). Az állatok testtömegét minden héten ellenőriztük.

3.6.3. ZDF (Zucker diabetic fatty rat) patkányok

A ZDF/Gmi-fa-fa (ZDF) állatokban a születés utáni 7-10. hétben alakulnak ki a diabétesz tünetei. Ellentétben más diabéteszes modellekkel a ZDF állatok kevésbé elhízottak, de inzulinra érzékenyebbek. A hím állatokat közvetlenül rendeltük a Charles River Laboratories-tól (Indianapolis, USA).

3.6.3. Állatkísérleti műtéti módszerek

Az állatokat *i.p.* adagolt nátrium-tiopentállal (Trapanal[®], 70 mg/kg) altattuk és kipreparáltuk a tracheát. A folyamatos altatást *i.v.* adagolt (1,5 mg/kg) nátrium-tiopentál infúzióval biztosítottuk a jobb combi artérián. Két polietilén katétert helyeztünk a bal oldali nyaki vénába, amelyeken folyamatosan adagoltuk (Syringe Pump 11 Plus – Harvard Apparatus, Holliston, USA) az inzulin- és glükózininfúziót. Kanült helyeztünk a szív baloldalán az artériába, amelyen keresztül vérmintákat gyűjtöttük. Az állatok vérnyomását ellenőriztük (Statham P23, Experimetria TSZ06, Budapest, Hungary). Az állatok testhőmérsékletét egy fűthető lap (Type 872H, Hugo Sachs Elektronik – Harvard Apparatus GmbH, Germany) segítségével $37\pm0,5^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk. A testhőmérsékletet a végbélnyíláson keresztül ellenőriztük. A kísérletek befejeztével az állatokat nátrium-tiopentál túladagolásával öltük meg (100 mg/kg *i.v.*).

3.6.4. Májselet minták feldolgozása

A feldolgozás minden műveletét $0-4^{\circ}\text{C}$ között végeztük. A májszeleteket jéghideg fiziológiás sóoldattal (0,9% NaCl-oldat, pH= 7,4) leöblítettük, megmértük és 2 térfogat 40 mM Tris (pH= 7,4), 0,1% ME, 250 mM szacharóz, továbbá proteázgátlóként 0,5 mM benzamidin, 0,5 mM PMSF tartalmú pufferrel teflon Potter-Elvehjem csőben homogenizáltuk. A homogenizátumokat centrifugáltuk (10000xg, 5 perc) és a felülúszót üveggyapoton átszűrtük. A szűrlet 200 μl -ét TM pufferrel kiegészítve 4 mM EDTA és

100 mM NaF oldattal 15-szörösére hígítottuk a GF és a GS aktivitásának meghatározásához. A szűrlet további 2 ml-ét Sephadex G-25 oszlopon (10x1 cm) szűrtük TM puffer alkalmazásával, s az így kapott mintákat gélszűrt extraktként használtuk a protein foszfatáz aktivitás méréséhez. Összehasonlító mérésekben (kontroll és kezelt minták) a megfelelő fehérjefrakciókat azonos koncentrációra hígítottuk TM pufferrel.

3.6.5. Insulinrezisztencia mérése glükóz-clamp módszerrel

A kísérletet a korábbiakban leírt állatcsoportokon (3.6.2.2) végeztük. A vércukorszint és a plazma inzulinszint meghatározásához a szükséges vérmennyiséget a kísérlet előtt vettük le. Az állatoknak 120 percig 3 mE/kg/perc inzulininfúziót adagoltunk (Humulin R[®], Eli Lilly, Indianapolis, USA). Az inzulinnal párhuzamosan 20 % glükózinfúziót adagoltunk úgy, hogy a normálglükaemiás vércukorszint ($5,5 \pm 0,5$ mM) fennmaradjon. A vérmintákat a szív artériájába preparált kanülön vettük a kísérlet első 80 percében 5 percenként, ezután 10 percenként. A plazma inzulinszint meghatározásához a vérmintát az inzulininfúzió adagolása előtt vettük le és a plazma preparálása után plazmát a későbbi inzulinkoncentráció meghatározásáig -70°C-on tároltuk. Az állandó vércukorszint fenntartásához szükséges glükózinfúzió sebességéből (mg glükóz/kg/perc) következtettünk az állat inzulinérzékenységére [105, 106]. A plazma inzulinszint mérése HTRF[®] Insulin Assay kit segítségével történt, ami két monoklonális antitestet használ és kis inzulinkoncentrációk meghatározására is alkalmas [106].

3.7. Mérési adatok kiértékelése

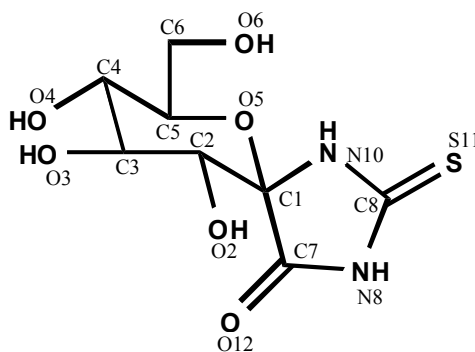
A GF gátlási vizsgálatoknál minden mérési ponthoz legalább 3 párhuzamos aktivitásmérést végeztünk. A gátlást az átlag értékkel adtuk meg, ahol csak az átlagot tüntettük fel, abban az esetben a szórás maximum $\pm 10\%$ volt. Az állatkísérleti módszereknél 3-5 mérés adatát használtuk fel a statisztikai adatok számításához, amelyhez Microsoft Excel programot alkalmaztunk. Az adatokat átlag $\pm$ SD értékkel adjuk meg, a szignifikanciát *t*-próbával számolva. A különböző kísérleti csoportok

adatait a t -próba varianciaanalízisével végeztük. Adataink normáeloszlását is ellenőriztük. A varianciaanalízisnél a rögzített faktor hatásvizsgálatára lefuttatott f -próba azonos volt a páros t -próba próbastatisztikájának elemzésével.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Glükopiranozilidén-spiro-tiohidantoin (TH) glikogén foszforilázra kifejtett gátlásának vizsgálata

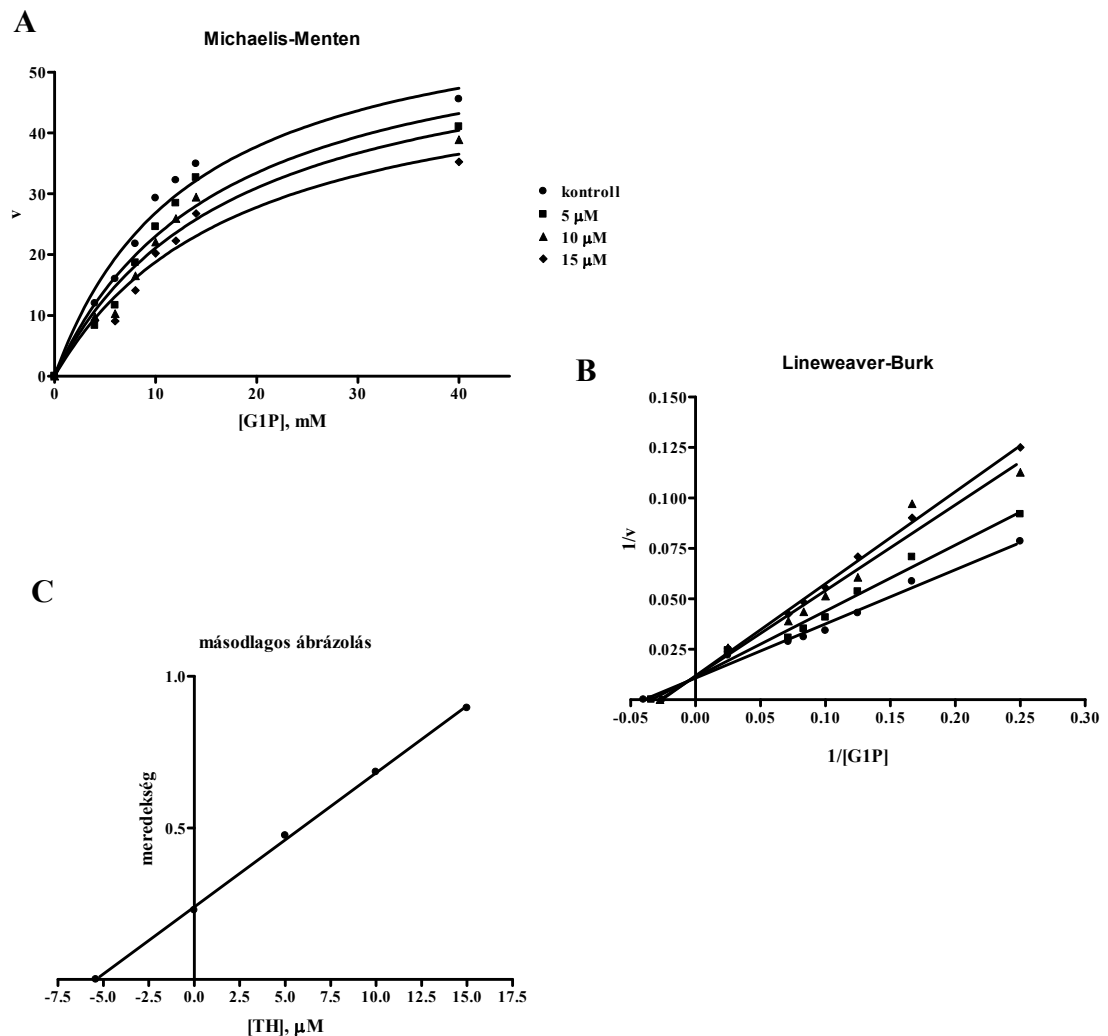
Somsák László és kutatócsoportja egy biciklusos glükózanalóg vegyületet a glükopiranozilidén-spiro-tiohidantoint (TH) szintetizált [65] (12. ábra). A vegyület a kinetikai vizsgálataink alapján a vázizomból és májból preparált glikogén GFb és GFa enzimek hatékony gátlószerének bizonyult.



12. ábra. A TH molekulaszerkezete

A kinetikai vizsgálatokban különböző inhibitor- és szubsztrát-koncentráció jelenlétében meghatároztuk az enzimreakció sebességét. A kapott eredményekből számítógépes program segítségével megszerkesztettük a Michaelis-Menten kinetikához tartozó sebességi görbét (13. ábra A). Az inhibitort nem tartalmazó (kontroll) analízisével ellenőrizhető a GF tisztasága és katalitikus hatékonysága. Nyúl vázizom GFb esetén a kapott értékek ($V_{\max} = 48\text{--}55 \text{ E/mg}$, $K_M = 4,5 \text{ }\mu\text{M}$) jól egyeztek az irodalomból ismert adatokkal. Az enzimaktivitások reciprokát számítógépes program segítségével ábrázolva a szubsztrát-koncentráció reciprokának a függvényében kaptuk a Lineweaver-Burk szerinti ábrázolást (13. ábra B). A gátlási állandó meghatározásához szintén számítógépes program segítségével megszerkesztettük a Dixon-görbét (13. ábra

C) a Lineweaver-Burk szerinti ábrázolás egyeneseinek meredekségét ábrázolva az inhibitor koncentrációjának függvényében.



13. ábra. A TH gátlási állandójának meghatározása

A nyúl vázizom GFb enzim aktivitását ábráztuk a szubsztrát (G-1-P) koncentráció függvényében (A). A kettős-reciprok Lineweaver-Burk diagram (B) egyeneseinek meredekségét az inhibitor-koncentráció függvényében ábrázolva kapjuk a L-B másodlagos görbét (C), amelynek tengelymetszetéből kiszámítható a gátlási állandó (K_i).

A nyúl vázizomból preparált GFb aktivitását a TH hatékonyan, mikromól koncentrációtartományban csökkenti. Meghatároztuk a TH gátlását az enzim aktív formájára, továbbá a szervezet fő glikogénraktárában, a májban található GFb és GFa

enzimekre is. A TH gátlási állandóit a GF különböző szövetekből preparált és különböző foszforiláltsági fokú formáira a 2. táblázat foglalja össze.

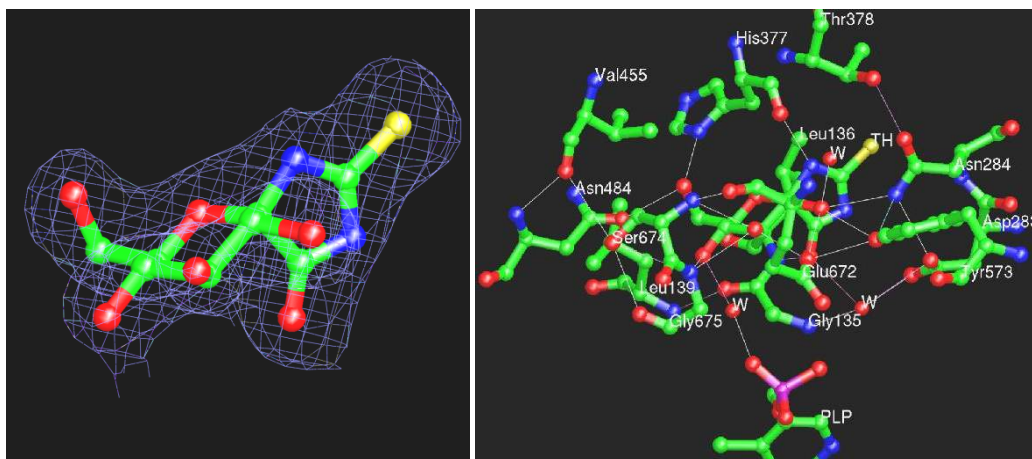
2. táblázat. A TH gátlási állandói a nyúl vázizom és patkány máj GFb és GFa enzimeire

A gátlási állandó számítása 3-7 független mérés eredményéből történt. A defoszfo és foszfo formák azonos szövettípusból szignifikánsan eltérő K_i értéket mutattak ($p < 0,01$).

Glikogén foszforiláz típusa	K_i (μM)
vázizom GFb	$5,1 \pm 0,5$
vázizom GFa	$10,9 \pm 1,0$
máj GFb	$7,0 \pm 0,6$
máj GFa	$22,8 \pm 2,9$

A 2. táblázat K_i értékei a GFb formákra nagyobb gátlást mutatnak, kb. 2-3-szor gyengébben gátolja a TH a GFa enzimeket. A máj foszforiláz aktivása kevésbé csökkenthető az inhibitorral, bár ebben az esetben is hatékonyak bizonyult.

A TH nyúl vázizom GFb-hez való kötődését N. G. Oikonomakos és kutatócsoportja segítségével, röntgankrisztallográfiás módszerrel bizonyítottuk [107]. A mérési adatok alapján a GFb inaktív T állapotában, a TH az enzim aktív centrumához kapcsolódik H-kötések, apoláris-apoláris kölcsönhatások és dipólus-dipólus kölcsönhatásokkal (14. ábra). Az adatok alapján a TH molekula N8, N10 és O12 atomjai H-kötésekkel kapcsolódnak a GFb aktív centrumához. A TH glükózrészének hidroxilcsoportjai további hidrogénkötéseket alakítanak ki a GFb megfelelő aminosavoldalláncaival, ez a hálózat nagyon hasonlít az GFb-glükóz komplexben megfigyelthez.



14. ábra. A TH illeszkedése a glikogén foszforiláz katalitikus centrumához.

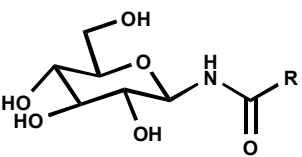
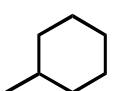
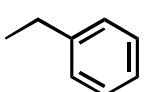
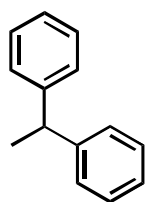
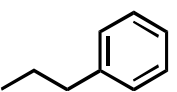
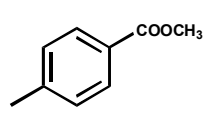
Az ábra baloldali részén a GFb-TH komplex elektrondenzitását tüntettük fel. Az ábra jobboldali része a TH illeszkedését mutatja a GFb katalitikus centrumában, kiemelve az enzim azon aminosavoldalláncait, amelyek jelentős kölcsönhatásokat alakítanak ki a TH molekulával. Az enzim aktív centrumában található PLP is részt vesz a gátlószer kötésében [107].

4.2. Glükózanalóg inhibitorok kinetikai vizsgálata

A TH-GFb röntgenkristallográfiai analízise arra is rámutatott, hogy a gyűrű egyes atomjai milyen mértékben járulhatnak hozzá az enzim és a gátlószer komplexének stabilizálásához, ami új molekulatervezési stratégiát is lehetővé tett. A második gyűrűt megnyitva és az S11 atom O atomra cserélésével új molekulacsalád szintézisére nyílt lehetőségünk. A TH GFb aktív centrumához való kötődésében mindkét N atomnak jelentős szerepe van, ezért felmerült annak a lehetősége is, hogy a gyűrű megnyitása után a glükóz molekulához β -helyzetben kapcsolódó atomcsoportok tartalmazhatnak egy (3.-4. táblázatok), két (5.-6. táblázatok), esetleg több (7. táblázat) amidesoportot is.

3. táblázat. N-(β-D-glükopiranozil)-amidok szerkezete és gátlási adataik nyúl vázizom GFb enzimre

A mérések a glikogén szintézis irányában történtek. A K_i és IC_{50} értékek 3-5 mérés átlagát jelentik, a szórás maximum $\pm 10\%$ volt. (*-gal jelöltük meg a nem saját mérések adatait)

Alapvegyület: 			
Vegyület	R	K_i [μM]	IC_{50} [μM]
1	-CH ₃	32* [63]	
2	-CF ₃	81 [108] 75 [109]	
3	-CH ₂ CH ₂ CO ₂ H	20 [110]	
4	-C(CH ₃) ₃	—	7500 [111]
5		289 [111]	
6		—	1100 [111]
7		nincs gátlás [111]	
8		85	
9		329 [110]	

A glükózhoz β -helyzetben kapcsolódó amidcsoportot tartalmazó molekulák legegyszerűbb képviselője egy metilcsoportot tartalmaz az amidcsoporton (3. táblázat **1** molekula). A gátlási állandó a TH-hoz képest csökkent, az **1** molekula nem sorolható a

jó inhibitorok közé. A metilcsoport H-atomjainak helyettesítése F-atomokkal (3. táblázat 2 molekula) gyengítette a gátlást valószínűleg a vegyület ezen részének fokozott apoláris jellege miatt.

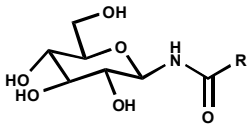
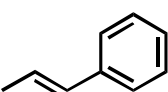
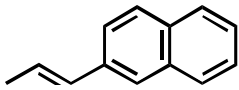
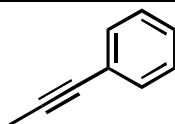
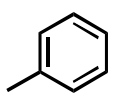
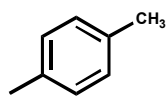
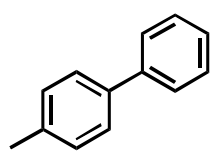
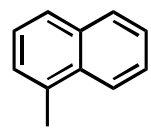
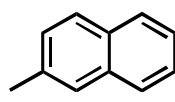
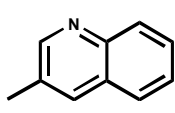
A végcsoportok cserélése akár poláris (3. táblázat 3 molekula), akár apoláris (3. táblázat 4-8 molekulák, továbbá 4. táblázat 10-16 molekulák) csoportokra nem csökkentette a molekula gátlási állandóját a mikromólos koncentráció tartományba, kivétel amikor a molekulára egy β -naftilcsoportot csatlakoztattunk (4. táblázat 11 és 17 molekulák). Feltételezzük, hogy az így szintetizált molekulák jó gátlási adatai valószínűleg a naftilcsoport jelenlétének tulajdoníthatók. Ha összehasonlítjuk az eredményeket az α -naftilcsoportot tartalmazó vegyület (4. táblázat 16 molekula) gátlási adataival, akkor arra következtethetünk, hogy nemcsak a csoport milyenségének van jelentős szerepe a gátlószer inhibitorhoz való kötődésében, hanem a térállásának is.

A végcsoportban poláris rész kialakítása (3. táblázat 9 molekula) vagy heteroatom jelenléte az aromás gyűrűben (4. táblázat 18 molekula) a glükózanalogok GF gátlását jelentősen csökkentette.

Az első – röntgenkristallográfiával is igazolt – GF aktív centrumához kötődő inhibitort alapul véve (6. ábra II vegyület) és a hidantoingyűrűt megnyitva egy új inhibitorcsaládhoz az N-(β -D-glükopiranozil)-N'-acil-karbamidokhoz jutunk. A karbamidcsoporthoz kapcsolódó végcsoportok különbözősége következtében jelentős számú molekula származtatható. Ebből a családból mutat be néhány vegyületet az 5. és 6. táblázat.

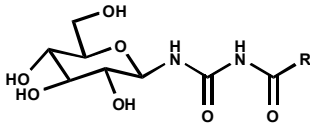
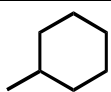
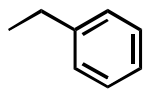
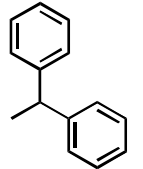
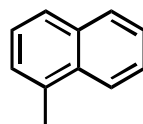
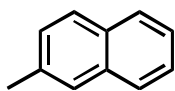
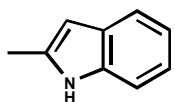
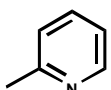
3. táblázat. N-(β-D-glükopiranozil)-amidok szerkezete és gátlási adataik nyúl vázizom GFb enzimre

A mérések a glikogén szintézis irányában történtek. A K_i és IC_{50} értékek 3-5 mérés átlagát jelentik, a szórás maximum $\pm 10\%$ volt. (*-gal jelöltük meg a nem saját mérések adatait)

Alapvegyület: 			
Vegyület	R	K_i [μM]	IC_{50} [μM]
10		18 [111]	
11		3,5 [111]	
12		61 [111]	
13		144 [108]	
14		—	4500 [111]
15		281 [111]	
16		444 [111]	
17		10 [111]	
18		—	8000

5. táblázat. N-(β-D-glükopiranozil)-N'-acil-karbamidok szerkezete és gátlási adataik nyúl vázizomból preparált GFb-re

A mérések a glikogén szintézis irányában történtek. A K_i és IC_{50} értékek 3-5 mérés átlagát jelentik, a szórás maximum $\pm 10\%$ volt. (*-gal jelöltük meg a nem saját mérések adatait)

			
Vegyület	R	K_i [μ M]	IC_{50} [μ M]
19	-CH ₃	305	
20		—	5000
21		—	10000
22		—	>5000
23		15	
24		0,35	
25		4,0	
26		68	

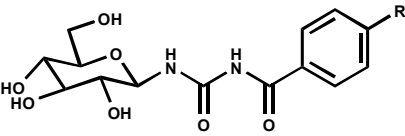
Az alapvegyületet itt is egy metilcsoport csatolásával kaptuk és hasonlóan N-(β-D-glükopiranozil)-amidokhoz a gátlási állandó elég nagy érték. A metilcsoport (5. táblázat **19** molekula) fenilcsoportra (6. táblázat **27** molekula) való cserélése jelentősen csökkenti a gátlási állandót. Tovább növelve a karbamidhoz kapcsolódó hidrofób csoport méretét (5. táblázat **23-25** molekulák), a gátlási állandó jelentősen csökkent. A

naftilcsoport orientációja, az amidokhoz hasonlóan jelentősen befolyásolta a gátlás erősségét (ld. 5. táblázat **23** és **24** molekuláit). Telített gyűrűs oldallánc (5. táblázat **20** molekula) vagy alkilláncon található aromás gyűrűk (5. táblázat **21** és **22** molekulák) gyakorlatilag megszüntették az alapvegyület GF gátló képességét.

A benzoil-karbamid származékok *para*-helyzetben lévő H atomjának lecserélése apoláris- (6. táblázat **28** molekula), aromás- (6. táblázat **30** molekula), halogén- (6. táblázat **34** molekula), ill. poláris-csoportokra (6. táblázat **31-33** molekula) alig befolyásolták a gátlási állandó értékét. Ha nagy térkitöltésű apoláris csoportot, *tercier*-butilcsoportot kapcsolunk az alapvegyülethez (6. táblázat **29** molekula), akkor a gátlási állandó a szubmikromól koncentráció-tartományba süllyedt.

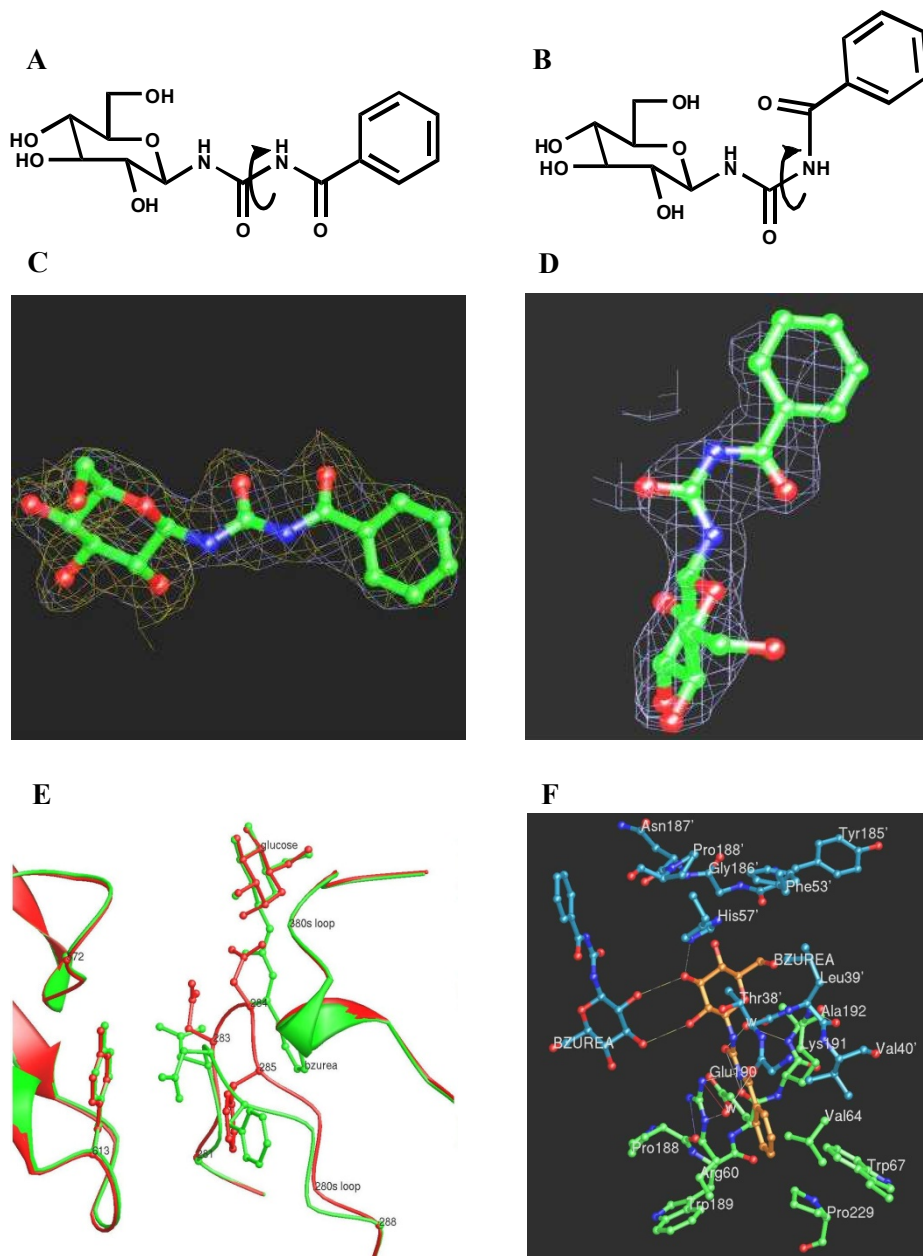
6. táblázat. N-(β -D-glükopiranozil)-N'-aróil-karbamidok szerkezete és gátlási adataik nyúl vázizomból preparált GFb-re

A mérések a glikogén szintézis irányában történtek. A K_i és IC_{50} értékek 3-5 mérés átlagát jelentik, a szórás maximum $\pm 10\%$ volt. (*-gal jelöltük meg a nem saját mérések adatait)

		
Vegyület	R	K_i [μ M]
27	-H	4,6* [40]
28	-CH ₃	2,3
29	-C(CH ₃) ₃	0,7
30	-C ₆ H ₅	3,7
31	-NO ₂	3,3
32	-NH ₂	6,0
33	-OH	6,3
34	-Cl	4,4

A benzoil-karbamid (6. táblázat **27** molekula) GFb gátlásának kinetikai adatai arra utaltak, hogy a molekula esetleg két eltérő affinitású kötőhelyhez is kapcsolódhat

az enzimben. A benzoil-karbamid és nyúl vázizom GF komplexének szerkezetét röntgen-kristallográfiával is vizsgáltuk (15. ábra).



15. ábra. A benzoil-karbamid lehetséges konformációi és kötődésük a nyúl vázizom GFb kristályhoz

A molekula a C-N kötés rotációjával (jelölve az ábrán) két lehetséges konformációt vehet fel az úgynevezett „s-cisz” (A) és „s-transz” (B) formát. A röntgenkristallográfiás adatok alapján a komplexben a benzoil-karbamid mindkét konformációt felveheti (elektronsűrűség térképek C, D) és a szerkezettől függően az enzim aktív centrumához (E), ill. az új indol kötőhelyhez (F) kapcsolódhat.

A 15. ábrából látható, hogy az inhibitor jól illeszkedik a GF aktív centrumához, hasonlóan a TH molekulájához. A benzoil-karbamid azonban a katalitikus helytől (aktív centrumtól) mintegy 33 Å-re lévő indol kötőhelyhez is kapcsolódik, ezzel az első glükóz analóg inhibitor molekula, amely a GF két különböző felszínéhez is kötődhet. Ennek bemutatására a Megbeszélés fejezetben kerül sor (23. ábra).

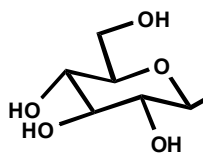
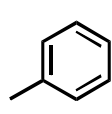
A GF enzim gátlásának adatai a különböző glükózanalóg vegyületekkel arra utalnak, hogy a glükózzrész elengedhetetlen a gátlószer kötődésében a GF aktív centrumához, ugyanakkor a végcsoport mérete, térszerkezete és orientációja jelentősen befolyásolja a gátlás erősségét. Ezt a feltételezést néhány esetben a GF-ligand komplex röntgenkristallográfiával megállapított szerkezetével egyértelműen igazoltuk.

A glükózzrész és a végcsoport közötti kapcsolatot létrehozó atomcsoportok (összekötők) is befolyásolhatják az inhibitor-GF közötti kötés erősségét, ezzel a vegyület gátlóképességét. A gátlási adatok (K_i) összehasonlításával megállapítható, hogy összekötő csoportként az amidcsoport meglete szükséges a gátláshoz, sőt acil-karbamidcsoport („két” amidcsoport) esetén jelentősen fokozódik a gátlás, csökken a K_i értéke (7. táblázat 35 és 38 molekulák). Ha tovább növeljük az amidcsoportok számát a glükózzrész és az aromás végcsoport között a gátlás jelentősen csökken (7. táblázat 44 és 45 molekulák), sőt egy bizonyos hosszúságú összekötőnél teljesen megszűnik a gátlás (7. táblázat 46 és 47 molekulák). Az összekötő csoport hosszúsága és a rotáció lehetősége miatt a gátlás megszűnése valószínűleg szterikus okokra vezethető vissza.

7. táblázat. A glükózzsért és végecsort közötti kötőelem szerepe az inhibitor-molekulák GFb-re kifejtett gátlási állandóira

A mérések a glikogén szintézis irányában történtek. A K_i és IC_{50} értékek 3-5 mérés átlagát jelentik, a szórás maximum $\pm 10\%$ volt. (*-gal jelöltük meg a nem saját mérések adatait)

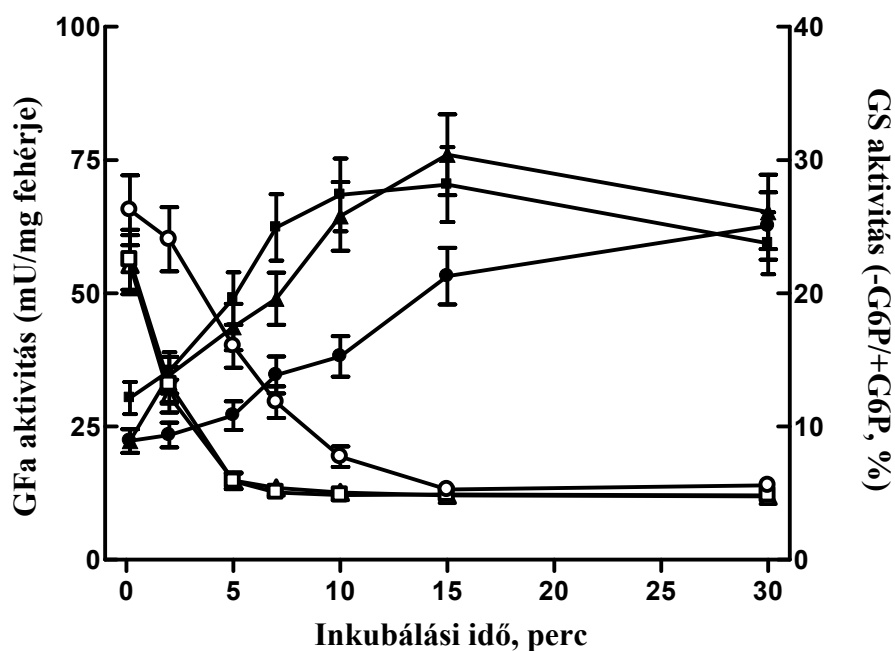
625 μM nem gátol

		R
Vegyület	összekötő a glükóz és az R-csoport között	
35	-NHCO	81 [63]
36	-NHCONH	18
37	-NHCOCH ₂	1100 (IC_{50})[111]
38	-NHCONHCO	4,6 [111]
39	-NHCONHCH ₂	1500 (IC_{50})
40	-NHCOOCH ₂	350 [63]
41	-NHCOCH ₂ CH ₂	85 [111]
42	-NHCOCH=CH	18 [111]
43	-NHCOC≡C	62 [111]
44	-NHCONHCONH	21
45	-NHCONHCOCH ₂	600
46	-NHCONHCONHCO	#
47	-NHCONHCOCH=CH	#

4.3. TH hatása patkány máj glikogénanyagcsere enzimeire

Ismeretes, hogy a glükóz és származékai a máj glikogénanyagcsere két kulcsenzimének szekvenciális inaktiválását, defoszforilációját okozzák: csak a GFa defoszforilációját követően keletkezhet katalitikusan aktív GSa és indulhat be a glikogén szintézise [53, 59]. A glükózanalóg inhibitorok közül azért esett a választásunk a TH molekulára, mert gátló hatása a máj GF aktív és inaktív formáira ($K_i \sim 10\text{-}20 \mu\text{M}$) közel azonos, továbbá szintézise grammnyi mennyiségekben is megoldott, ami az állatkísérletek anyagigénye miatt fontos volt [65, 66].

Wistar patkányok májából készített géliszűrt májkivonatot 30°C -on inkubáltunk 20 mM glükóz vagy $50 \mu\text{M}$ TH jelenlétében (16. ábra).



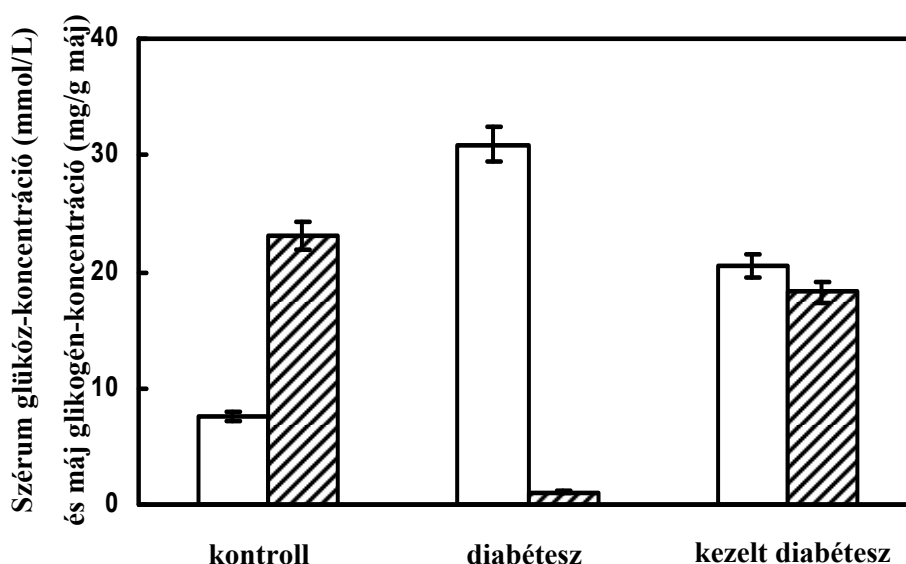
16. ábra. TH hatása a glikogén foszforiláz (üres jelek) és glikogén szintetáz aktivitására (fekete jelek) Wistar patkányok májából preparált géliszűrt kivonatban

Intravénás glükagon kezelés után a májat jéghideg szaharózt és Tris-HCl tartalmú pufferben homogenizáltuk. A géliszűrés után a sómentesített májkivonatot 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ és 2 mM Mg-acetát jelenlétében (○, ●) illetve $50 \mu\text{M}$ TH (□, ■) vagy 20 mM glükóz (△, ▲) hozzáadásával inkubáltuk 30°C -on.

Mindkét ligand fokozta a GF aktív formájának (a GFa-nak) defoszforilációját, azonban glükózból mintegy 400-szor nagyobb koncentráció bizonyult hasonló hatékonyságúnak. A TH hatására bekövetkező gyors GFa defoszforilációt követően a GS defoszforilációja is lejátszódhat. A TH jelentősen csökkentette a latenciát a GS aktiválásában, elősegítve ezzel a glikogén szintézisét.

4.4. TH hatásának vizsgálata sztreptozotocin-indukált diabéteszben

Wistar patkányokban egyszeri sztreptozotocin kezeléssel indukált diabétesz modellt hoztunk létre. Az így kezelt állatokra jellemző volt a magas vércukorszint: a normálérték kb. négyszerese, valamint a máj glikogéntartalom csökkenése a kontroll (kezeletlen) csoport 24 mg/g értékéről 2 mg/g-ra (17. ábra).



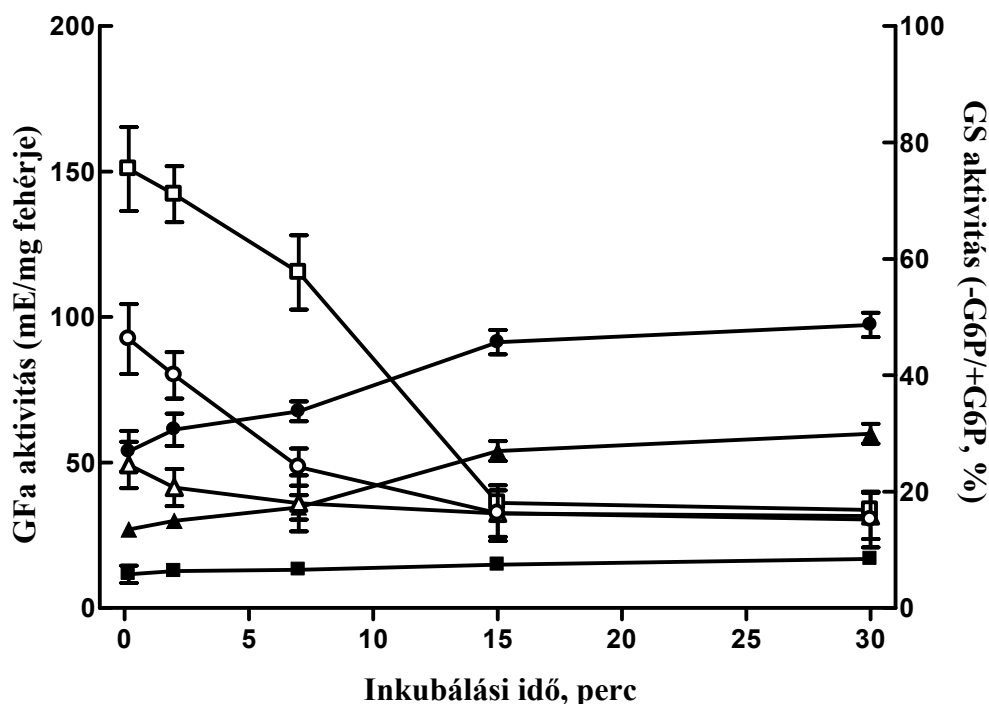
17. ábra. TH kezelés hatása a plazma glükóz koncentrációjára és a máj glikogén mennyiségére

A TH kezelést (100 μ mol/testsúly kg) az Anyagok és Módszerekben leírt módon (3.6.2.1.) végeztük a sztreptozotocin-indukált diabéteszes patkányokban. A szérum glükóz-koncentráció (üres oszlopok) és a máj glikogén tartalom (vonalkázott oszlopok) eredményei 4 kísérlet átlagát $\pm$ SD reprezentálják. A különböző kezelt csoportok között a glükóz- és glikogén-koncentráció szignifikánsan eltért ($p < 0,01$).

A sztreptozotocin kezelt diabéteszes állatokat tíz alkalommal másnapként TH-val kezeltük (ld. 3.6.2.1), amelynek hatására szignifikánsan csökkent a vércukorszint (a

diabéteszes csoport 30 mM értékéről kb. 20 mM-ra) és jelentősen növekedett a máj glikogéntartalma (17. ábra).

Tanulmányoztuk a TH kezelés hatását a glikogénanyagcserét szabályozó enzimekre is (18. ábra).



18. ábra. TH kezelés hatása a glikogén foszforiláz (üres jelek) és glikogén szintetáz (fekete jelek) aktivitására sztreptozotocin-indukált diabéteszben

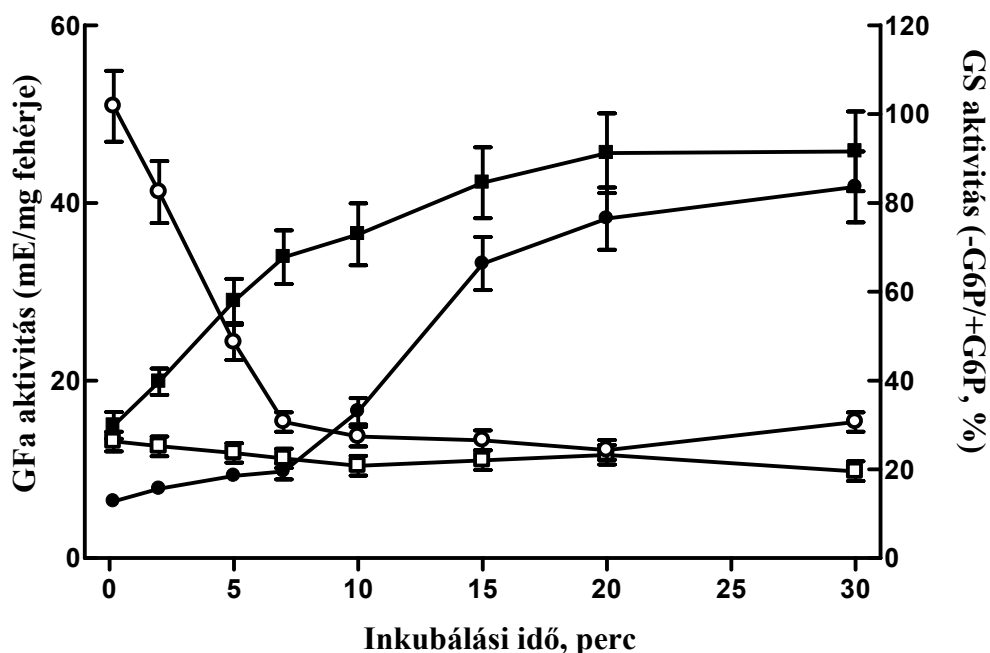
Tízszeres szubkután (*s.c.*) TH kezelés (100 μ mol/testsúly kg) hatása sztreptozotocin-indukált diabéteszes patkányok májából készített gél-szűrt májkivonatban. A májkivonatot 30°C-on inkubáltuk és a különböző időpontokban meghatároztuk az enzimaktivitásokat. GPa (üres jelek) és GS (fekete jelek) enzimaktivitások a kezeltlen (○, ●) a diabéteszes (□, ■) és a TH-kezelt diabéteszes állatok (Δ, ▲) májkivonatában. A mérési eredmények 4 kísérlet átlagát $\pm$ SD reprezentálják.

A GF és GS koordinált defoszforilációja jól megfigyelhető volt a kontroll és a sztreptozotocin-diabéteszes állatok gél-szűrt májkivonatában. Amikor a GFa szintje jelentősen lecsökkent, akkor indult be a GS aktiválása, defoszforilációja, amelyet a GS aktivitás $-G-6-P/+G-6-P$ hányadosának emelkedése jelzett. A TH-kezelt diabéteszes

patkányok géliszűrt májkivonatának GFa aktivitása már az első mérési pontban csekély volt, ezért a GS aktiválásában nem volt latencia, az enzim defoszforilációja azonnal megindult.

4.5. TH hatásának a vizsgálata Zucker diabéteszes (ZDF) patkányokban

A ZDF patkányokban 14-16 hetes korban fejlődik ki a diabétesz, a hím állatokat magas vércukorszint és inzulinrezisztencia jellemzi. A hiperglikaemia (a glükózkoncentráció a normálérték 3-4-szerese), poliurea és polidipszia miatt általánosan használják a II. típusú diabétesz modelljeként elsősorban antidiabetikus szerek vizsgálatára.



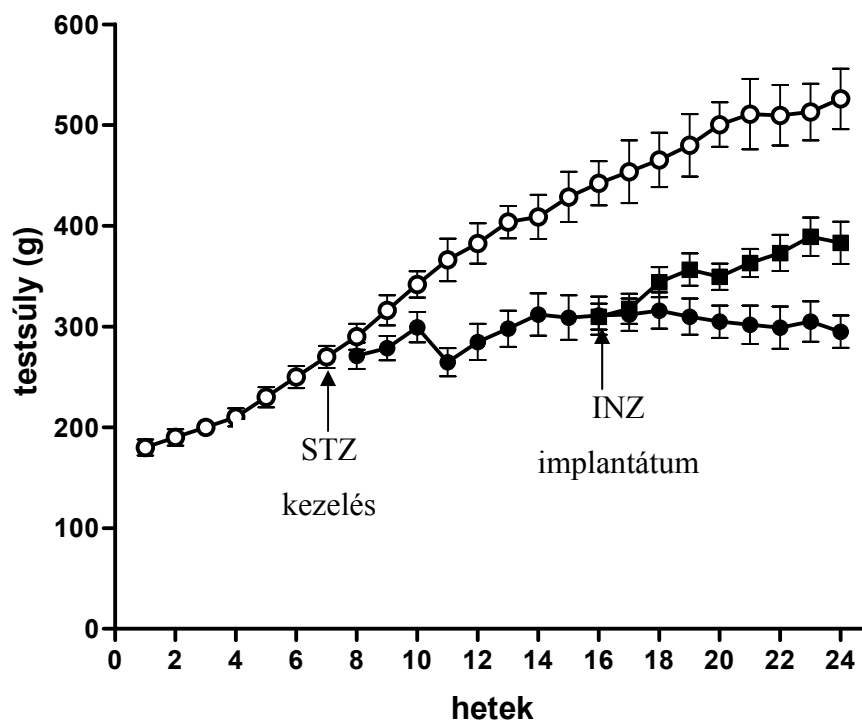
19. ábra. Intravénás TH kezelés hatása ZDF patkányokra

Intravénásan adott TH (100 μ mol/testsúly kg) hatása a GF aktiválódására (üres jelek) és a GS inaktiválódására (tele jelek) spontán diabéteszes Zucker patkányok májából preparált gélszűrt kivonatban. A kísérlet során a TH-t az első májlebeny (○, ●) lemetzése után közvetlenül a *vena porta*-ba adtuk és 5 perc elteltével lemetsettük a következő májlebenyt (□, ■). A májszeleteket Potter-Elvehjem tubusban homogenizáltuk kétszeres térfogatú jéghideg pufferben (250 mM szaharóz, 40 mM Tris-HCl, pH 7.4), majd 10 percig centrifugáltuk (10000xg). A centrifugálás során keletkezett felülúszót Sephadex G-25 oszlopon szűrtük és a szűrletet 10 mM (NH₄)₂SO₄ és 2 mM Mg-acetát jelenlétében 30°C-on inkubáltuk és az ábrán megadott időpontokban meghatároztuk az enzimaktivitásokat. A mérési eredmények 5 kísérlet átlagát $\pm$ SD reprezentálják.

ZDF patkányok gélszűrt májkivonatában is megfigyelhető a GFa és GSb szekvenciális defoszforilációja (19. ábra). Tanulmányoztuk közvetlenül a *vena porta*-ba jutatott TH (50 mg/testsúly kg) hatását is. Látható, hogy a potenciális antidiabetikum adására GF aktív formájának mennyisége lecsökkent és latencia nélkül bekövetkezett a GS aktív formájának a képződése. Ez utóbbi hozzájárulhat a vércukorszint csökkentéséhez.

4.6. TH hatása Wistar patkányok vércukorszintjére és inzulinérzékenységére

Ebben a kísérletsorozatban is sztreptozotocin-indukált diabéteszes patkányokat alkalmaztunk diabéteszes modellként és először azt vizsgáltuk, hogy az inzulin implantátum milyen mértékben képes kivédeni a sztreptozotocin hatását.



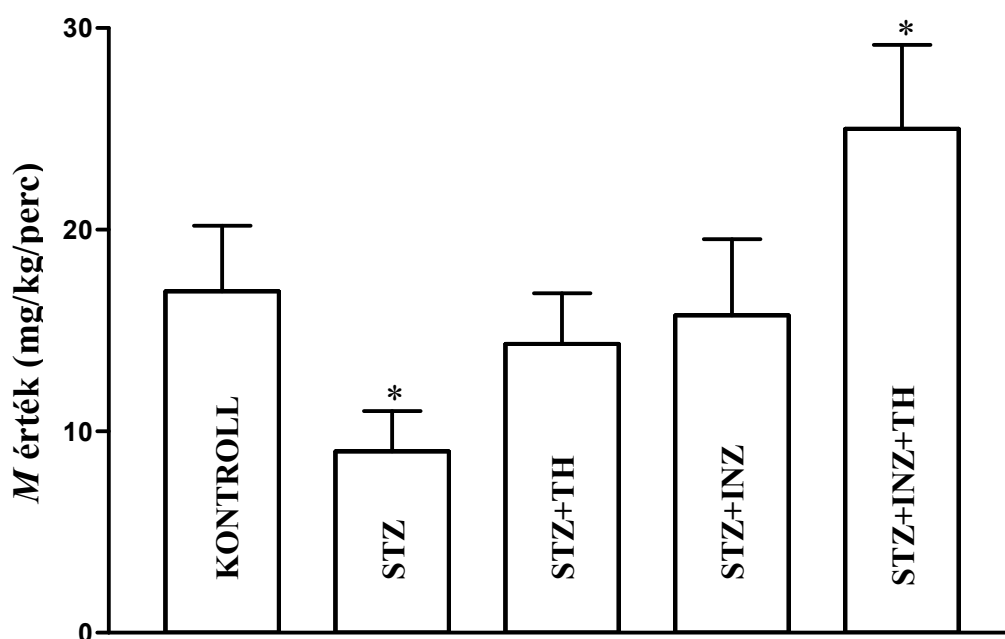
20. ábra. Patkányok testtömegének változása

A kísérlet első szakaszában az állatokat három csoportra osztottuk: kontroll Wistar patkányok (○), sztreptozotocin-indukált diabéteszes állatok (STZ) (●) és az STZ-indukált diabéteszes állatok a bőr alá ültetett inzulin implantátummal (INZ) (■). A kezelt csoportok mindegyike 6-6 állatból állt ($P \leq 0,05$).

A 20. ábrából látható, hogy a kontroll Wistar patkányok testsúlya a kísérlet során (1-24 hét) folyamatosan növekedett, amely növekedés az egyszeri sztreptozotocin kezelés (60 mg/testsúly kg *i.v.* a 7. héten) hatására megállt. Az inzulin implantátum beültetése után (16. héten) az állatok testtömege újra növekedni kezdett, de nem érte el

az egészséges állatok tömegét, bár a növekedés mértéke gyakorlatilag megegyezett a kontroll csoportéval.

A sztreptozotocin kezelés hatására az állatokban az inzulin iránti érzékenység jelentősen lecsökkent. Ezt az érzékenységet egyszeri *i.v.* adott 100 $\mu\text{mol/kg}$ TH az eredeti, kezeletlen állatok szintjére állította vissza. Hasonló eredményt értünk el, amikor a sztreptozotocinnal kezelt állatokba inzulin implantátumot ültettünk. A diabéteszes állatok inzulin iránti érzékenysége viszont szignifikánsan növekedett azokban az állatokban, amelyek az inzulin implantátum beültetése után TH kezelést is kaptak (21. ábra).



21. ábra. TH hatása (100 $\mu\text{mol}/\text{testsúly kg}$ *i.v.*) az inzulin érzékenységre (*M* érték) a különböző állatcsoportokban

Az inzulinérzékenység meghatározását az *i.v.* TH kezelés (100 $\mu\text{mol}/\text{testsúly kg}$) után 30 perccel kezdtük el. *M* érték: glükóz infúzió sebessége (mg glükóz/ testsúlykg/perc). Állatcsoportok: kontroll Wistar patkányok (kontroll), sztreptozotocin-indukált diabéteszes állatok (STZ), TH-kezelt STZ állatok (STZ+TH), STZ állatok inzulin implantátummal (STZ+INZ), TH-kezelt STZ állatok inzulin implantátummal (STZ+INZ+TH). * szignifikáns ($p < 0,05$) eltérés a kontroll értékhez képest.

Tanulmányoztuk a vér glükózkoncentrációját és a plazma inzulinszintjét is. Az állatok nyugalmi állapotát 30 perc altatás után értük el, amikor stabilizálódott pl. a

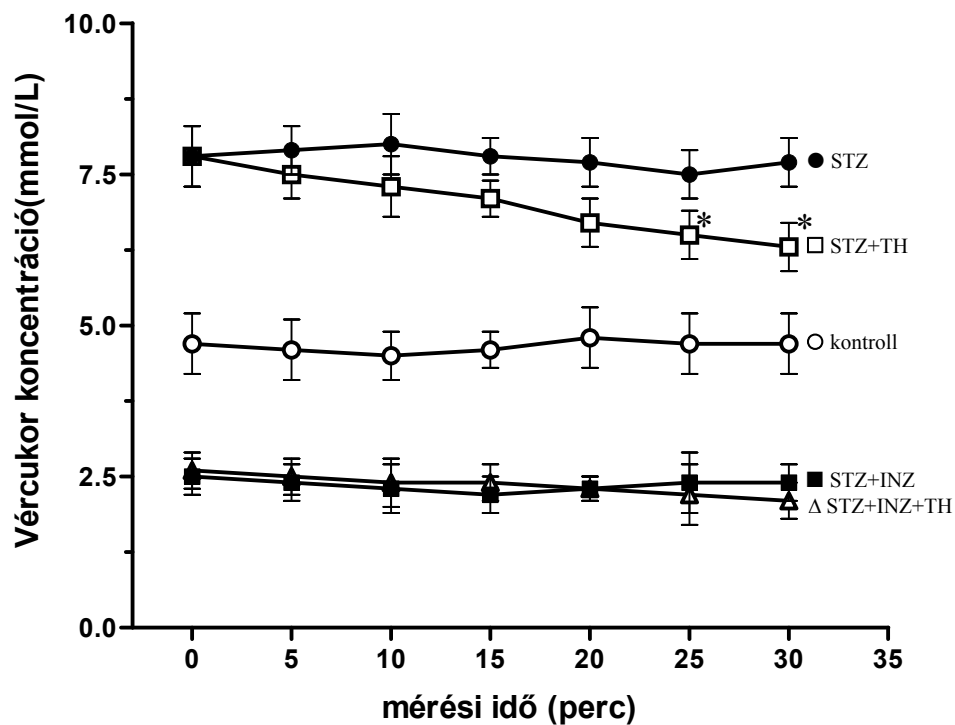
vércukorszint, vérnyomás, pulzus, stb. Ezután meghatároztuk a vércukorszintet és a plazma inzulinszintjét mindhárom kísérleti csoportban (8. táblázat).

8. táblázat. A vér glükóz-koncentrációja és a plazma inzulinszintje egészséges kontroll Wistar patkányokban, indukált diabéteszben (STZ) és indukált diabéteszben inzulin implantátummal (STZ + INZ)

* szignifikáns eltérés az egészséges kontrollhoz képest, [#] szignifikáns eltérés az STZ csoporthoz képest.

	Egészséges kontroll	STZ	STZ + INZ
Plazma inzulin (μ IU/ml)	$9,6^{\#} \pm 1,9$	$3,2^* \pm 2,2$	$65,8^{*\#} \pm 10,5$
Vércukor (mmol/l)	$4,71^{\#} \pm 0,5$	$7,80^* \pm 0,5$	$2,73^{*\#} \pm 0,3$

Látható, hogy a sztreptozotocin kezelés jelentősen csökkentette a plazma inzulinszintjét, ugyanakkor a vércukor-koncentrációja jelentősen megnőtt. Az inzulin implantátum természetesen növelte a plazma inzulinszintet és az egészséges kontroll csoporthoz képest is szignifikánsan kisebb vércukor-koncentráció volt mérhető.



22. ábra. Intravénásan adott TH (100 μ mol/testsúly kg) vércukorszint csökkentő hatása

Az állatcsoportokat 16 óra éheztetés után *i.v.* 100 mg/testsúly kg TH-val kezeltük. Öt perces intervallumokban ellenőriztük az állatok vércukorszintjét. * szignifikáns ($p < 0,05$) eltérés a 0 perces kontroll értékhez képest.

Tanulmányoztuk egyszeri TH kezelés (100 μ mol/testsúly kg) hatását a fenti kísérleti csoportokban (22. ábra). A TH kezelést követően a vércukorszintet 30 percig ellenőriztük 5 perces intervallumokban. Az egyszeri TH kezelés a hiperglikaemiás állatokban már 30 perc alatt csökkentette a vér glükózkonzentrációját, míg az inzulin implantátummal (Linplant[®]) kezelt állatok vércukorszintjét már nem csökkentette, vagyis a TH és az inzulin hatása nem adódott össze.

5. MEGBESZÉLÉS

A II. típusú diabétesz a modern társadalmak újabban jelentkező népbetegsége. A betegség oka többféle genetikai tényező és helytelen életmód együttes hatására alakulhat ki. Metabolikus következményei az emelkedett vércukorszint mellett az inzulinszekréció és hatás jelentős megváltozása. A szervezet glükózháztartásának több mint 90 százalékaért a máj a felelős. Egészséges egyéneknél a máj glükóz homeosztázisát az inzulin és az ellentétesen ható hormon, a glükagon szabályozza. A II. típusú diabéteszben a máj inzulinrezisztenciája párosul emelkedett glükagon koncentrációval, ami magas vércukorszinthez vezet (ld. összefoglaló munkák: [94, 112, 113]).

Az irodalmi áttekintésben utaltunk a máj GF szerepére a glikogénanyagcserében és kapcsolatára a glikolízissel (2. ábra). Alapvetően a glükóz a májban két útvonalon képződik: a glikogén lebontásával (glikogenolízissel) és *de novo* glükózsintézissel (glükoneogenezissel). Elsősorban a glikogenolízis a felelős a vércukorszintért (~ 70 %), sőt a glükoneogenezisben képződött glükóz is belép a glikogénanyagcsere ciklusba: glikogénné, majd újra glükózszármazékká alakulva [73]. Ezen felismerések vezettek a GF, mint lehetséges molekuláris célpont kijelöléséhez a II. típusú diabétesz terápiájában. A GF izoenzimek közül a vázizom- és májspecifikus fehérjék jól jellemeztek, továbbá ismert a nyúl vázizom és a humán máj GFb és GFa nagy felbontású kristályszerkezete is. A lehetséges inhibitorok vizsgálata a könnyebb elérhetőség miatt a nyúl vázizom enzimre korlátozódik, bár több munkacsoport is közöl gátlószerekkel kapcsolatos adatokat a máj GF-re.

5.1. Glükózszármazék vegyületek szerkezet – gátlás vizsgálata

Az enzim több lehetséges gátlási felszínnel (pl. AMP és indol kötőhelyek, aktív centrum) rendelkezik. A Debreceni Egyetem két munkacsoportja vállalkozott arra, hogy korábbi tudományos érdeklődésüknek megfelelően GF aktivitását gátló szénhidrát-származékokat állítson elő (DE TTK Szerves Kémiai Tanszék) és ezeket a vegyületeket

tisztított GF enzimformákra vizsgálja, valamint adatokat gyűjtsön a lehetséges *in vivo* hatásokról is (DE ÁOK Orvosi Vegytani Intézet).

Az aktív centrumra ható inhibitorok közül az egyik leghatékonyabbnak bizonyult a tiohidantoinhoz kapcsolt glükózszármazék a TH, amit sztereoszelektíven és nagy mennyiségben is sikerült előállítanunk [67]. A röntgenkristallográfiás adatok alapján [105] igazoltuk, hogy a TH a nyúl vázizom GFb aktív centrumához kötődik és ott számos intermolekuláris kölcsönhatás segítségével kapcsolódik és stabilizálódik a környezetében található aminosav-oldalláncokkal. Ezek a kölcsönhatások az enzim inaktív T állapotát, valamint harmadlagos szerkezetét csak kis mértékben befolyásolják. A TH összeségében 15 H-kötéssel és 67 van der Waals kölcsönhatás segítségével stabilizálódik az enzim aktív centrumában. A TH a GFb enzimhez kötődve az inaktív T-állapotot stabilizálja és megakadályozza, hogy a T→R átalakulás során a 280-as hurok megnyíljon és oda szubsztrát(ok) tudjanak kötődni [105].

Az általunk vizsgált gátlószerek a szerkezetükből adódóan (glükózalapú molekulák) elsősorban a GF aktív centrumához („ β -csatorna”) kötődnek és az ott található aminosavak (282-287) oldalláncjaival alakítanak ki másodrendű kölcsönhatásokat. Az enzim inaktív T-állapotában a β -csatorna és a 280-as hurok részben blokkolva van térszerkezeti változások következtében [114]. A GF inaktív T-állapotból aktív R-állapotba való alakulása során a β -csatorna szabaddá válik és így a szubsztrát (glikogén) által könnyen megközelíthetővé válik [115, 116].

Az egyik legkorábbi glükózalapú inhibitor, az N-acetil- β -D-glükopiranozil-amin gátlási állandója 60-szor kisebb, mint a GF természetes gátlószereének, a glükóznak a K_i értéke [117]. Röntgenkristallográfiái vizsgálatok feltárták, hogy a gátlószer amid-csoportja H-kötést alakít ki a GF enzim His377 karbonil-csoportjának oxigénatomjával [118]. Ez a felismerés adta a lehetőséget munkacsoportunknak, hogy további, újonnan szintetizált amidszármazékok és N-acil-karbamidok GFb enzimaktivásra gyakorolt hatását és gátlásukat (K_i vagy IC_{50}) meghatározzuk (3.-6. táblázatok).

A mérési adatokat az eredmények részben elemeztük, most néhány általános következtetést ismertetünk. Azok a vegyületek, amelyek a hidantoinváz egyes elemeit tartalmazzák csökkentették a vázizom GFb aktivitását. A metilcsoporthoz képest (3. táblázat 1 vegyület) a trifluoracetil-D-glükopiranozil-aminok anomer párjaiban

csökkent a K_i értéke. Az aromás csoportot tartalmazó amidoldallancok is gyengébb gátláshoz vezettek (3. táblázat 6-9, 4. táblázat 13-18 vegyületek), de a naftilcsoport bevitelével igen jó gátlási állandókat kaptunk (5. táblázat 23 és 24 vegyületek). Hasonlóan kis K_i értékű a 4. táblázat naftalinszármazéka is (11 vegyület).

A molekulacsalád további tagjai, a N-(β -D-glükopiranozil)-N'-aróil-karbamidok (5. táblázat), amelyek tulajdonképpen „nyíltlancú” hidantoin származékoknak is tekinthetők, kinetikai és röntgenkristallográfiás adatok alapján igen érdekes eredményeket mutattak. A fenilcsoport egyik H-atomjának helyettesítésével kapott származékok gátlási állandói is a mikromol tartományban vannak. A naftoil-karbamid származékok, pedig a legjobb GF gátlószereknek tekinthetők (5. táblázat 24 vegyület).

Részletesen vizsgáltuk a benzoil-karbamid (N-benzoil-N'- β -D-glükopiranozil-karbamid) kötődési lehetőségeit a GFb enzimhez (16. ábra). A molekula a nyúl vázizomból preparált GFb katalitikus centrumához kapcsolódik, ahol az inhibitor karbamid része és benzoil-csoportja kitölti az úgynevezett szubsztrátzsebet a His341 aminosav-oldallánchoz kapcsolódva [40].

Az inhibitor enzimhez való kötődését 21 H-kötés és 96 van der Waals kölcsönhatás (7 apoláris-apoláris, 16 poláris-poláris és 73 poláris-apoláris) stabilizálja. Az inhibitor kötődése az enzim katalitikus centrumához jelentős strukturális változást hoz létre a 280-as hurokban. Ez a konformációváltozás még szorosabb kötődést biztosít az enzim és a gátlószer között. A gátló hatás két konformációváltozással valósul meg. Az egyik az, hogy míg a natív GFb enzim His571 és Asp283 oldalláncai között H-kötés alakul ki, addig a benzoil-karbamid-GFb komplexben a His571 oldallánca 20° -kal elfordul és ez a H-kötés nem jöhet létre. A másik konformációváltozás pedig az, hogy az enzim inaktív T-állapotában a Phe285 és a Tyr613 oldalláncai apoláris kölcsönhatással kapcsolódnak egymáshoz [89], addig a benzoil-karbamid-GFb komplexben ez a kölcsönhatás úgy valósul meg, hogy az Asn284 oldallánca segítségével szendvicset képez a Phe285 és a Tyr613 oldalláncai között, „tönkretéve” ezzel az aktív centrumot és utánozva a T $\rightarrow$ R állapot átalakulását.

A GF új allosztérikus vagy indol kötőhelyet, a dimer enzim központjában a monomerek kapcsolódási pontjánál azonosították [41, 43, 89]. A benzoil-karbamid egy konformációváltozás következményeként (15. ábra), amikor az úgynevezett „s-transz” geometriát veszi fel, képes kötődni a GFb indol kötőhelyéhez. Az enzim-inhibitor

komplexet 9 H-kötés és 80 Van der Waals kölcsönhatás stabilizálja. A benzoil-karbamid benzoil-csoportja 43 van der Waals kölcsönhatást, míg a karbamid „rész” 14 további másodrendű kölcsönhatást alakít ki a két monomer találkozásánál található kötőhely aminosav oldalláncaival. A molekula harmadik csoportja a glükopiranozgyűrű szintén másodrendű kölcsönhatásokkal stabilizálódik az új gátlóhelyen (19 másodrendű kölcsönhatás). Itt jegyezzük meg, hogy a benzoil-karbamid nyúl vázizom GFb-vel kapott gátlási adatainak kinetikai analízise (Lineweaver-Burk és Dixon-szerint) felvetette az inhibitor molekula két helyen és eltérő affinitással történő kapcsolódását az enzimhez (nem bemutatott eredményünk).

A benzoil-karbamid kötődése a GF indol kötőhelyéhez nem okoz konformációváltozást az enzim szerkezetében, hasonlóan az ehhez a gátlóhelyhez kapcsolódó CP320626 inhibitorhoz (vö. 8. ábra) [41]. Fontos hangsúlyozni, hogy a benzoil-karbamid kötődni képes a GF új, allosztérikus (indol) kötőhelyéhez is, ahová eddig kizárólag indol-2-karboxamid típusú vegyületek kapcsolódtak. Ez a megfigyelés hasznos lehet a további potenciális antihyperglükemiás szerek kifejlesztésében is.

Összegzésként elmondható, hogy a benzoil-karbamid a nyúl vázizomból preparált GFb enzim aktív centrumához és az indol kötőhelyéhez egyaránt kapcsolódik. A gátlószer mind a két kötőhelyén több másodrendű kölcsönhatás segítségével stabilizálja az enzim-inhibitor komplexet. Így a röntgenkristallográfiás adatok elemzése után megszerkesztve az enzim-inhibitor komplex képét azt kapjuk, hogy minden dimer enzim négy inhibitor megkötésére képes: 1-1 a két monomer aktív centrumában és 1-1 a monomerek kapcsolódásánál (23. ábra).



23. ábra. A benzoil-karbamid kötődése a GFb dimer molekulához

Egy dimer GFb molekulához négy benzoil-karbamid (N-benzoil-N'- β -D-glükopiranozil-karbamid) kötődhet: egy-egy a monomerek aktív centrumához (piros molekulák), míg egy-egy a monomerek kapcsolódásánál lévő indol kötőhelyhez (narancssárga molekulák). A nyúl vázizom GFb dimer molekulában feltüntettük az AMP kötőhelyhez kapcsolódó IMP molekulákat (lila) is.

5.2. TH hatásának vizsgálata a máj glikogén anyagcseréjére

Ismeretes, hogy a máj GF enzim mellett a GS aktivitását is reverzibilis foszforiláció szabályozza. Míg a GF enzimet egyetlen kináz (a foszforiláz kináz) foszforilálja és ezáltal enzimatikusan aktiválja (GFa), addig a GS különböző kinázokkal (pl. PKA, GSK-3) foszforilálható többféle Ser oldalláncon. A GS defoszforilált formája a katalitikusan aktív (GSa) a foszforiláció során inaktiválódik és GSb formává alakul át. A két enzim (GF és GS) defoszforilációja összehangolt szabályozással valósul meg a

glikogénpartikulákhoz kötött protein foszfatáz-1 hatására: először a GFa defoszforilálódik csak ezt követően indul be a GSa képződése, azaz latencia figyelhető meg az aktív GS képződésében. A GFa a GSb defoszforilációjában allosztérikus inhibitornak tekinthető [53, 61, 119].

A glükóz és vegyületei a fenti mechanizmus alapján segítik elő a GFa inaktiválódását (defoszforilációját) májban. A TH máj glikogénanyagcserére kifejtett hatását először Wistar patkányokból preparált gélzsúrt kivonatban vizsgáltuk. 50 μ M TH elősegítette a GF aktív és a GS inaktív formájának a defoszforilációját és csökkentette a GS aktiválódásában bekövetkező latenciát. A GFa aktivitásának a csökkenése, a foszfatáz aktivitás növekedése és a GS aktiválódása együttesen a glikogén lebontását gátolja, amely gátlás a vér glükóz-koncentrációjának a csökkenéséhez vezet. A mechanizmus, amely során a TH mintegy inaktiválja a GF-t és aktiválja a GS-t, összetett. Kinetikai és röntgenszerkezet vizsgálataink alapján nyilvánvaló, hogy a TH-GF komplex kialakulása okozza az enzim gátlását és indítja be a GS defoszforilációját anélkül, hogy a GFa koncentrációja jelentősen lecsökkenne, s ezáltal allosztérikus inhibitor hatása megszűnhetne. Hasonló mechanizmussal megy végbe a glükóz latenciát csökkentő hatása is, bár ehhez nagyságrendekkel több ligandra van szükség (20 μ M TH, illetve 20 mM glükóz mutat közel azonos változást). Úgy tűnik, hogy a TH és a szerkezetileg hasonló glükózszármazékok glikogén metabolizmusra gyakorolt hatása lehetővé teszi az ilyen típusú vegyületek esetleges alkalmazását a hiperglikaemia kontrolálására.

A kémiai ágensek, mint az alloxán- és sztreptozotocin-indukált diabétesz állatkísérleti modellek általánosan elterjedtek a II. típusú diabétesz tanulmányozására. Régóta ismert, hogy az alloxán számos laboratóriumi állatban szelektíven pusztítja a pankreász β -sejtjeit: inzulinhiányt, hiperglikaemiát és ketózist okozva [120]. Az alloxán vizes oldatának instabilitása, továbbá az állatokban kialakuló jelentős toxicitás miatt az antibiotikum származék sztreptozotocin használata terjedt el. Hatása hasonló az alloxánhoz, ez is a pankreász β -sejtjeinek elhalásához vezet, valószínűleg a vegyület nitrozo-karbamid részének tulajdoníthatóan. A sztreptozotocin más folyamatokat is módosít, pl. DNS töréseket okoz, amit a poli-ADP-ribóz-szintetáz aktivitásának növekedése is igazol. Napjainkban a hipoglikaemiás anyagok és inzulinszerű

vegyületek vizsgálatára a sztreptozotocin-indukált kísérletes diabéteszes modell az elterjedt, mivel a hiperglikaemiás állapot hosszú ideig fenntartható és alig következik be mortalitás ketózis következtében [95].

Krónikus sztreptozotocin kezelést követően megfigyelték, hogy csökken a máj GF aktivitása, sőt az enzim fehérjeszintje és mRNS mennyisége is. Az izolált hepatocitákban kimutatták, hogy az mRNS felezési ideje legalább a felére csökkent a kezelt patkányokban, amit inzulin adagolásával ki lehetett védeni [121]. A glikogénanyagcsere módosulását is megfigyelték patkányok sztreptozotocin-indukált diabéteszes modelljében: a vércukorszint négyszeresére emelkedett és ezzel párhuzamosan a májban a glikogén mennyisége harmadára csökkent a normál (nem kezelt) vagy inzulinnal kezelt diabéteszes állatokéval összehasonlítva [121].

Hasonló eredményeket kaptunk saját kísérleteinkben is (17. ábra): a szérum glükózkoncentráció kb. négyszeresére növekedett a sztreptozotocin-indukált diabéteszes patkányokban, míg a májglikogén mennyisége több mint tizedére csökkent. TH hosszantartó kezeléssel (tíz alkalommal másnaponként) a vércukorszint szignifikánsan csökkent, ami a TH antihiperglikaemiás hatására utal. Szembetűnő az is, hogy a diabéteszes állatok májglikogén tartalma jelentősen javul, csaknem eléri a kontroll értéket. Feltételezzük, hogy a TH antihiperglikaemiás hatása elsősorban a GS latenciájának megszüntetésével magyarázható – hasonlóan a normál állatok géliszt májkivonatában megfigyelthez – és ezért növekszik jelentősen a májglikogén tartalma. A TH ugyanakkor nem tudja kellőképpen ellensúlyozni a sztreptozotocin jelenlétében kialakult magas glükagon koncentrációt, ami döntően hozzájárul a kezelt állatok magas vércukorszintjéhez.

A genetikailag módosított állatkísérleti modellek alkalmasabbak a II. típusú diabétesz tanulmányozására, mivel a magas vércukorszint és inzulinrezisztencia mellett az elhízás is megfigyelhető (vö. 2.8. fejezet). A Zucker diabéteszes hím patkányokban is hatásos volt a TH kezelés, csökkent a GF aktív formájának mennyisége és a GS aktiválódása latencia nélkül következett be (19. ábra). Egy másik GF inhibitor (FR258900) alkalmazva diabéteszes állatmodellekben (*db/db* egerek és sztreptozotocin-indukált diabétesz) hipoglikaemiás hatást írtak le, glükóztolerancia tesztben csökkent a szérumglükóz koncentrációja [79].

Adataink felvetették a vizsgált vegyület (TH) esetleges hatását normál és sztreptozotocin kezelt állatok vércukorszintjére és inzulinérzékenységére (20.-22. ábrák). Korszerű kísérleti módszerünkben – megegyezik a gyógyszerkipróbálásokra nemzetközileg elfogadott standarddal – sikerült kimutatnunk, hogy az egyszeri TH kezelés az inzulinérzékenységet helyreállítja. Hasonló eredményt értünk el inzulin implantátum beültetésével. A TH szignifikánsan csökkentette a vércukorszintet is a sztreptozotocin kezelt Wistar patkányokban. Felvetik, hogy a sztreptozotocin kezelésre megnőtt vércukorszint nem az inzulinrezisztenciának tulajdonítható, hanem a túlzott glükóz képződésnek, elsősorban a glükoneogenezis útvonalának felpörgetésével [122]. Ez magyarázhatja azt a megfigyelésünket, hogy TH kezeléssel a máj glikogéntartalma jelentősen helyreállítható, s feltehetőleg nem ez a forrása a glükoneogenezissel képződő vércukornak. Összehasonlították a metformin és pioglitazon hatását állatkísérletekben magas zsírtartalmú diéta alkalmazásával. A két vegyület hasonlóképpen hatott a szénhidrátanyagcserére és az inzulinrezisztenciára a nagy zsírtartalmú diétában, de különbözően befolyásolta a diabéteszes állatcsoportokat. Sztreptozotocin kezelést követően mindkét szer csökkentette a vércukorszintet, de csak a metformin növelte a májglikogén koncentrációt [123]. Úgy tűnik, hogy a GF gátlásával működő TH bizonyos szempontból hasonlíthat a metformin jól ismert metabolikus következményeire.

Összegezve megállapíthatjuk, hogy a máj GF jelentős célmolekulája lehet az antihyperglukaemiás szerek további kutatásának. A glükózanalóg vegyületek és azok májglikogén metabolizmusra kifejtett hatása értékes alapkutatási eredményeket tárt fel és a kezdeti állatkísérleti eredmények biztatóak.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A máj glikogén elsődleges feladata a glükóz raktározása, reverzibilis lebomlási és felépítési folyamataival hozzájárul a vércukorszint fenntartásához. Izomban és májban a glikogén szintézise és lebontása a GF és a GS enzimek szabályozásával történik. A GF a glikogén lebontásának első lépését katalizálja, az enzim többek között gátlható glükózzal és glükózanalog vegyületekkel. Feltételezhető, hogy a GF gátlószerei alkalmasak lehetnek a II. típusú diabétesz terápiás kezelésére, a máj enzimet, mint a gyógyszerkísérletek lehetséges célpontját azonosították.

Jelen munkánk egyik célja, hogy megvizsgáljuk az újonnan szintetizált glükózanalog inhibitorok nyúl vázizomból és patkány májból tisztított GF-re kifejtett gátló hatását. Vizsgálataink során azonosítottunk egy spiro-tiohidantoin származékot, amelynek a GF-ra kifejtett gátlási állandója (K_i) a mikromólos tartományba esik. Több olyan szubsztituált karbamidszármazékot is azonosítottunk, amelyek a GF jó gátlószerei, röntgenkristallográfiás adatok alapján az enzim aktív centrumához és a nemrégiben felfedezett új allosztérikus gátlóhelyéhez kötődik az egyik ilyen vegyület.

A glükopiranozilidén-spiro-tiohidantoin (TH) mind a vázizom, mind a máj GF enzimek hatékony gátlószere. Kimutattuk, hogy 50 μ M TH Wistar patkányok májából készített géliszűrt kivonatban felfüggesztette a GF és GS koordinált szabályozását, megszüntette a latenciát a GS aktiválásában. Sztreptozotocin-indukált diabéteszes állatokban a TH kezelés hatására jelentősen csökkent a vércukorszint és növekedett a máj glikogéntartalma. Elhízott Zucker diabéteszes patkányokat *i.v.* TH-val kezelve a kontrollhoz képest jelentősen csökkent a máj GFa szintje és a GS aktiválódása is gyorsult.

Ezen kívül vizsgáltuk a TH hatását kontroll és sztreptozotocin indukált diabéteszes patkányok inzulinérzékenységére és vércukorszintjére. A TH fokozta az inzulinérzékenységet a kezelt állatokban elősegítve ezzel a vércukor-koncentrációjának helyreállítását: lehetséges antihyperglükemiás hatása állatkísérletekben igazolható volt.

SUMMARY

The major role of liver glycogen is to supply glucose to the circulation maintaining the normal blood glucose level. In muscle and liver, the accumulation and breakdown of glycogen are regulated by the reciprocal activities of glycogen phosphorylase and glycogen synthase. Glycogen phosphorylase catalyses the key step of glycogen degradation and its activity can be inhibited by glucose and its analogues. Obviously, any readily accessible inhibitor of glycogen phosphorylase can be used as a potential therapy of non-insulin-dependent or type 2 diabetes. Hepatic glycogen phosphorylase has been identified as a new target for drugs that control blood glucose concentration.

One of the aims of our present study was studying the newly synthesized glucose analogue inhibitors by assaying the inhibitory potential with purified rabbit muscle or rat liver glycogen phosphorylases. Our investigations showed that spiro-thiohydantoin derivatives are very potent inhibitors with K_i values in the low micromolar range. Furthermore, substituted ureas have been identified as good inhibitors also binding to the active center and the recently discovered new allosteric binding site of glycogen phosphorylase as revealed by crystallographic studies. By the assay of several glucose derivatives as possible inhibitors of glycogen phosphorylase structure-activity relations were analyzed.

Glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin (TH) was found as one of the most potent glucose derivate which inhibits the catalytic activity of both muscle and liver glycogen phosphorylase. We have demonstrated the co-ordinated regulation of glycogen phosphorylase and synthase by 50 μ M TH in liver extracts of Wistar rats resulting in the activation of synthase by shortening the latency compared with control animals. TH was also effective in lowering blood glucose level and restoring hepatic glycogen content in streptozotocin-induced diabetic rats. Furthermore, intravenous administration of TH to Zucker diabetic fatty rats significantly decreased the hepatic glycogen phosphorylase α level and the activation of synthase started without any delay.

TH was also tested on the insulin sensitivity and blood glucose level of control and streptozotocin-treated rats. TH increased the insulin sensitivity and also contributed to the partial restoration of blood glucose level of treated animals proving its efficiency as a possible antihyperglycaemic agent.

7. FELHASZNÁLT IRODALOM

1. Shaw, J.E., R.A. Sicree, and P.Z. Zimmet, *Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030*. Diabetes Res Clin Pract, 2010. 87(1): p. 4-14.
2. Steck, A.K. and M.J. Rewers, *Genetics of type 1 diabetes*. Clin Chem, 2011. 57(2): p. 176-85.
3. Yoon, J.W., S.H. Ihm, and K.W. Kim, *Viruses as a triggering factor of type 1 diabetes and genetic markers related to the susceptibility to the virus-associated diabetes*. Diabetes Res Clin Pract, 1989. 7 Suppl 1: p. S47-58.
4. Goldbeter, A. and D.E. Koshland, Jr., *Energy expenditure in the control of biochemical systems by covalent modification*. J Biol Chem, 1987. 262(10): p. 4460-71.
5. Moller, D.E., *New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome*. Nature, 2001. 414(6865): p. 821-7.
6. Green, A., N. Christian Hirsch, and S.K. Pramming, *The changing world demography of type 2 diabetes*. Diabetes Metab Res Rev, 2003. 19(1): p. 3-7.
7. Hanhineva, K., R. Torronen, I. Bondia-Pons, J. Pekkinen, M. Kolehmainen, H. Mykkanen, and K. Poutanen, *Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism*. Int J Mol Sci, 2010. 11(4): p. 1365-402.
8. Somsák, L., É. Bokor, K. Czifrák, L. Juhász, and M. Tóth, *Carbohydrate derivatives and glycomimetic compounds in established and investigational therapies of type 2 diabetes mellitus*. Type 2 Diabetes, 2011. Book 3(InTech Open Access Publisher): p. accepted for publication.
9. Tahrani, A.A., C.J. Bailey, S. Del Prato, and A.H. Barnett, *Management of type 2 diabetes: new and future developments in treatment*. Lancet, 2011. 378(9786): p. 182-97.
10. Agius, L., *New hepatic targets for glycaemic control in diabetes*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2007. 21(4): p. 587-605.
11. Dunning, B.E. and J.E. Gerich, *The role of alpha-cell dysregulation in fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes and therapeutic implications*. Endocr Rev, 2007. 28(3): p. 253-83.
12. Mu, J., G. Jiang, E. Brady, Q. Dallas-Yang, F. Liu, J. Woods, E. Zycband, M. Wright, Z. Li, K. Lu, L. Zhu, X. Shen, R. Sinharoy, M.L. Candelore, S.A. Qureshi, D.M. Shen, F. Zhang, E.R. Parmee, and B.B. Zhang, *Chronic treatment with a glucagon receptor antagonist lowers glucose and moderately raises circulating glucagon and glucagon-like peptide 1 without severe alpha cell hypertrophy in diet-induced obese mice*. Diabetologia, 2011.
13. McCormack, J.G., N. Westergaard, M. Kristiansen, C.L. Brand, and J. Lau, *Pharmacological approaches to inhibit endogenous glucose production as a means of anti-diabetic therapy*. Curr Pharm Des, 2001. 7(14): p. 1451-74.
14. Westergaard, N., P. Madsen, J.M. Lundbeck, P. Jakobsen, A. Varming, and B. Andersen, *Identification of two novel and potent competitive inhibitors of the glucose-6-phosphatase catalytic protein*. Diabetes Obes Metab, 2002. 4(2): p. 96-105.
15. Clore, J.N., J. Stillman, and H. Sugerman, *Glucose-6-phosphatase flux in vitro is increased in type 2 diabetes*. Diabetes, 2000. 49(6): p. 969-74.

16. Trinh, K.Y., R.M. O'Doherty, P. Anderson, A.J. Lange, and C.B. Newgard, *Perturbation of fuel homeostasis caused by overexpression of the glucose-6-phosphatase catalytic subunit in liver of normal rats*. J Biol Chem, 1998. 273(47): p. 31615-20.
17. Westergaard, N., C.L. Brand, R.H. Lewinsky, H.S. Andersen, R.D. Carr, A. Burchell, and K. Lundgren, *Peroxyvanadium compounds inhibit glucose-6-phosphatase activity and glucagon-stimulated hepatic glucose output in the rat in vivo*. Arch Biochem Biophys, 1999. 366(1): p. 55-60.
18. Parker, J.C., M.A. VanVolkenburg, C.B. Levy, W.H. Martin, S.H. Burk, Y. Kwon, C. Giragossian, T.G. Gant, P.A. Carpino, R.K. McPherson, P. Vestergaard, and J.L. Treadway, *Plasma glucose levels are reduced in rats and mice treated with an inhibitor of glucose-6-phosphate translocase*. Diabetes, 1998. 47(10): p. 1630-6.
19. Rider, M.H., R. Bartrons, and L. Hue, *Vanadate inhibits liver fructose-2,6-bisphosphatase*. Eur J Biochem, 1990. 190(1): p. 53-6.
20. van Dijk, T.H., F.H. van der Sluijs, C.H. Wiegman, J.F. Baller, L.A. Gustafson, H.J. Burger, A.W. Herling, F. Kuipers, A.J. Meijer, and D.J. Reijngoud, *Acute inhibition of hepatic glucose-6-phosphatase does not affect gluconeogenesis but directs gluconeogenic flux toward glycogen in fasted rats. A pharmacological study with the chlorogenic acid derivative S4048*. J Biol Chem, 2001. 276(28): p. 25727-35.
21. van Poelje, P.D., S.C. Potter, V.C. Chandramouli, B.R. Landau, Q. Dang, and M.D. Erion, *Inhibition of fructose 1,6-bisphosphatase reduces excessive endogenous glucose production and attenuates hyperglycemia in Zucker diabetic fatty rats*. Diabetes, 2006. 55(6): p. 1747-54.
22. Wright, S.W., A.A. Carlo, M.D. Carty, D.E. Danley, D.L. Hageman, G.A. Karam, C.B. Levy, M.N. Mansour, A.M. Mathiowetz, L.D. McClure, N.B. Nestor, R.K. McPherson, J. Pandit, L.R. Pustilnik, G.K. Schulte, W.C. Soeller, J.L. Treadway, I.K. Wang, and P.H. Bauer, *Anilinoquinazoline inhibitors of fructose 1,6-bisphosphatase bind at a novel allosteric site: synthesis, in vitro characterization, and X-ray crystallography*. J Med Chem, 2002. 45(18): p. 3865-77.
23. Vincent, M.F., M.D. Erion, H.E. Gruber, and G. Van den Berghe, *Hypoglycaemic effect of AICArriboside in mice*. Diabetologia, 1996. 39(10): p. 1148-55.
24. Matschinsky, F.M., M.A. Magnuson, D. Zelent, T.L. Jetton, N. Doliba, Y. Han, R. Taub, and J. Grimsby, *The network of glucokinase-expressing cells in glucose homeostasis and the potential of glucokinase activators for diabetes therapy*. Diabetes, 2006. 55(1): p. 1-12.
25. Aiston, S., K.Y. Trinh, A.J. Lange, C.B. Newgard, and L. Agius, *Glucose-6-phosphatase overexpression lowers glucose 6-phosphate and inhibits glycogen synthesis and glycolysis in hepatocytes without affecting glucokinase translocation. Evidence against feedback inhibition of glucokinase*. J Biol Chem, 1999. 274(35): p. 24559-66.
26. Zelent, D., H. Najafi, S. Odili, C. Buettger, H. Weik-Collins, C. Li, N. Doliba, J. Grimsby, and F.M. Matschinsky, *Glucokinase and glucose homeostasis: proven concepts and new ideas*. Biochem Soc Trans, 2005. 33(Pt 1): p. 306-10.

27. Brocklehurst, K.J., V.A. Payne, R.A. Davies, D. Carroll, H.L. Vertigan, H.J. Wightman, S. Aiston, I.D. Waddell, B. Leighton, M.P. Coghlan, and L. Agius, *Stimulation of hepatocyte glucose metabolism by novel small molecule glucokinase activators*. *Diabetes*, 2004. 53(3): p. 535-41.
28. Grimsby, J., R. Sarabu, W.L. Corbett, N.E. Haynes, F.T. Bizzarro, J.W. Coffey, K.R. Guertin, D.W. Hilliard, R.F. Kester, P.E. Mahaney, L. Marcus, L. Qi, C.L. Spence, J. Teng, M.A. Magnuson, C.A. Chu, M.T. Dvoroziak, F.M. Matschinsky, and J.F. Grippo, *Allosteric activators of glucokinase: potential role in diabetes therapy*. *Science*, 2003. 301(5631): p. 370-3.
29. Dunten P, S.A., Kammlott U, Crowther R, Lukacs CM, Levin W, Reik L, Grimsby J, Corbett WL, Magnuson MA, Matschinsky FM, Grippo JF, *Crystal Structure of Human Liver Glucokinase Bound to a Small Molecule Allosteric Activator*. *Frontiers in Diabetes*, 2004. 16: p. 145-154.
30. McKerrecher, D., J.V. Allen, S.S. Bowker, S. Boyd, P.W. Caulkett, G.S. Currie, C.D. Davies, M.L. Fenwick, H. Gaskin, E. Grange, R.B. Hargreaves, B.R. Hayter, R. James, K.M. Johnson, C. Johnstone, C.D. Jones, S. Lackie, J.W. Rayner, and R.P. Walker, *Discovery, synthesis and biological evaluation of novel glucokinase activators*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005. 15(8): p. 2103-6.
31. Coope, G.J., A.M. Atkinson, C. Allott, D. McKerrecher, C. Johnstone, K.G. Pike, P.C. Holme, H. Vertigan, D. Gill, M.P. Coghlan, and B. Leighton, *Predictive blood glucose lowering efficacy by Glucokinase activators in high fat fed female Zucker rats*. *Br J Pharmacol*, 2006. 149(3): p. 328-35.
32. Futamura, M., H. Hosaka, A. Kadotani, H. Shimazaki, K. Sasaki, S. Ohyama, T. Nishimura, J. Eiki, and Y. Nagata, *An allosteric activator of glucokinase impairs the interaction of glucokinase and glucokinase regulatory protein and regulates glucose metabolism*. *J Biol Chem*, 2006. 281(49): p. 37668-74.
33. Agius, L., *Physiological control of liver glycogen metabolism: lessons from novel glycogen phosphorylase inhibitors*. *Mini Rev Med Chem*, 2010. 10(12): p. 1175-87.
34. Fischer, E.H., *Protein phosphorylation and cellular regulation II*. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, 1993. 32: p. 1130-1137.
35. Krebs, E.G., *Protein phosphorylation and cellular regulation I*. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, 1993. 32: p. 1130-1137.
36. Davis, C.H., L.H. Schliselfeld, D.P. Wolf, C.A. Lesvitt, and E.G. Krebs, *Interrelationships among glycogen phosphorylase gene family in the rat*. *Genome*, 1988. 30: p. 582-590.
37. Crerar, M.M., J.W. Hudson, K.E. Matthews, E.S. David, and G.B. Golding, *Studies on the expression and evolution of the glycogen phosphorylase gene family in the rat*. *Genome*, 1988. 30(4): p. 582-90.
38. Newgard, C.B., P.K. Hwang, and R.J. Fletterick, *The family of glycogen phosphorylases: structure and function*. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1989. 24(1): p. 69-99.
39. Fletterick, R.J. and S.R. Sprang, *Glycogen-Phosphorylase Structures and Function*. *Accounts of Chemical Research*, 1982. 15(11): p. 361-369.
40. Oikonomakos, N.G., M. Kosmopoulou, S.E. Zographos, D.D. Leonidas, E.D. Chrysina, L. Somsak, V. Nagy, J.P. Praly, T. Docsa, B. Toth, and P. Gergely, *Binding of N-acetyl-N '-beta-D-glucopyranosyl urea and N-benzoyl-N '-beta-D-*

- glucopyranosyl urea to glycogen phosphorylase b: kinetic and crystallographic studies*. Eur J Biochem, 2002. 269(6): p. 1684-96.
41. Oikonomakos, N.G., V.T. Skamnaki, K.E. Tsitsanou, N.G. Gavalas, and L.N. Johnson, *A new allosteric site in glycogen phosphorylase b as a target for drug interactions*. Structure, 2000. 8(6): p. 575-84.
 42. Oikonomakos, N.G., *Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy*. Curr Protein Pept Sci, 2002. 3(6): p. 561-86.
 43. Rath, V.L., M. Ammirati, D.E. Danley, J.L. Ekstrom, E.M. Gibbs, T.R. Hynes, A.M. Mathiowetz, R.K. McPherson, T.V. Olson, J.L. Treadway, and D.J. Hoover, *Human liver glycogen phosphorylase inhibitors bind at a new allosteric site*. Chem Biol, 2000. 7(9): p. 677-82.
 44. Barford, D., S.H. Hu, and L.N. Johnson, *Structural mechanism for glycogen phosphorylase control by phosphorylation and AMP*. J Mol Biol, 1991. 218(1): p. 233-60.
 45. Bot, G. and P. Gergely, *Formation of tetramer phosphorylase A in vivo*. FEBS Lett, 1972. 24(1): p. 7-10.
 46. Huang, C.Y. and D.J. Graves, *Correlation between subunit interactions and enzymatic activity of phosphorylase a. Method for determining equilibrium constants from initial rate measurements*. Biochemistry, 1970. 9(3): p. 660-71.
 47. Bot, G., E. Kovacs, and P. Gergely, *Role of tetramer in equilibrium dimer equilibrium in the dephosphorylation and activity of phosphorylase a*. Acta Biochim Biophys Acad Sci Hung, 1977. 12(4): p. 335-41.
 48. Bot, G., E.F. Kovacs, and P. Gergely, *Partial phosphorylation of muscle phosphorylase. I. Formation of a hybrid phosphorylase in vitro*. Biochim Biophys Acta, 1974. 370(1): p. 70-7.
 49. Gergely, P., G. Bot, and E.F. Kovacs, *Partial phosphorylation of muscle phosphorylase. II. Formation of a hybrid phosphorylase in vivo*. Biochim Biophys Acta, 1974. 370(1): p. 78-84.
 50. Ros, S., M. Garcia-Rocha, J. Dominguez, J.C. Ferrer, and J.J. Guinovart, *Control of liver glycogen synthase activity and intracellular distribution by phosphorylation*. J Biol Chem, 2009. 284(10): p. 6370-8.
 51. Ferrer, J.C., C. Favre, R.R. Gomis, J.M. Fernandez-Novell, M. Garcia-Rocha, N. de la Iglesia, E. Cid, and J.J. Guinovart, *Control of glycogen deposition*. FEBS Lett, 2003. 546(1): p. 127-32.
 52. Roach, P.J., *Control of glycogen synthase by hierarchal protein phosphorylation*. FASEB J, 1990. 4(12): p. 2961-8.
 53. Gergely, P., B. Toth, I. Farkas, and G. Bot, *Effect of fructose 1-phosphate on the activation of liver glycogen synthase*. Biochem J, 1985. 232(1): p. 133-7.
 54. Doherty, M.J., G. Moorhead, N. Morrice, P. Cohen, and P.T. Cohen, *Amino acid sequence and expression of the hepatic glycogen-binding (GL)-subunit of protein phosphatase-1*. FEBS Lett, 1995. 375(3): p. 294-8.
 55. Nimmo, H.G., C.G. Proud, and P. Cohen, *The phosphorylation of rabbit skeletal muscle glycogen synthase by glycogen synthase kinase-2 and adenosine-3':5'-monophosphate-dependent protein kinase*. Eur J Biochem, 1976. 68(1): p. 31-44.

56. Williamson, J.R., C.A. Hansen, A. Verhoeven, K.E. Coll, R. Johanson, M.T. Williamson, and C. Filburn, *Mechanisms involved in receptor-mediated changes of intracellular Ca²⁺ in liver*. Soc Gen Physiol Ser, 1987. 42: p. 93-116.
57. Dent, P., A. Lavoinne, S. Nakielnny, F.B. Caudwell, P. Watt, and P. Cohen, *The molecular mechanism by which insulin stimulates glycogen synthesis in mammalian skeletal muscle*. Nature, 1990. 348(6299): p. 302-8.
58. Browne, G.J., M. Delibegovic, S. Keppens, W. Stalmans, and P.T. Cohen, *The level of the glycogen targeting regulatory subunit R5 of protein phosphatase 1 is decreased in the livers of insulin-dependent diabetic rats and starved rats*. Biochem J, 2001. 360(Pt 2): p. 449-59.
59. Stalmans, W., H. de Wulf, and H.G. Hers, *The control of liver glycogen synthetase phosphatase by phosphorylase*. Eur J Biochem, 1971. 18(4): p. 582-7.
60. Docsa, T., K. Czifrak, C. Huse, L. Somsak, and P. Gergely, *Effect of glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin on glycogen metabolism in liver tissues of streptozotocin-induced and obese diabetic rats*. Mol Med Report, 2011. 4(3): p. 477-81.
61. Alemany, S. and P. Cohen, *Phosphorylase a is an allosteric inhibitor of the glycogen and microsomal forms of rat hepatic protein phosphatase-1*. FEBS Lett, 1986. 198(2): p. 194-202.
62. Oikonomakos, N.G., M. Kontou, S.E. Zographos, H.S. Tsitoura, L.N. Johnson, K.A. Watson, E.P. Mitchell, G.W. Fleet, J.C. Son, C.J. Bichard, and et al., *The design of potential antidiabetic drugs: experimental investigation of a number of beta-D-glucose analogue inhibitors of glycogen phosphorylase*. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 1994. 19(3): p. 185-92.
63. Watson, K.A., E.P. Mitchell, L.N. Johnson, G. Cruciani, J.C. Son, C.J. Bichard, G.W. Fleet, N.G. Oikonomakos, M. Kontou, and S.E. Zographos, *Glucose analogue inhibitors of glycogen phosphorylase: from crystallographic analysis to drug prediction using GRID force-field and GOLPE variable selection*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1995. 51(Pt 4): p. 458-72.
64. Bichard, C.J.F., E.P. Mitchell, M.R. Wormald, K.A. Watson, L.N. Johnson, S.E. Zographos, D.D. Koutra, N.G. Oikonomakos, and G.W.J. Fleet, *Potent Inhibition of Glycogen-Phosphorylase by a Spirohydantoin of Glucopyranose - First Pyranose Analogs of Hydantocidin*. Tetrahedron Letters, 1995. 36(12): p. 2145-2148.
65. Osz, E., L. Somsak, L. Szilagyi, L. Kovacs, T. Docsa, B. Toth, and P. Gergely, *Efficient inhibition of muscle and liver glycogen phosphorylases by a new glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin*. Bioorg Med Chem Lett, 1999. 9(10): p. 1385-90.
66. Somsak, L., V. Nagy, T. Docsa, B. Toth, and P. Gergely, *Gram-scale synthesis of a glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin and its effect on hepatic glycogen metabolism studied in vitro and in vivo*. Tetrahedron-Asymmetry, 2000. 11(2): p. 405-408.
67. Somsak, L., K. Czifrak, M. Toth, E. Bokor, E.D. Chrysina, K.M. Alexacou, J.M. Hayes, C. Tiraidis, E. Lazoura, D.D. Leonidas, S.E. Zographos, and N.G. Oikonomakos, *New inhibitors of glycogen phosphorylase as potential antidiabetic agents*. Curr Med Chem, 2008. 15(28): p. 2933-83.

68. Oikonomakos, N.G. and L. Somsak, *Advances in glycogen phosphorylase inhibitor design*. Curr Opin Investig Drugs, 2008. 9(4): p. 379-95.
69. Somsak, L., *Glucose derived inhibitors of glycogen phosphorylase*. Comptes Rendus Chimie, 2011. 14(2-3): p. 211-223.
70. Chrysina, E.D., *The prototype of glycogen phosphorylase*. Mini Rev Med Chem, 2010. 10(12): p. 1093-101.
71. Fosgerau, K., N. Westergaard, B. Quistorff, N. Grunnet, M. Kristiansen, and K. Lundgren, *Kinetic and functional characterization of 1,4-dideoxy-1, 4-imino-D-arabinitol: a potent inhibitor of glycogen phosphorylase with anti-hyperglycemic effect in ob/ob mice*. Arch Biochem Biophys, 2000. 380(2): p. 274-84.
72. Andersen, B. and N. Westergaard, *The effect of glucose on the potency of two distinct glycogen phosphorylase inhibitors*. Biochem J, 2002. 367(Pt 2): p. 443-50.
73. Andersen, B., A. Rassov, N. Westergaard, and K. Lundgren, *Inhibition of glycogenolysis in primary rat hepatocytes by 1, 4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol*. Biochem J, 1999. 342 Pt 3: p. 545-50.
74. Jakobsen, P., J.M. Lundbeck, M. Kristiansen, J. Breinholt, H. Demuth, J. Pawlas, M.P. Candela, B. Andersen, N. Westergaard, K. Lundgren, and N. Asano, *Iminosugars: potential inhibitors of liver glycogen phosphorylase*. Bioorg Med Chem, 2001. 9(3): p. 733-44.
75. Bergans, N., W. Stalmans, S. Goldmann, and F. Vanstapel, *Molecular mode of inhibition of glycogenolysis in rat liver by the dihydropyridine derivative, BAY R3401: inhibition and inactivation of glycogen phosphorylase by an activated metabolite*. Diabetes, 2000. 49(9): p. 1419-26.
76. Ogawa, A.K., C.A. Willoughby, R. Bergeron, K.P. Ellsworth, W.M. Geissler, R.W. Myers, J. Yao, G. Harris, and K.T. Chapman, *Glucose-lowering in a db/db mouse model by dihydropyridine diacid glycogen phosphorylase inhibitors*. Bioorg Med Chem Lett, 2003. 13(20): p. 3405-8.
77. Chen, J., J. Liu, L. Zhang, G. Wu, W. Hua, X. Wu, and H. Sun, *Pentacyclic triterpenes. Part 3: Synthesis and biological evaluation of oleanolic acid derivatives as novel inhibitors of glycogen phosphorylase*. Bioorg Med Chem Lett, 2006. 16(11): p. 2915-9.
78. Wen, X., J. Xia, K. Cheng, L. Zhang, P. Zhang, J. Liu, P. Ni, and H. Sun, *Pentacyclic triterpenes. Part 5: synthesis and SAR study of corosolic acid derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylases*. Bioorg Med Chem Lett, 2007. 17(21): p. 5777-82.
79. Furukawa, S., Y. Tsurumi, K. Murakami, T. Nakanishi, K. Ohsumi, M. Hashimoto, M. Nishikawa, S. Takase, O. Nakayama, and M. Hino, *FR258900, a novel glycogen phosphorylase inhibitor isolated from Fungus No. 138354. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities*. J Antibiot (Tokyo), 2005. 58(8): p. 497-502.
80. Kristiansen, M., B. Andersen, L.F. Iversen, and N. Westergaard, *Identification, synthesis, and characterization of new glycogen phosphorylase inhibitors binding to the allosteric AMP site*. J Med Chem, 2004. 47(14): p. 3537-45.
81. Martin, W.H., D.J. Hoover, S.J. Armento, I.A. Stock, R.K. McPherson, D.E. Danley, R.W. Stevenson, E.J. Barrett, and J.L. Treadway, *Discovery of a human*

- liver glycogen phosphorylase inhibitor that lowers blood glucose in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(4): p. 1776-81.
82. Hoover, D.J., S. Lefkowitz-Snow, J.L. Burgess-Henry, W.H. Martin, S.J. Armento, I.A. Stock, R.K. McPherson, P.E. Genereux, E.M. Gibbs, and J.L. Treadway, *Indole-2-carboxamide inhibitors of human liver glycogen phosphorylase*. J Med Chem, 1998. 41(16): p. 2934-8.
 83. Gustafson, L.A., M. Neeft, D.J. Reijngoud, F. Kuipers, H.P. Sauerwein, J.A. Romijn, A.W. Herling, H.J. Burger, and A.J. Meijer, *Fatty acid and amino acid modulation of glucose cycling in isolated rat hepatocytes*. Biochem J, 2001. 358(Pt 3): p. 665-71.
 84. Hampson, L.J. and L. Agius, *Increased potency and efficacy of combined phosphorylase inactivation and glucokinase activation in control of hepatocyte glycogen metabolism*. Diabetes, 2005. 54(3): p. 617-23.
 85. Aiston, S., L. Hampson, A.M. Gomez-Foix, J.J. Guinovart, and L. Agius, *Hepatic glycogen synthesis is highly sensitive to phosphorylase activity: evidence from metabolic control analysis*. J Biol Chem, 2001. 276(26): p. 23858-66.
 86. Arden, C., A.R. Green, L.J. Hampson, S. Aiston, L. Harndahl, C.C. Greenberg, M.J. Brady, S. Freeman, S.M. Poucher, and L. Agius, *Increased sensitivity of glycogen synthesis to phosphorylase- α and impaired expression of the glycogen-targeting protein R6 in hepatocytes from insulin-resistant Zucker fa/fa rats*. FEBS J, 2006. 273(9): p. 1989-99.
 87. Rosauer, K.G., A.K. Ogawa, C.A. Willoughby, K.P. Ellsworth, W.M. Geissler, R.W. Myers, Q. Deng, K.T. Chapman, G. Harris, and D.E. Moller, *Novel 3,4-dihydroquinolin-2(1H)-one inhibitors of human glycogen phosphorylase α* . Bioorg Med Chem Lett, 2003. 13(24): p. 4385-8.
 88. Kasvinsky, P.J., S. Shechosky, and R.J. Fletterick, *Synergistic regulation of phosphorylase α by glucose and caffeine*. J Biol Chem, 1978. 253(24): p. 9102-6.
 89. Oikonomakos, N.G., J.B. Schnier, S.E. Zographos, V.T. Skamnaki, K.E. Tsitsanou, and L.N. Johnson, *Flavopiridol inhibits glycogen phosphorylase by binding at the inhibitor site*. J Biol Chem, 2000. 275(44): p. 34566-73.
 90. Kelland, L.R., *Flavopiridol, the first cyclin-dependent kinase inhibitor to enter the clinic: current status*. Expert Opin Investig Drugs, 2000. 9(12): p. 2903-11.
 91. Ekstrom, J.L., T.A. Pauly, M.D. Carty, W.C. Soeller, J. Culp, D.E. Danley, D.J. Hoover, J.L. Treadway, E.M. Gibbs, R.J. Fletterick, Y.S. Day, D.G. Myszka, and V.L. Rath, *Structure-activity analysis of the purine binding site of human liver glycogen phosphorylase*. Chem Biol, 2002. 9(8): p. 915-24.
 92. Kasvinsky, P.J., N.B. Madsen, R.J. Fletterick, and J. Sygusch, *X-ray crystallographic and kinetic studies of oligosaccharide binding to phosphorylase*. J Biol Chem, 1978. 253(4): p. 1290-6.
 93. Pinotsis, N., D.D. Leonidas, E.D. Chrysina, N.G. Oikonomakos, and I.M. Mavridis, *The binding of beta- and gamma-cyclodextrins to glycogen phosphorylase β : kinetic and crystallographic studies*. Protein Sci, 2003. 12(9): p. 1914-24.
 94. Lin, Y. and Z. Sun, *Current views on type 2 diabetes*. J Endocrinol, 2010. 204(1): p. 1-11.

95. Srinivasan, K. and P. Ramarao, *Animal models in type 2 diabetes research: an overview*. Indian J Med Res, 2007. 125(3): p. 451-72.
96. Ozturk, Y., V.M. Altan, and N. Yildizoglu-Ari, *Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions*. Pharmacol Rev, 1996. 48(1): p. 69-112.
97. Krisman, C.R., *A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine*. Anal Biochem, 1962. 4: p. 17-23.
98. Krebs, E.G. and E.H. Fischer, *Molecular properties and transformations of glycogen phosphorylase in animal tissues*. Adv Enzymol Relat Subj Biochem, 1962. 24: p. 263-90.
99. Cohen, P., *The subunit structure of rabbit-skeletal-muscle phosphorylase kinase, and the molecular basis of its activation reactions*. Eur J Biochem, 1973. 34(1): p. 1-14.
100. Dopere, F., F. Vanstapel, and W. Stalmans, *Glycogen-synthase phosphatase activity in rat liver. Two protein components and their requirement for the activation of different types of substrate*. Eur J Biochem, 1980. 104(1): p. 137-46.
101. Dopere, F. and W. Stalmans, *Release and activation of phosphorylase phosphatase upon rupture of organelles from rat liver*. Biochem Biophys Res Commun, 1982. 104(2): p. 443-50.
102. Gergely, P., B. Toth, V. Dombradi, J. Matko, and G. Bot, *Heterotropic interactions of AMP and glucose binding sites in phosphorylase a are destroyed by limited proteolysis*. Biochem Biophys Res Commun, 1983. 113(3): p. 825-31.
103. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. 72: p. 248-54.
104. Oikonomakos, N.G., A.E. Melpidou, and L.N. Johnson, *Crystallization of pig skeletal phosphorylase b. Purification, physical and catalytic characterization*. Biochim Biophys Acta, 1985. 832(3): p. 248-56.
105. DeFronzo, R.A., J.D. Tobin, and R. Andres, *Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance*. Am J Physiol, 1979. 237(3): p. E214-23.
106. Nemeth, J., T. Gorcs, Z. Helyes, G. Oroszi, T. Kocsy, E. Pinter, and J. Szolcsanyi, *Development of a new sensitive CGRP radioimmunoassay for neuropharmacological research*. Neurobiology (Bp), 1998. 6(4): p. 473-5.
107. Oikonomakos, N.G., V.T. Skamnaki, E. Osz, L. Szilagyi, L. Somsak, T. Docsa, B. Toth, and P. Gergely, *Kinetic and crystallographic studies of glucopyranosylidene spirothiohydantoin binding to glycogen phosphorylase B*. Bioorg Med Chem, 2002. 10(2): p. 261-8.
108. Somsak, L., L. Kovacs, M. Toth, E. Osz, L. Szilagyi, Z. Gyorgydeak, Z. Dinya, T. Docsa, B. Toth, and P. Gergely, *Synthesis of and a comparative study on the inhibition of muscle and liver glycogen phosphorylases by epimeric pairs of d-gluco- and d-xylopyranosylidene-spiro-(thio)hydantoins and N-(d-glucopyranosyl) amides*. J Med Chem, 2001. 44(17): p. 2843-8.
109. Anagnostou, E., M.N. Kosmopoulou, E.D. Chrysina, D.D. Leonidas, T. Hadjiloi, C. Tiraidis, S.E. Zographos, Z. Gyorgydeak, L. Somsak, T. Docsa, P. Gergely, F.N. Kolisis, and N.G. Oikonomakos, *Crystallographic studies on two bioisosteric analogues, N-acetyl-beta-D-glucopyranosylamine and N-*

- trifluoroacetyl-beta-D-glucopyranosylamine, potent inhibitors of muscle glycogen phosphorylase*. Bioorg Med Chem, 2006. 14(1): p. 181-9.
110. Czifrak, K., Z. Hadady, T. Docsa, P. Gergely, J. Schmidt, L. Wessjohann, and L. Somsak, *Synthesis of N-(beta-D-glucopyranosyl) monoamides of dicarboxylic acids as potential inhibitors of glycogen phosphorylase*. Carbohydr Res, 2006. 341(8): p. 947-56.
 111. Gyorgydeak, Z., Z. Hadady, N. Felfoldi, A. Krakomperger, V. Nagy, M. Toth, A. Brunyanszki, T. Docsa, P. Gergely, and L. Somsak, *Synthesis of N-(beta-D-glucopyranosyl)- and N-(2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranosyl) amides as inhibitors of glycogen phosphorylase*. Bioorg Med Chem, 2004. 12(18): p. 4861-70.
 112. Henke, B.R. and S.M. Sparks, *Glycogen phosphorylase inhibitors*. Mini Rev Med Chem, 2006. 6(8): p. 845-57.
 113. Somsak, L., V. Nagy, Z. Hadady, T. Docsa, and P. Gergely, *Glucose analog inhibitors of glycogen phosphorylases as potential antidiabetic agents: Recent developments*. Current Pharmaceutical Design, 2003. 9(15): p. 1177-1189.
 114. Johnson, L.N., J. Hajdu, K.R. Acharya, D.I. Stuart, P.J. McLaughlin, N.G. Oikonomakos, and D. Barford, *Glycogen phosphorylase b*. CRC Press, Boca Raton, FL., 1989. In *Allosteric Enzymes*(Herve, G., ed.): p. 81-127.
 115. Barford, D. and L.N. Johnson, *The allosteric transition of glycogen phosphorylase*. Nature, 1989. 340(6235): p. 609-16.
 116. Oikonomakos, N.G., K.R. Acharya, and L.N. Johnson, *Rabbit muscle glycogen phosphorylase b: structural basis of activation and atalysis*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA., 1992. In *Post-Translational Modification of Proteins*(Harding, J.J. & Crabbe, M.J.C., eds): p. 81-151.
 117. Board, M., M. Hadwen, and L.N. Johnson, *Effects of novel analogues of D-glucose on glycogen phosphorylase activities in crude extracts of liver and skeletal muscle*. Eur J Biochem, 1995. 228(3): p. 753-61.
 118. Oikonomakos, N.G., M. Kontou, S.E. Zographos, K.A. Watson, L.N. Johnson, C.J. Bichard, G.W. Fleet, and K.R. Acharya, *N-acetyl-beta-D-glucopyranosylamine: a potent T-state inhibitor of glycogen phosphorylase. A comparison with alpha-D-glucose*. Protein Sci, 1995. 4(12): p. 2469-77.
 119. Bollen, M., S. Keppens, and W. Stalmans, *Specific features of glycogen metabolism in the liver*. Biochem J, 1998. 336 (Pt 1): p. 19-31.
 120. Rerup, C.C., *Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells*. Pharmacol Rev, 1970. 22(4): p. 485-518.
 121. Rao, P.V., S. Pugazhenth, and R.L. Khandelwal, *The Effects of Streptozotocin-Induced Diabetes and Insulin Supplementation on Expression of the Glycogen-Phosphorylase Gene in Rat-Liver*. Journal of Biological Chemistry, 1995. 270(42): p. 24955-24960.
 122. Burcelin, R., M. Eddouks, J. Maury, J. Kande, R. Assan, and J. Girard, *Excessive glucose production, rather than insulin resistance, accounts for hyperglycaemia in recent-onset streptozotocin-diabetic rats*. Diabetologia, 1995. 38(3): p. 283-90.
 123. Gad, M.Z., N.A. Ehssan, M.H. Ghiet, and L.F. Wahman, *Pioglitazone versus metformin in two rat models of glucose intolerance and diabetes*. Pak J Pharm Sci, 2010. 23(3): p. 305-12.

8. TÁRGYSZAVAK

diabetes mellitusz
glikogén foszforiláz
glikogén szintetáz
glikogén metabolizmus
glikogén foszforiláz inhibitorok
glükopiranozilidén-spiro-tiohidantoin
sztreptozotocin indukált diabetes
inzulinrezisztencia

KEYWORDS

diabetes mellitus
glycogen phosphorylase
glycogen synthase
glycogen metabolism
glycogen phosphorylase inhibitors
glucopiranosilidene-spiro-thiohydantoin
streptozotocin-induced diabetes
insulin resistance

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni mindazoknak, akik segítségemre voltak az egyetemi doktori értekezést megalapozó munkák elvégzésében, szakmai és baráti tanácsaikra mindig számíthattam.

Köszönettel tartozom **Dr. Gergely Pál** professzor Úrnak a támogatásért szakmai feladataimban, tudományos munkámban; mint témavezető a tudományos munkában szerzett kimagasló tudását nagylelkűen megosztotta velem.

Köszönetemet fejezem ki **Dr. Somsák László** professzor Úrnak és munkatársainak (Szerves Kémia Tanszék) a szintetizált vegyületekért. Külön is köszönöm Somsák László professzor Úrnak a folyamatos támogatást és értékes segítséget az eredmények diszkussziójában.

Hálás köszönet **Nikos G. Oikonomakos** professzor Úrnak – aki sajnos már nincs közöttünk – és munkatársainak (The National Hellenic Research Foundation, Athén) a röntgenkrisztallográfiás vizsgálatokért és azok számítógépes elemzéséért.

Külön köszönet **Dembrowszkiné Kovács Ellának** akire mindig számíthattam ha dolgozni kellett.

Hálásan köszönöm **Dr. Tóth Béla** egyetemi docens Úrnak a munkám kezdeti szakaszában nyújtott önzetlen segítségéért.

Köszönettel tartozok az Orvosi Vegytani Intézet minden dolgozójának, hogy amikor segítségemre volt szükségem mindenki önzetlenül segített.

Végezetül köszönöm családom támogatását, bátorítását, ami nélkül nem készülhetett volna el ez a munka.

10. FÜGGELÉK



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK /306/2011.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

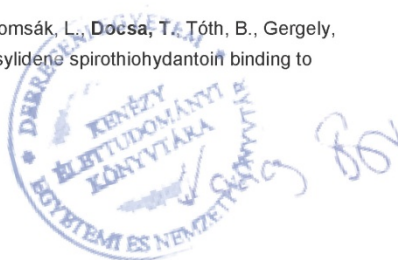
Jelölt: Docsa Tibor

Neptun kód: FI17ZV

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Docsa, T.**, Czifrák, K., Hüse, C., Somsák, L., Gergely, P.: Effect of glucopyranosylidene-spirothiohydantoin on glycogen metabolism in liver tissues of streptozotocin-induced and obese diabetic rats.
Mol. Med. Rep. 4 (3), 477-481, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2011.464>
IF:0.307 (2010)
2. Somsák, L., Nagy, V., Hadady, Z., Felföldi, N., **Docsa, T.**, Gergely, P.: Recent developments in the synthesis and evaluation of glucose analog inhibitors of glycogen phosphorylase as potential antidiabetic agents.
In: *Frontiers in Medicinal Chemistry - Online*. Ed.: Allen B. Reitz, Atta-ur-Rahman, Bentham Science Publisher, Netherlands, 253-272, 2005.
3. Somsák, L., Nagy, V., Hadady, Z., **Docsa, T.**, Gergely, P.: Glucose analog inhibitors of glycogen phosphorylases as potential antidiabetic agents: Recent developments.
Curr. Pharm. Des. 9 (15), 1177-1189, 2003.
IF:5.55
4. Oikonomakos, N.G., Skamnaki, V.T., Ősz, E., Szilágyi, L., Somsák, L., **Docsa, T.**, Tóth, B., Gergely, P.: Kinetic and crystallographic studies of glucopyranosylidene spirothiohydantoin binding to glycogen phosphorylase B.
Bioorg. Med. Chem. 10 (2), 261-268, 2002.
IF:2.043

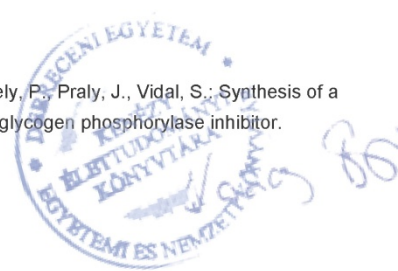


5. Oikonomakos, N.G., Kosmopoulou, M.N., Zographos, S.E., Leonidas, D.D., Chrysina, E.D., Somsák, L., Nagy, V., Praly, J., **Docsa, T.**, Tóth, B., Gergely, P.: Binding of N-acetyl-N'- β -D-glucopyranosyl urea and N-benzoyl-N'- β -D-glucopyranosyl urea to glycogen phosphorylase b: Kinetic and crystallographic studies.
Eur. J. Biochem. 269 (6), 1684-1696, 2002.
IF:2.999
6. **Docsa, T.**, Tóth, B., Somsák, L., Gergely, P.: Effect of glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin on the enzymes of hepatic glycogen metabolism in rats.
In: Protein Modules in Cellular Signalling. Ed.: by Ludwig Heilmeyer, Peter Friedrich, IOS Press, Amsterdam, 142-149, 2001.
7. Ősz, E., Somsák, L., Szilágyi, L., Kovács, L., **Docsa, T.**, Tóth, B., Gergely, P.: Efficient inhibition of muscle and liver glycogen phosphorylases by a new glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin.
Bioorg. Med. Chem. Lett. 9 (10), 1385-1390, 1999.
IF:1.759

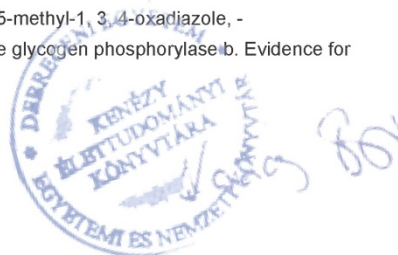
További Közlemények

8. Kun, S., Nagy, G.Z., Tóth, M., Czece, L., Van Nhlen, A.N., **Docsa, T.**, Gergely, P., Charavgi, M., Skourti, P.V., Chrysina, E.D., Patonay, T., Somsák, L.: Synthesis of variously coupled conjugates of d-glucose, 1,3,4-oxadiazole, and 1,2,3-triazole for inhibition of glycogen phosphorylase.
Carbohydr. Res. 346 (12), 1427-1438, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2011.03.004>
IF:1.898 (2010)
9. Bokor, É., **Docsa, T.**, Gergely, P., Somsák, L.: Synthesis of 1-(D-glucopyranosyl)-1,2,3-triazoles and their evaluation as glycogen phosphorylase inhibitors.
Bioorg. Med. Chem. 18 (3), 1171-1180, 2010.
IF:2.978
10. Cheng, K., Liu, J., Sun, H., Bokor, É., Czifrák, K., Kónya, B., Tóth, M., **Docsa, T.**, Gergely, P., Somsák, L.: Tethered derivatives of D-glucose and pentacyclic triterpenes for homo/heterobivalent inhibition of glycogen phosphorylase.
New J. Chem. 34, 1450-1464, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/b9nj00602h>
IF:2.631

11. Czakó, Z., **Docsa, T.**, Gergely, P., Juhász, L., Antus, S.: Synthesis and glycogen phosphorylase inhibitor activity of functionalized 1,4-benzodioxanes.
Pharmazie. 65 (4), 235 - 238, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1691/ph.2010.9706>
IF:0.869
12. Cecioni, S., Argintaru, O., **Docsa, T.**, Gergely, P., Praly, J., Vidal, S.: Probing multivalency for the inhibition of an enzyme: Glycogen phosphorylase as a case study.
New J. Chem. 33 (1), 148-156, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/b812540f>
IF:3.006
13. Czakó, Z., Juhász, L., Kenéz, Á., Czifrák, K., Somsák, L., **Docsa, T.**, Gergely, P., Antus, S.: Synthesis and glycogen phosphorylase inhibitory activity of N-(beta-D-glucopyranosyl)amides possessing 1,4-benzodioxane moiety.
Bioorg. Med. Chem. 17 (18), 6738-6741, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2009.07.052>
IF:2.822
14. Nagy, V., Bentlifa, M., Vidal, S., Berzsényi, E., Teilhet, C., Czifrák, K., Batta, G., **Docsa, T.**, Gergely, P., Somsák, L., Praly, J.: Glucose-based spiro-heterocycles as potent inhibitors of glycogen phosphorylase.
Bioorg. Med. Chem. 17 (15), 5696-5707, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2009.05.080>
IF:2.822
15. Tóth, M., Kun, S., Bokor, É., Bentlifa, M., Tallec, G., Vidal, S., **Docsa, T.**, Gergely, P., Somsák, L., Praly, J.: Synthesis and structure-activity relationships of C-glycosylated oxadiazoles as inhibitors of glycogen phosphorylase.
Bioorg. Med. Chem. 17 (13), 4773-4785, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2009.04.036>
IF:2.822
16. Bertus, P., Szymoniak, J., Jeanneau, E., **Docsa, T.**, Gergely, P., Praly, J., Vidal, S.: Synthesis of a C-glucosylated cyclopropylamide and evaluation as a glycogen phosphorylase inhibitor.
Bioorg. Med. Chem. Lett. 18 (17), 4774-4778, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.07.098>
IF:3.075



17. Juhász, L., **Docsa, T.**, Brunyánszki, A., Gergely, P., Antus, S.: Synthesis and glycogen phosphorylase inhibitor activity of 2,3-dihydrobenzo[1,4]dioxin derivatives.
Bioorg. Med. Chem. 15 (12), 4048-4056, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2007.03.084>
IF:2.662
18. Anagnostou, E., Kosmopoulou, M.N., Chrysina, E.D., Leonidas, D.D., Hadjiioi, T., Tiraidis, C., Zographos, S.E., Györgydeák, Z., Somsák, L., **Docsa, T.**, Gergely, P., Kolisis, F.N., Oikonomakos, G.N.: Crystallographic studies on two bioisosteric analogues, N-acetyl-beta-D-glucopyranosylamine and N-trifluoroacetyl-beta-D-glucopyranosylamine, potent inhibitors of muscle glycogen phosphorylase.
Bioorg. Med. Chem. 14 (1), 181-189, 2006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2005.08.010>
IF:2.624
19. Benlifa, M., Vidal, S., Fenet, B., Msaddek, M., Goekjian, P.G., Praly, J., Brunyánszki, A., **Docsa, T.**, Gergely, P.: In search of glycogen phosphorylase inhibitors: 5-substituted 3-C-glucopyranosyl-1,2,4-oxadiazoles from beta-D-glucopyranosyl cyanides upon cyclization of O-acylamidoxime intermediates.
European J. Org. Chem. 2006 (18), 4242-4256, 2006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ejoc.200600073>
IF:2.769
20. Czifrák, K., Hadady, Z., **Docsa, T.**, Gergely, P., Schmidt, J., Wessjohann, L.A., Somsák, L.: Synthesis of N-(beta-D-glucopyranosyl) monoamides of dicarboxylic acids as potential inhibitors of glycogen phosphorylase.
Carbohydr. Res. 341 (8), 947-956, 2006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2006.03.002>
IF:1.703
21. Chrysina, E.D., Kosmopoulou, M.N., Tiraidis, C., Kardakaris, R., Bischler, N., Leonidas, D.D., Hadady, Z., Somsák, L., **Docsa, T.**, Gergely, P., Oikonomakos, N.G.: Kinetic and crystallographic studies on 2-(beta-D-glucopyranosyl)-5-methyl-1,3,4-oxadiazole, -benzothiazole, and -benzimidazole, inhibitors of muscle glycogen phosphorylase b. Evidence for a new binding site.
Protein Sci. 14 (4), 873-888, 2005.
IF:3.618



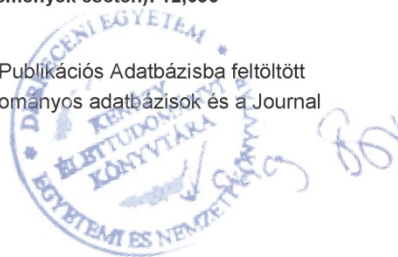
22. Györgydeák, Z., Hadady, Z., Felföldi, N., Krakomperger, A., Nagy, V., Tóth, M., Brunyánszki, A., **Docsa, T.**, Gergely, P., Somsák, L.: Synthesis of N-(beta-D-glucopyranosyl)- and N-(2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranosyl) amides as inhibitors of glycogen phosphorylase. *Bioorg. Med. Chem.* 12 (18), 4861-4870, 2004.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2004.07.013>
IF:2.018
23. Chrysina, E.D., Oikonomakos, N.G., Zographos, S.E., Kosmopoulou, M.N., Bischler, N., Leonidas, D.D., Kovács, L., **Docsa, T.**, Gergely, P., Somsák, L.: Crystallographic studies on α - and β -D-glucopyranosyl formamide analogues, inhibitors of glycogen phosphorylase. *Biocatal. Biotransform.* 21 (4-5), 233-242, 2003.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/10242420310001614360>
IF:1.085
24. Somsák, L., Kovács, L., Tóth, M., Ősz, E., Szilágyi, L., Györgydeák, Z., Dinya, Z., **Docsa, T.**, Tóth, B., Gergely, P.: Synthesis of and a comparative study on the inhibition of muscle and liver glycogen phosphorylases by epimeric pairs of D-Gluco- and D-Xylopyranosylidene-spiro-(thio)hydantoin and N-(D-Glucopyranosyl) amides. *J. Med. Chem.* 44 (17), 2843-2848, 2001.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jm010892t>
IF:4.139
25. Somsák, L., Nagy, V., **Docsa, T.**, Tóth, B., Gergely, P.: Gram-scale synthesis of a glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin and its effect on hepatic glycogen metabolism studied in vitro and in vivo. *Tetrahedron Asymmetry.* 11, 405-408, 2000.
IF:2.797

Összesített impakt faktor: 58,996

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 12,658

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2011.12.01



11. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Effect of glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin on glycogen metabolism in liver tissues of streptozotocin-induced and obese diabetic rats

TIBOR DOCSA¹, KATALIN CZIFRÁK², CSABA HÜSE², LÁSZLÓ SOMSAK² and PÁL GERGELY¹

¹Cell Biology and Signalling Research Group of the Hungarian Academy of Sciences,

Department of Medical Chemistry, Research Centre for Molecular Medicine;

²Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, University of Debrecen, H-4032 Debrecen, Hungary

Received December 9, 2010; Accepted March 21, 2011

DOI: 10.3892/mmr.2011.464

Abstract. The major role of liver glycogen is to supply glucose to the circulation in order to maintain normal blood glucose levels. In the muscle and liver, the accumulation and breakdown of glycogen are regulated by the reciprocal activities of glycogen phosphorylase and glycogen synthase. Glycogen phosphorylase catalyses the key step of glycogen degradation and its activity is inhibited by glucose and its analogues. Thus, any readily accessible inhibitor of glycogen phosphorylase may serve as a potential therapy for non-insulin-dependent or type 2 diabetes. Hepatic glycogen phosphorylase has been identified as a novel target for drugs that control blood glucose concentration. Glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin (TH) was found to be one of the most potent glucose derivatives, inhibiting the catalytic activity of both muscle and liver glycogen phosphorylase. Here, we demonstrated the co-ordinated regulation of glycogen phosphorylase and synthase by 50 μ M TH in liver extracts of Wistar rats, resulting in the activation of synthase by a shortening of the latency compared to control animals. TH was also effective in lowering blood glucose levels and restoring hepatic glycogen content in streptozotocin-induced diabetic rats. Furthermore, intravenous administration of TH to Zucker diabetic fatty rats significantly decreased hepatic glycogen phosphorylase *a* levels, and the activation of synthase was initiated without any delay.

Introduction

Type 2 diabetes (non-insulin-dependent diabetes mellitus) is a major public health problem with severe complications, such

as cardiovascular disease, neuropathy, retinopathy and nephropathy. Type 2 diabetes comprises approximately 90-95% of all diabetes cases (1). Diabetes affects approximately 6-20% of the adult population in Western industrialized societies (2) and is a major public health threat, reaching epidemic rates (2,3). The disease is polygenic and is characterized by hyperglycemia, defects in insulin secretion and insulin resistance, in which the tissues fail to respond to this hormone (4). Additionally, the rate of endogenous glucose production is elevated in type 2 diabetes (5).

The liver accounts for 90% of the body's endogenous glucose production and is tightly controlled by insulin and glucagon. In type 2 diabetes, hepatic insulin resistance with elevated amounts of glucagon results in high levels of glucose, which in turn contributes to the observed hyperglycemia (6). Hepatic glucose is produced via two pathways: glycogenolysis (breakdown of glycogen) and gluconeogenesis (*de novo* synthesis of glucose). Studies estimate the glycogenolytic contribution of total hepatic glucose production to be up to 75% in both healthy controls (7) and patients with type 2 diabetes (8). Furthermore, a substantial portion of glucose formed by gluconeogenesis is cycled through the glycogen pool prior to efflux from the liver cells (9). The inhibition of either glycogenolysis or gluconeogenesis appears to be an attractive approach to developing antihyperglycemic molecules. Glycogen phosphorylase (GP), which catalyzes the first reaction in the degradation of glycogen, is considered a potential target for type 2 diabetes, generating selective ligands of GP that modulate the activity of this protein (10-15).

The accumulation and breakdown of glycogen are regulated by the reciprocal activities of glycogen synthase (GS) and GP. Only the phosphorylated GP_a has significant activity, suggesting an important role for glycogenolysis in hepatic glucose production. Therefore, the inhibition of hepatic GP might suppress glucose production arising from glycogenolysis and gluconeogenesis (16,17). It is known that the activity of liver GS is also controlled by reversible phosphorylation of multiple serine residues. The dephosphorylated form of GS is the catalytically active (GS_a) form. Phosphorylation is associated with the inactivation of GS: conversion to the *b* form. The dephosphorylation of GP and GS is interrelated and is cata-

Correspondence to: Dr Pál Gergely, Department of Medical Chemistry, Medical and Health Science Centre, University of Debrecen, Egyetem tér 1, H-4032 Debrecen, Hungary
E-mail: gpal@dote.hu

Key words: Zucker diabetic fatty rat, glycogen phosphorylase, glycogen synthase, glucose analogue inhibitors

lyzed by the glycogen-associated protein phosphatase-1. GP α , but not GP β , is a potent inhibitor of the phosphatase action on GS, and it is only when GP α has been dephosphorylated that the phosphatase is free to activate GS, the rate limiting enzyme of glycogen synthesis (2,18,19).

Rodents are commonly used for diabetic studies. Streptozotocin, a monofunctional nitrosourea derivative, is one of the most frequently applied substances to induce diabetes in experimental animals (20). Genetic models of insulin resistance and hyperglycemia are also available, including Zucker diabetic fatty (ZDF) rats. These rats have a mutation in the leptin receptor and a defect in the pancreatic β cells that affect insulin production (21).

There are several binding sites in GP that lend themselves to targeting by various effectors. Many glucose derivatives were shown to bind to the catalytic centre of GP (13,22), and among them glucopyranosylidene-spiro-hydantoin with a K_i of 3–4 μ M was one of the most efficient inhibitors (23). More recent efforts resulted in the synthesis of a thio-analogue of the molecule with a very similar K_i value (24–26). In the present study, we report the effect of D-glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin (TH) on glycogen metabolism in the liver tissues of streptozotocin-induced and obese diabetic rats.

Materials and methods

Materials. TH was prepared from D-glucose in a six-step highly chemo-, regio- and stereoselective procedure (24–26). [γ - ^{32} P]ATP (specific activity of 15 TBq/mmol) was obtained from Izinta (Budapest, Hungary), and UDP-[^{14} C]-glucose was purchased from American Radiolabeled Chemicals (St. Louis, MO, USA). Sephadex G-25 columns (1.5x5 cm) were supplied by Pharmacia (Uppsala, Sweden) and ET 31 filter paper by Whatman (Clifton, NJ, USA). Other reagents of analytical grade from various suppliers were used for the preparation of buffers.

Animals. Male Wistar rats weighing ~250 g were obtained from Charles River Magyarorszá Kft. (Budapest, Hungary). Diabetes was induced by a simple intravenous injection of a freshly prepared solution of streptozotocin (60 mg/kg body weight) dissolved in 50 mM sodium citrate (pH 4.5) plus 150 mM NaCl. Control rats were injected with citrate buffer alone. Diabetes was assessed periodically by a test for glucosuria (Macherey-Nagel, Düren, Germany). One week after diabetes induction, the animals were determined to be diabetic if urine glucose levels exceeded 3 mg/ml. The diabetic animals were randomly divided into two groups: control diabetic and TH-treated diabetic. The control and the streptozotocin-injected group were subcutaneously administered 0.9% NaCl (2 ml/kg body weight) and the TH-treated streptozotocin-injected group was subcutaneously administered 50 μ M TH solution (100 μ mol/kg body weight). TH was freshly dissolved in 0.9% NaCl solution (50 μ mol/ml). The treatments were performed 10 times between 8 and 9 a.m. every second day. Rats were anesthetized on the second day after the 10th treatment, the livers were removed by median laparotomy, and the wet liver weight was measured. ZDF/Gmi-fa/fa (ZDF) inbred obese male rats from Genetic Models, Inc. (Indianapolis, IN, USA) were ordered from Charles River Magyarorszá Kft.

All animals were cared for observing standard procedures with permission of the Laboratory Animals Protection Committee (29/2007/DE MÁB).

Gel filtered liver extract. The liver samples were immediately homogenized in a Potter-Elvehjem tube in two-volume ice-cold buffer consisting of 250 mM sucrose and 40 mM Tris-HCl (pH 7.4), and centrifuged at 10,000 x g for 10 min. The resulting post-mitochondrial supernatant was filtered through a Sephadex G-25 column (5x1.5 cm) to remove endogenous effectors, equilibrated in 40 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA and 10 mM mercapto-ethanol (pH 7.4). The filtrates were supplemented with 5 mM (NH $_4$) $_2$ SO $_4$ and 1 mM magnesium acetate in the presence of various effectors and incubated at 30°C. Samples were withdrawn at the indicated times for the assay of GP or GS (27).

Assays. GP activity was assayed in the direction of glycogen synthesis at 30°C with 10 μ g/ml enzyme and 1% glycogen in the absence of AMP (liver GP α) or in the presence of 2 mM AMP (liver GP β) in 50 mM triethanolamine/HCl (pH 6.8) buffer, 100 mM KCl, 1 mM dithiothreitol and 1 mM EDTA. Hepatic GS was assayed according to Dopere *et al* in the absence or presence of 10 mM glucose-6-phosphate (28). One unit of GP or GS converts 1 μ mol substrate into product per min at 30°C. Protein was assayed as described by Bradford (29) and glycogen was measured using the phenol sulphuric acid assay (30). Glucose was determined by an enzymatic assay (Reanal, Hungary).

Results

Effect of TH on hepatic glycogen metabolism. It is known that glucose and glucose analogues cause a sequential inactivation (dephosphorylation) of liver GP α and activation (dephosphorylation) of GS β (31). The coordinated regulation of GP and GS was tested in gel-filtered rat liver extract. Fig. 1 illustrates the effect of 20 mM glucose and 50 μ M TH on the dephosphorylation of GP α in gel-filtered rat liver extract catalysed by phosphorylase phosphatase. Both ligands enhanced the dephosphorylation (inactivation) of hepatic GP α ; however, TH applied at a much lower concentration appeared to be more effective. Fig. 1 also illustrates the effect of either glucose or TH on the dephosphorylation (activation) of GS in gel-filtered rat liver extract. TH significantly increased the active form of GS in the liver by decreasing the latency in the dephosphorylation of GS.

Effect of TH on hepatic glycogen metabolism of streptozotocin-induced rats. Streptozotocin is widely utilized to induce type 1 diabetes in rats with concomitant insulin deficiency (32), which is considered to be one of the animal models of human diabetes mellitus. One week after the injection of streptozotocin, the average blood glucose levels were >30 mmol/l in the diabetic group, and remained at this level during the experimental period of 4 weeks (Fig. 2A). Hepatic glycogen content dramatically decreased in the diabetic animals from 24 to 2 mg/g in the liver. Diabetic animals treated with 100 μ mol/kg body weight of TH exhibited significantly lower serum glucose levels, and the hepatic glycogen was also restored.

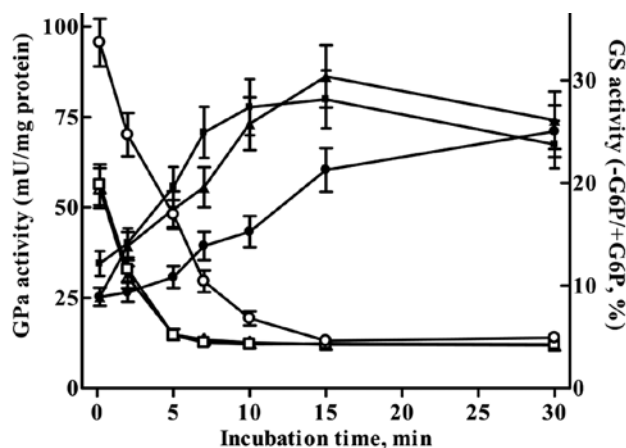


Figure 1. Effect of TH on the dephosphorylation of GP α and GS β in gel-filtered liver extract of male Wistar rats. Post-mitochondrial supernatants were prepared and filtered through a Sephadex G-25 column, as described in Materials and methods. The filtrates were supplemented with 5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and 1 mM magnesium acetate ($\circ, \bullet$) in the presence of 20 mM glucose ($\square, \blacksquare$) or 50 μM TH ($\triangle, \blacktriangle$), and incubated at 30°C. Samples were withdrawn at the indicated times for the assay of GP α or GS. The results are the mean $\pm$ SD of four independent experiments.

The co-ordinated control of GP and GS in gel-filtered liver extracts in the three experimental groups is depicted in Fig. 2B. The diabetic group showed higher GP α activity compared to the control animals, while GS activity was markedly suppressed in the streptozotocin-treated rats. TH-treated diabetic rats had the lowest GP α activity; however, GS activity was rather high, supporting the fact that glycogen concentration was elevated in the liver of this group.

Effect of TH on hepatic glycogen metabolism of Zucker diabetic fatty rats. The ZDF rat develops overt diabetes with severe hyperglycemia, polyurea and polydipsia. Therefore, it is a good type 2 diabetic model for testing small molecule antidiabetic compounds. As shown in Fig. 3, the co-ordinated control of GP and GS was observed in the gel-filtered extracts of spontaneously diabetic rats. When the GP α level was lowered, GS was sequentially dephosphorylated, and through this the activation of glycogen synthesis was initiated. Intravenous administration of TH significantly decreased the GP α level and the activation of GS was initiated without any delay.

Discussion

Liver GP has been identified as a novel target for drugs that control blood glucose concentration. Several compounds with different chemical structures have been probed for the inhibition of hepatic GP. Glucose and its analogues were shown to be inhibitors of the enzyme. TH was found to be a potent glucose derivative that inhibits the catalytic activity of both muscle and liver GP enzymes (24,25). By means of a synthetic procedure using stereoselective preparation, it is possible to produce gram quantities of TH in six-to-seven steps starting from D-glucose (25,26). The structure of the GP β -TH complex as revealed by X-ray studies demonstrates that the inhibitor can be accommodated in the catalytic site of T-state GP β with very little change in the tertiary structure, and provides a basis for understanding the potency and specificity of TH (33).

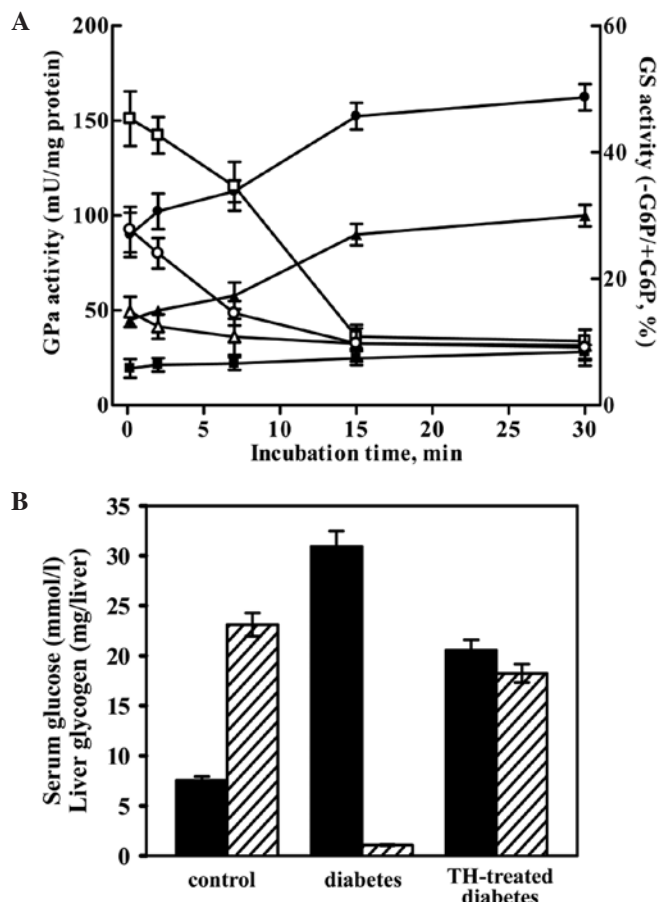


Figure 2. Serum glucose, hepatic glycogen, GP and GS levels in streptozotocin-induced diabetic rats treated with TH. (A) Inactivation of GP (empty symbols) and activation of GS (filled symbols) in gel-filtered liver extracts. Post-mitochondrial supernatants were prepared and filtered through a Sephadex G-25 column, as described in Materials and methods. The filtrates were incubated at 30°C and samples were withdrawn at the indicated times for the assay of GP α or GS. Control ($\circ, \bullet$), diabetic control ($\square, \blacksquare$) and TH-treated diabetic rats ($\triangle, \blacktriangle$). (B) Effect of TH treatment on the concentration of blood glucose (filled column) and liver glycogen (hatched column) in streptozotocin-induced diabetic rats. The results are the mean $\pm$ SD of four independent experiments.

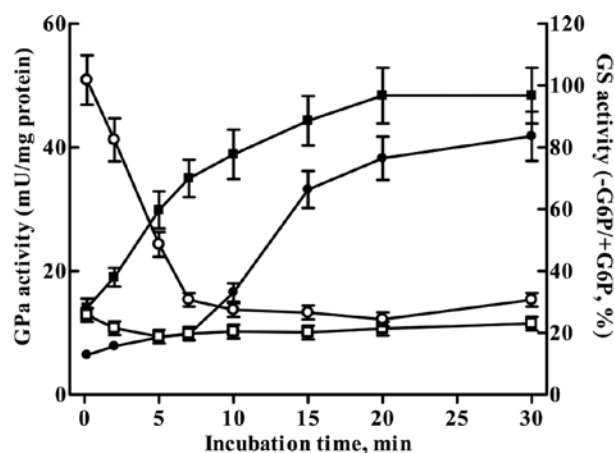


Figure 3. Effect of intravenously injected TH on the inactivation of GP α and activation of GS β in gel-filtered rat liver extract of spontaneously diabetic Zucker rats. Liver samples were removed from different liver lobules and post-mitochondrial supernatants were prepared and filtered through a Sephadex G-25 column, as described in Materials and methods. Control biopsy ($\circ, \bullet$); after the intravenous injection of TH (100 $\mu\text{mol/kg}$ body weight) to the portal vein at 5 min ($\square, \blacksquare$). The results are the mean $\pm$ SD of four independent experiments.

Glucose and its analogues cause a sequential inactivation of GP α and activation (dephosphorylation) of GS β in the liver. We examined the co-ordinated regulation of GP and GS in rat liver extract and observed that 50 μ M TH promoted the activation of GS by significantly decreasing the latency in the dephosphorylation of GS. The decrease of GP α activity, the increase of phosphatase activity and the increase of GS activity all result in the same biological response: the inhibition of hepatic glycogen breakdown, which in turn decreases the concentration of blood glucose. The mechanism by which TH inactivates GP α and activates GS may be complex and requires further study. However, the observed effects of TH clearly indicate that this compound and its analogues may be of potential use in controlling hyperglycaemia.

It is known that streptozotocin-induced diabetes influences glycogen metabolism in animal models. Diabetic rats showed an approximately 4-fold higher blood glucose concentration and approximately 3-fold decrease in liver glycogen concentration compared to control or insulin-treated diabetic animals (34). Similar results are depicted in Fig. 2. Furthermore, TH treatment restored these values to physiological ranges. Our results suggest that the administration of TH improves hyperglycemia, while inhibiting the breakdown and activating the synthesis of glycogen. The ZDF rats also responded to the TH treatment; the active form of GP was decreased, which in turn triggered the synthesis of glycogen by activating GS (Fig. 3). FR258900, a GP inhibitor isolated from the cultured broth of a fungal strain, also exhibited hypoglycaemic effects in diabetic animal models. FR258900 treatment significantly reduced plasma glucose concentrations during oral glucose tolerance tests in diabetic mice models, including *db/db* mice and streptozotocin-induced diabetic mice (35).

It would appear that specific inhibition of hepatic GP results in a rapid decrease in plasma glucose levels in diabetic animals. These improvements in glucose disposal are accompanied by increased liver glycogen contents, suggesting that the glucose-lowering effect was the result of suppressed hepatic glycogen breakdown and increased hepatic glycogen synthesis. Taken together, our results suggest that GP is a potentially useful target in novel therapies against diabetes. The design and development of further glucose analogues for GP as potential therapeutic targets for diabetes have been comprehensively reviewed (13,14,22,36). These compounds primarily bind to the active site of GP, characterized by a D-glucopyranose ring having either diverse substituents or spirocyclic moieties attached to the anomeric carbon. Exhaustive survey of non-glucose-type inhibitors targeting binding sites of GP other than the catalytic site has been conducted (13,14,37). The latest findings from physiological studies on novel GP inhibitors have been summarized by Agius (15).

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Hungarian Science Research Fund (OTKA CNK80709, CK77712) and the TÁMOP 4.2.1./B-09/1/KONV-2010-0007 project implemented through the New Hungary Development Plan, co-financed by the European Social Fund.

References

- Colberg SR: Enhancing insulin action with physical activity to prevent and control diabetes. *ACSM'S Health and Fitness Journal* 12: 16-22, 2008.
- Zimmet P, Alberti KG and Shaw J: Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414: 782-787, 2001.
- Dai YD, Marrero IG, Gros P, Zaghouani H, Wicker LS and Sercarz EE: Slc11a1 enhances the autoimmune diabetogenic T-cell response by altering processing and presentation of pancreatic islet antigens. *Diabetes* 58: 156-164, 2009.
- Henke BR and Sparks SM: Glycogen phosphorylase inhibitors. *Mini Rev Med Chem* 6: 845-857, 2006.
- Roden M and Bernroider E: Hepatic glucose metabolism in humans – its role in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 17: 365-383, 2003.
- Choi K and Kim YB: Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Korean J Intern Med* 25: 119-129, 2010.
- Magnusson I, Rothman DL, Gerard DP, Katz LD and Shulman GI: Contribution of hepatic glycogenolysis to glucose production in humans in response to a physiological increase in plasma glucagon concentration. *Diabetes* 44: 185-189, 1995.
- Diraison F, Large V, Brunengraber H and Beylot M: Non-invasive tracing of liver intermediary metabolism in normal subjects and in moderately hyperglycaemic NIDDM subjects. Evidence against increased gluconeogenesis and hepatic fatty acid oxidation in NIDDM. *Diabetologia* 41: 212-220, 1998.
- Andersen B, Rassov A, Westergaard N and Lundgren K: Inhibition of glycogenolysis in primary rat hepatocytes by 1, 4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol. *Biochem J* 342 (Pt 3): 545-550, 1999.
- Treadway JL, Mendys P and Hoover DJ: Glycogen phosphorylase inhibitors for treatment of type 2 diabetes mellitus. *Expert Opin Investig Drugs* 10: 439-454, 2001.
- Somsak L, Nagya V, Hadady Z, Docsa T and Gergely P: Glucose analog inhibitors of glycogen phosphorylases as potential antidiabetic agents: recent developments. *Curr Pharm Des* 9: 1177-1189, 2003.
- Czifrak K, Kovacs L, Kover KE and Somsak L: Synthesis of some derivatives of C-(1-deoxy-1-N-substituted-D-glucopyranosyl) formic acid (D-glucopyranosyl-2-olopyranosonic acid) as potential inhibitors of glycogen phosphorylase. *Carbohydr Res* 340: 2328-2334, 2005.
- Somsak L, Czifrak K, Toth M, *et al.*: New inhibitors of glycogen phosphorylase as potential antidiabetic agents. *Curr Med Chem* 15: 2933-2983, 2008.
- Oikonomakos NG and Somsak L: Advances in glycogen phosphorylase inhibitor design. *Curr Opin Investig Drugs* 9: 379-395, 2008.
- Agius L: Physiological control of liver glycogen metabolism: lessons from novel glycogen phosphorylase inhibitors. *Mini Rev Med Chem* 10: 1175-1187, 2010.
- Gerich JE: Control of glycaemia. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 7: 551-586, 1993.
- Gerich JE and Nurjhan N: Gluconeogenesis in type 2 diabetes. *Adv Exp Med Biol* 334: 253-258, 1993.
- Tung HY, Alemany S and Cohen P: The protein phosphatases involved in cellular regulation. 2. Purification, subunit structure and properties of protein phosphatases-2A0, 2A1, and 2A2 from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem* 148: 253-263, 1985.
- Somsak L, Kovacs L, Toth M, *et al.*: Synthesis of and a comparative study on the inhibition of muscle and liver glycogen phosphorylases by epimeric pairs of d-glucopyranosylidene-spiro-(thio)hydantoin and N-(d-glucopyranosyl) amides. *J Med Chem* 44: 2843-2848, 2001.
- Szkudelski T: The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 50: 537-546, 2001.
- Griffen SC, Wang J and German MS: A genetic defect in beta-cell gene expression segregates independently from the fa locus in the ZDF rat. *Diabetes* 50: 63-68, 2001.
- Praly JP and Vidal S: Inhibition of glycogen phosphorylase in the context of type 2 diabetes, with focus on recent inhibitors bound at the active site. *Mini Rev Med Chem* 10: 1102-1126, 2010.
- Richard CJP, Mitchell EP, Wormald MR, *et al.*: Potent inhibition of glycogen-phosphorylase by a spirohydantoin of glucopyranose – first pyranose analogs of hydantocidin. *Tetrahedron Letters* 36: 2145-2148, 1995.

24. Osz E, Somsak L, Szilagyi L, *et al*: Efficient inhibition of muscle and liver glycogen phosphorylases by a new glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin. *Bioorg Med Chem Lett* 9: 1385-1390, 1999.
25. Somsak L, Nagy V, Docsa T, Toth B and Gergely P: Gram-scale synthesis of a glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin and its effect on hepatic glycogen metabolism studied in vitro and in vivo. *Tetrahedron-Asymmetry* 11: 405-408, 2000.
26. Somsak L and Nagy V: A new, scalable preparation of a glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin: one of the best inhibitors of glycogen phosphorylases. *Tetrahedron Asymmetry* 11: 1719-1727, 2000.
27. Farkas I, Toth B, Bot G and Gergely P: Hormonal regulation of phosphorylase phosphatase activity in rat liver. *FEBS Lett* 203: 253-256, 1986.
28. Dopere F, Goris J, Vandenheede JR and Merlevede W: Cyclic AMP- and Ca²⁺-independent glycogen synthase kinase from dog liver. *Biochem Soc Trans* 8: 526-527, 1980.
29. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976.
30. Lo S, Russell JC and Taylor AW: Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol* 28: 234-236, 1970.
31. Stalmans W, Bollen M and Mvumbi L: Control of glycogen synthesis in health and disease. *Diabetes Metab Rev* 3: 127-161, 1987.
32. Bolzan AD and Bianchi MS: Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat Res* 512: 121-134, 2002.
33. Oikonomakos NG, Skamnaki VT, Osz E, *et al*: Kinetic and crystallographic studies of glucopyranosylidene spirothiohydantoin binding to glycogen phosphorylase B. *Bioorg Med Chem* 10: 261-268, 2002.
34. Khandelwal RL, Zinman SM and Zebrowski EJ: The effect of streptozotocin-induced diabetes and of insulin supplementation on glycogen metabolism in rat liver. *Biochem J* 168: 541-548, 1977.
35. Furukawa S, Murakami K, Nishikawa M, Nakayama O and Hino M: FR258900, a novel glycogen phosphorylase inhibitor isolated from Fungus No. 138354. II. Anti-hyperglycemic effects in diabetic animal models. *J Antibiot* 58: 503-506, 2005.
36. Gimisis T: Synthesis of N-glucopyranosidic derivatives as potential inhibitors that bind at the catalytic site of glycogen phosphorylase. *Mini Rev Med Chem* 10: 1127-1138, 2010.
37. Loughlin WA: Recent advances in the allosteric inhibition of glycogen phosphorylase. *Mini Rev Med Chem* 10: 1139-1155, 2010.

Recent Developments in the Synthesis and Evaluation of Glucose Analog Inhibitors of Glycogen Phosphorylases as Potential Antidiabetic Agents

László Somsák^{a,*}, Veronika Nagy^a, Zsuzsa Hadady^a, Nóra Felföldi^a, Tibor Docsa^b and Pál Gergely^c

^aDepartment of Organic Chemistry, Faculty of Science, University of Debrecen, Egyetem tér 1, POB 20, H-4010 Debrecen, Hungary, ^bSignalling and Apoptosis Research Group of the Hungarian Academy of Sciences, ^cDepartment of Medical Chemistry, Research Center for Molecular Medicine, Medical and Health Science Center, University of Debrecen, Bem tér 18/B, H-4026 Debrecen, Hungary

Abstract: Diabetes is among the largest contributors to global mortality through its long term complications. The worldwide epidemic of type 2 diabetes has been stimulating the quest for new concepts and targets for the treatment of this incurable disease. A new target is glycogen phosphorylase (GP), the main regulatory enzyme in the liver responsible for the control of blood glucose levels. One of several approaches to influence the action of GP is the use of glucose derivatives as active site inhibitors. This field of research commenced 10-15 years ago and, due to joint efforts in computer aided molecular design, organic synthesis, protein crystallography, and biological assays, resulted in glucopyranosylidene-spiro-hydantoin **16** ($K_i = 3-4 \mu\text{M}$) as the most efficient glucose analog inhibitor of GP of that time. The present paper surveys the recent developments of this field achieved mainly in the last five years: the synthesis and evaluation of glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin **18** ($K_i = 5 \mu\text{M}$) which has proven equipotent with **16**, and is available in gram amounts; furanosylidene- and xylopyranosylidene-spiro-(thio)hydantoins whose ineffectiveness ($K_i > 10 \text{ mM}$) confirmed the high specificity of the catalytic site of GP towards the D-glucopyranosyl unit; "open" hydantoins like methyl *N*-(1-carboxamido-D-glucopyranosyl)carbamate **37** ($K_i = 16 \mu\text{M}$) and *N*-acyl-*N'*-(β -D-glucopyranosyl)ureas among them the to date best glucose analog inhibitor *N*-(2-naphthoyl)-*N'*-(β -D-glucopyranosyl)urea (**35**, $K_i = 0.4 \mu\text{M}$) which can also bind to the so-called new allosteric site of GP; C-(β -D-glucopyranosyl)heterocycles (tetrazole, 2-methyl-1,3,4-oxadiazole, benzimidazole ($K_i = 11 \mu\text{M}$), and benzothiazole). Iminosugars like isofagomine (**52**, $\text{IC}_{50} = 0.7 \mu\text{M}$), noeuromycin (**60**, $\text{IC}_{50} = 4 \mu\text{M}$), and azafagomine (**61**, $\text{IC}_{50} = 13.5 \mu\text{M}$) also bind strongly to the active site of GP, however, substitution on the nitrogens makes the binding weaker. The natural product five-membered iminosugar DAB (**63**) exhibited $\text{IC}_{50} \sim 0.4-0.5 \mu\text{M}$. Azoloperhydropyridines which can be regarded iminosugar-annelated heterocycles show moderate inhibition of GP: nojiritetrazole **12** ($K_i = 53 \mu\text{M}$) is the best inhibitor and fewer nitrogens in the five-membered ring weakens the binding. Physiological investigations have been carried out with *N*-acetyl- β -D-glucopyranosylamine **6**, spiro-thiohydantoin **18**, isofagomine **52**, and DAB **63** to underline the potential use of these compounds in the treatment of type 2 diabetes. Computational methods suggest to synthesize further anomerically bifunctional glucose derivatives which may be good inhibitors of GP.

*Corresponding author: Tel: +36-52-512-900; Fax: +36-52-453-836; E-mail: somsak@tigris.unideb.hu

INTRODUCTION – MOTIVATION OF THE SEARCH FOR GP INHIBITORS

The end of the 20th century has seen a dramatic increase in the number of patients diagnosed with diabetes worldwide. This disease, characterized by chronically elevated blood glucose levels, afflicts approximately 6 % of the adult population in Western society [1]. Most striking is the predicted number of diabetics 220 million for the year 2010 indicating a 46 % enhancement in the world population during a decade [2]. Especially due to its long term complications like retinopathy, neuropathy, and nephropathy, but first of all cardiovascular diseases, diabetes has become one of the largest contributors to mortality.

Diabetes is divided into two main forms: type 1 is characterized by a complete insulin deficiency, and can be treated by exogenous insulin; type 2 diabetics exhibit abnormal insulin secretion and/or insulin resistance, and their blood glucose levels are controlled mainly by diet, exercise, and oral hypoglycemic agents [3]. While the ratio of type 1 and 2 diabetes was estimated to be ~ 25 : 75 in the early nineties [4], the frequency of the latter has gained to more than 90 % for today [1, 2]. The epidemic of type 2 diabetes is in conjunction with genetic susceptibility and in particular with behavioral factors such as sedentary lifestyle, overly rich nutrition, and obesity.

In the absence of a firm understanding of the molecular pathomechanism of the disease several types of oral hypoglycemic drugs (sulfonylureas, biguanides, thiazolidinediones, acarbose) are in use as symptomatic treatments for type 2 diabetes [5-8]. These treatments aim to more or less approach the normal physiological regulation of blood glucose levels, however, have several adverse side effects as well as the danger of causing hypoglycemia, and, what's more, are inadequate for 30-40 % of the patients [9]. Therefore, other therapeutic concepts (among others novel insulin secretagogues, insulin sensitizers, glucagon receptor antagonists, inhibitors of hepatic glucose output, combination therapies) are intensively investigated [1, 10-14], as it turns out also from the patent literature [7, 15], and a wholly nutritional therapy has been suggested as well [16].

The aim of the present article is to highlight a specific area of attempts to reduce glucose production in the liver: inhibition of glycogen phosphorylase enzyme by glucose derivatives. This field of research was started at the beginning of the nineties, and was summarized several times [17-19] or appeared as part of comprehensive reviews [11, 20, 21]. In this paper we survey the most important moments in the development of the topic, and focus on the results obtained in the last five years.

GLYCOGEN METABOLISM

The liver is the predominant source of blood glucose. Numerous studies have shown that hepatic glucose production is increased in type 2 diabetes in the post-absorptive state, and it is directly correlated to fasting hyperglycemia [1, 11, 13, 22, 23]. Hepatic glucose is produced from two pathways: glycogenolysis (the breakdown of glycogen) and gluconeogenesis (*de novo* synthesis of glucose). Glycogenolysis may account for more than 70 % of the hepatic glucose production, furthermore, a substantial portion of glucose formed by gluconeogenesis is cycled through the glycogen pool prior to efflux from the liver cells (for references, see [24]).

Hepatic glucose output is regulated by a complex system of enzymes. The main regulatory enzyme of this system is glycogen phosphorylase, and only the phosphorylated enzyme (GP_a) has significant activity. GP_a releases glucose 1-phosphate from glycogen as shown in Fig. 1 suggesting an important role for glycogenolysis in hepatic glucose production. Gluconeogenesis from lactate and other precursor molecules can also contribute to the elevated blood glucose levels, however, it was clearly demonstrated that glucose

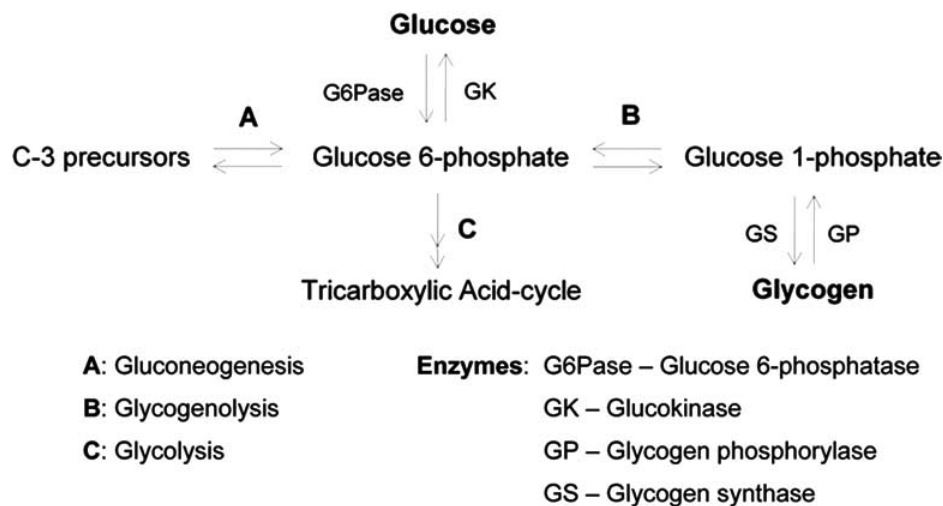


Fig. (1). Overview of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis.

arising from gluconeogenesis has cycled through glycogen. Therefore the inhibition of hepatic GP could suppress glucose production arising from both glycogenolysis and gluconeogenesis [11, 20, 21].

There are three mammalian GP isoenzymes termed as “muscle”, “brain”, and “liver” according to the tissue in which they are preferentially expressed. All encoded by different genes located on human chromosomes 11, 20, and 14, respectively (for details see [20]). GP-s are dimers of two identical subunits (Mr about 97500 Da). All isoenzymes can be converted from the inactive GP b form into the active GP a form through the phosphorylation of Ser-14 by phosphorylase kinase. In addition, muscle and brain specific GP-s are also allosteric enzymes: the b form can be found predominantly in T state and the a form in R state, respectively. Allosteric activators (e.g. AMP) promote degradation of glycogen, while allosteric inhibitors (e.g. glucose, glucose 6-phosphate, ATP) retard degradation by altering the equilibrium between a less active T state and a more active R state (for references see [21]). The liver specific GP, on the other hand, is much more tightly controlled by phosphorylation than by allosteric regulation. Allosteric effectors such as AMP and glucose 6-phosphate have little effect on the activity of the hepatic isoenzyme [22].

It is known that the activity of liver GS is also controlled by reversible phosphorylation of multiple serine residues. Dephosphorylated form of GS is the catalytically active (GS a) form. Phosphorylation is associated with an inactivation of GS, conversion to the b form. The dephosphorylation of GP and GS is interrelated and catalyzed by the glycogen-associated protein phosphatase-1. GP a , but not GP b , is a potent inhibitor of the phosphatase action on GS and it is only when GP a has been dephosphorylated that the phosphatase is free to activate GS, the rate limiting enzyme of glycogen synthesis [22].

INHIBITORS OF GP

GP isoenzymes of muscle and liver origin are well known and characterized (for references see [25]), however, much less information is available about the brain specific enzyme [26]. Crystal structures of rabbit muscle glycogen phosphorylase (RMGP) a [27] and b [28, 29] and human liver glycogen phosphorylase (HLGP) a and b [30] are also

known facilitating the identification of binding modes of effector molecules. Because of accessibility reasons the majority of investigations have been carried out with RMGP enzymes, nevertheless, cloning and expression of HLGP [31] has paved the way for investigations with the real target. Besides the catalytic center there are three sites in RMGP (Fig. 2), AMP- (or nucleotide or allosteric); purin- (or nucleoside or inhibitor); and a new allosteric- (or indole) binding site, which can accommodate small molecules to induce stabilization of the T state of the enzyme. HLGP has the same binding sites, however, the enzyme is less sensitive to effectors of the AMP site [30]. Some selected best inhibitors of GP-s known to date are shown in Fig. 3, and their binding site is also indicated.

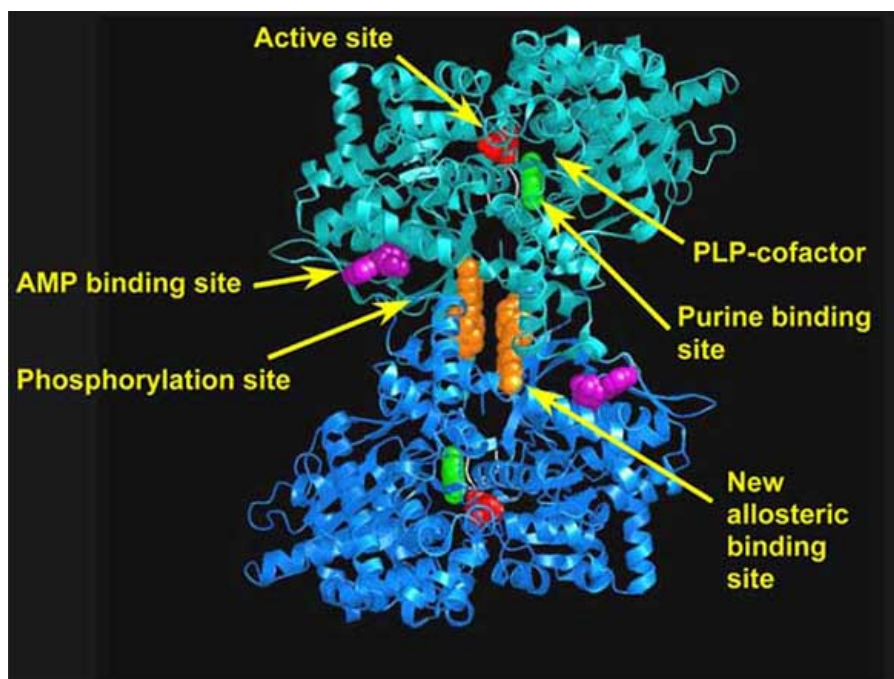


Fig. (2). X-Ray structure of RMGPb showing the binding sites of effectors. (Presentation by courtesy of Prof. Dr. Nikos G. Oikonomakos.)

Under physiological conditions glucose acts as a regulator of GP by stabilizing the less active T state of the enzyme through binding to the catalytic center [38]. Although this binding is weak (for K_i values of α - (1) and β -D-glucose (2) see Fig. 4) it has raised the possibility to search for glucose derivatives with much higher affinity to the active site. Among the early glucose analogs glucosides (3-5), *N*-acyl- β -D-glucopyranosylamines (6, 7, 9), *N*-(β -D-glucopyranosyl)urea (8), thioglucosides (10), a 1-deoxy-D-glucopyranose 2-phosphate (11), nojiritetrazole (12), 2,6-anhydro-heptonamides (13, 14), and glucopyranosylidene-spiro-heterocycles (15-17) were investigated whose representatives with the highest affinity to the enzyme are collected in Fig. 4. The strongest inhibition was achieved by glucopyranosylidene-spiro-hydantoin 16. Crystallographic studies on the RMGPb-16 complex revealed the structural features responsible for the tight binding to the catalytic center: i) a hydrogen bond between the N(7)-H of the hydantoin and the main chain oxygen of His377 which also facilitates an optimal hydrogen bond between the CH₂OH

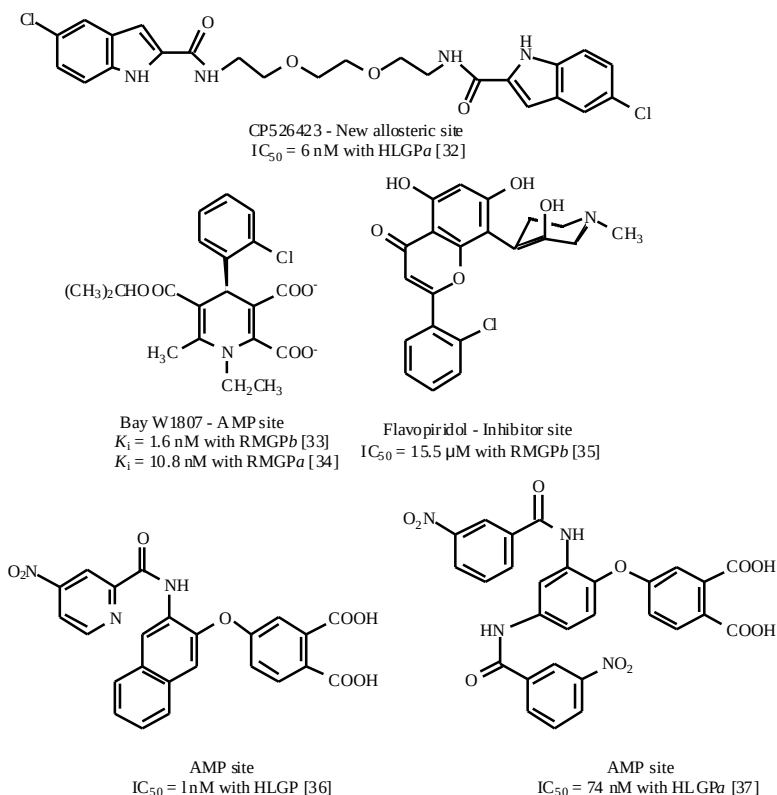


Fig. (3). Selected non-glucose analog inhibitors of GP-s.

moiety in the glucose and the side chain of His377; ii) the rigid planar spirohydantoin group undergoing little loss of conformational energy on binding; iii) the hydrogen bonding capability of the hydantoin polar groups exploiting existing water structure and creating additional water network to the protein, thereby providing additional enthalpic contributions [39]. Although targeted, none of these inhibitors formed favorable contacts either with the α - or β -channel next to the catalytic center of the enzyme.

Based on the structure of these inhibitors computational methods were used to design and evaluate new structures as potential inhibitors of GP. Given the large number of kinetically characterized compounds for which the binding modes were also discovered by X-ray crystallography several sets of glucose analog inhibitors were used for developing, testing, and training computational chemistry methodologies [47-53]. These methods were also used to suggest new inhibitory structures with estimated inhibitor constants. A 4D-QSAR analysis (based on a training set of 47 glucose analogs with a range of $K_i = 0.016$ -53.1 mM) of a virtual library of 225 compounds, where the anomeric substituents were systematically changed as shown in Table 1, uncovered several compounds with a predicted binding stronger than the best member (37, see also Fig. 7) of the training set (Entries 1-10 in Table 1) [54]. In a different approach a multiple screening method was based on compounds 1, 16, and 37 as design templates: some of the best 25 computed structures are shown in Entries 11-20 in Table 1 [55]. Interestingly, none of these was predicted to show

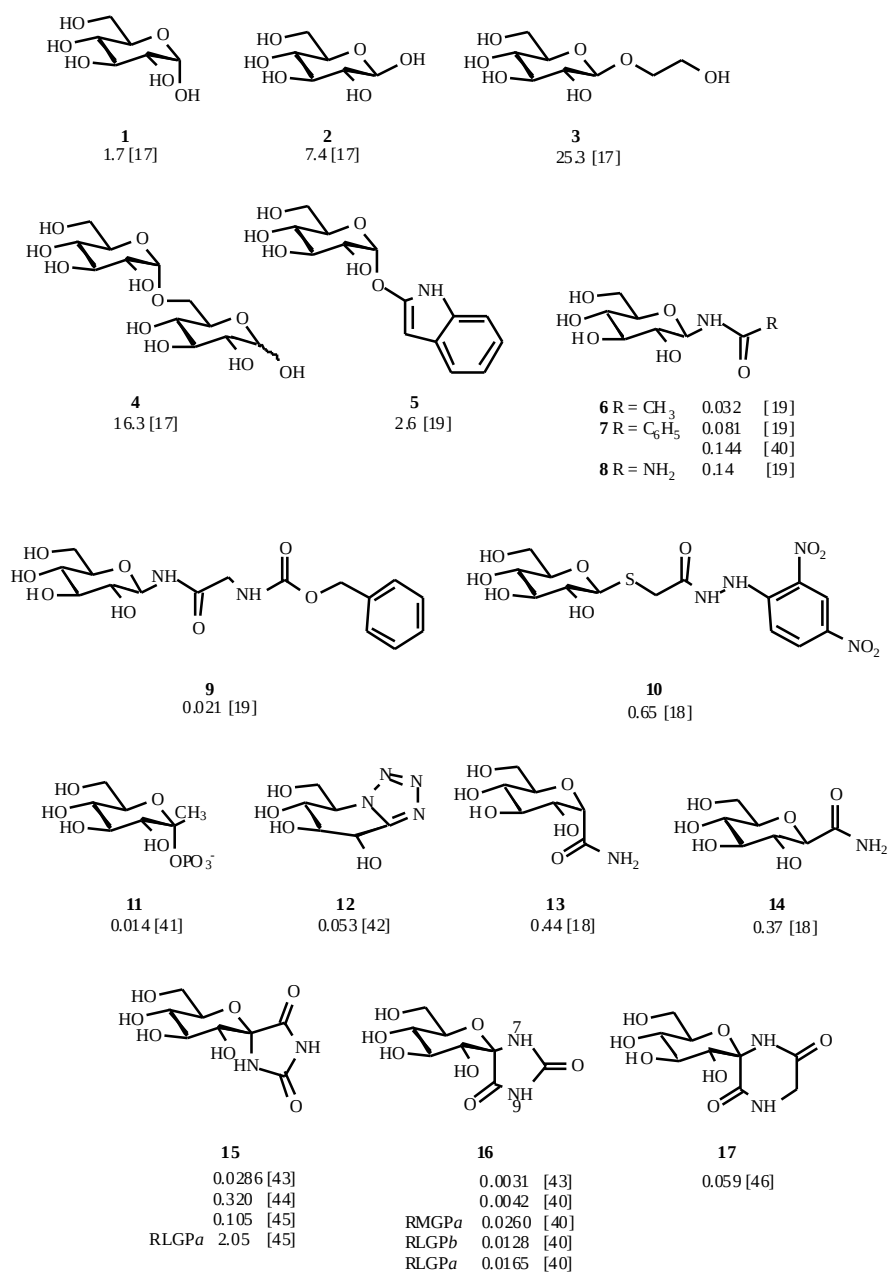
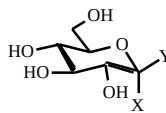
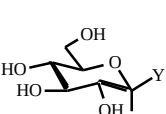
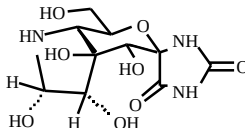


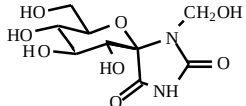
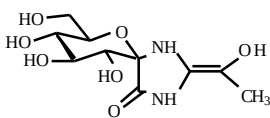
Fig. (4). Early glucose analog inhibitors of GP-s: K_i values [mM] measured with RMGP_b unless otherwise stated.

higher affinity to the enzyme than the templates. To the best of our knowledge these computed structures have not yet been synthesized.

Table 1. Virtual Library of Glucose Derivatives Designed by Computational Chemical Methods as Possible Inhibitors of GP.

	<i>Substituents (either X or Y) investigated in the 4D-QSAR analysis:</i> H, NH(C=O)CH ₃ , CONHCH ₃ , Cl, CH ₃ , COCH ₂ OCH ₃ , CH ₂ (C=O)CH ₃ , NHCH ₃ , CH ₂ NHCH ₃ , CH ₂ OCH ₃ , CH ₂ (C=O)CH ₂ OH, NO ₂ , NH(C=O)NH ₂ , SO ₂ NH ₂ , SH		
	Best results obtained with the 4D-QSAR analysis [54]		
Entry	X	Y	predicted K _i [mM]
1.	SO ₂ NH ₂	NH(C=O)CH ₃	0.00059
2.	CH ₂ NHCH ₃	NH(C=O)CH ₃	0.0015
3.	CONHCH ₃	NH(C=O)CH ₃	0.0017
4.	CH ₂ (C=O)CH ₂ OH	CH ₃	0.0022
5.	CH ₃	NH(C=O)NH ₂	0.0041
6.	SH	NH(C=O)NH ₂	0.0050
7.	CONHCH ₃	CONHCH ₃	0.0056
8.	NO ₂	NH(C=O)NH ₂	0.0068
9.	NH(C=O)CH ₃	NH(C=O)CH ₃	0.0072
10.	NHCH ₃	NH(C=O)CH ₃	0.0076
Best ligand (37) in the 4D-QSAR training set	CONH ₂	NH(C=O)OCH ₃	0.0160*
	<i>Modifying groups used in the generation of new structures from 1, 16, and 37 for the multiple screening analysis (selection from 31 groups):</i> CH ₃ COO ⁻ , CH ₃ COOH, CH ₃ CONH ₂ , C ₆ H ₆ , C ₆ H ₁₂ , CH ₃ NH ₂ , CH ₃ NO ₂ , CH ₃ CN, CH ₃ OH, CH ₃ SH, CH ₃ NHNH ₂ , CH ₃ NHOH, CH ₃ SCF ₃ , CH ₃ SOCH ₃ , C ₆ H ₅ OH		
	Selected results obtained with the multiple screening method [55]		
11.	CONH ₂	NH(C=O)NHOH	0.0288
12.	CONH ₂	NH(C=O)SCN	0.0355
13.	CONH ₂	NH(C=O)CH ₂ F	0.0501
14.	CONH ₂	NH(C=O)NO	0.0550
15.			0.0646

(Table 1. Contd....)

	Modifying groups used in the generation of new structures from 1 , 16 , and 37 for the multiple screening analysis (selection from 31 groups): CH ₃ COO ⁻ , CH ₃ COOH, CH ₃ CONH ₂ , C ₆ H ₆ , C ₆ H ₁₂ , CH ₃ NH ₂ , CH ₃ NO ₂ , CH ₃ CN, CH ₃ OH, CH ₃ SH, CH ₃ NHNH ₂ , CH ₃ NHOH, CH ₃ SCF ₃ , CH ₃ SOCH ₃ , C ₆ H ₅ OH		
	Selected results obtained with the multiple screening method [55]		
16.			0.0813
17.			0.170
18.	H	NH(C=O)CH ₂ Br	0.174
19.	Cl	NH(C=O)CH ₃	0.219
20.	CN	NH(C=O)CH ₃	0.363

*Experimental value [44].

RECENT SYNTHESSES AND EVALUATION OF GLUCOSE ANALOGS AS INHIBITORS OF GP

Derivatives of D-glucose and Related Monosaccharides

The preparative methods used for the synthesis of spiro-hydantoin **16** [43, 44, 56] were stereochemically not efficient enough because the epimeric **15** was the major product. A synthetic study on the formation of glycopyranosylidene-spiro-hydantoins and -thiohydantoins in the reactions of C-(1-bromo-1-deoxy-D-galacto- and -D-arabinopyranosyl) formamides with cyanate and thiocyanate ions revealed that the former gave spiro-hydantoins with retained anomeric configuration as the major product while the latter yielded spiro-thiohydantoins of inverted anomeric configuration exclusively [57]. This method was applied to the D-*gluco* [40, 45] and D-*xylo* [40] configured formamides as well with the same stereochemical result to give compounds **18**, **19**, and **20**, respectively (Fig. 5). A comparison of the inhibitor constants determined with RMGP α and β as well as RLGP α and β enzymes demonstrates that **16** and **18** are equipotent inhibitors. An X-ray crystallographic investigation revealed that **18** binds to the enzyme in the same way as **16** does [58]. The absence of the CH₂OH side chain of the sugar ring as in **19** and **20** resulted in a practically complete loss of the inhibition even in the presence of the beneficial spiro-(thio)hydantoin moiety. Further improvements in the preparation of **18** made this inhibitor available in gram amounts [59] which facilitated other biological investigations to be carried out [60]. Substitution of N(9) in the spiro-hydantoin as shown in **21-24** brought about no improvement of the inhibition [56]. Modification of the sugar ring to a furanoid structure as in **25** and **26** led to very weak binding [61] in accordance with early observations with epimers and deoxy derivatives of D-glucose [62, 63]. The findings with **19**, **20**, **25**, and **26** underline and confirm the high specificity of the GP active site towards a fully OH-substituted hexopyranoid sugar moiety of D-*gluco* configuration. Spiro-annulated hydantoins were prepared at the C-3 carbon of D-allopyranose and D-ribofuranose in order

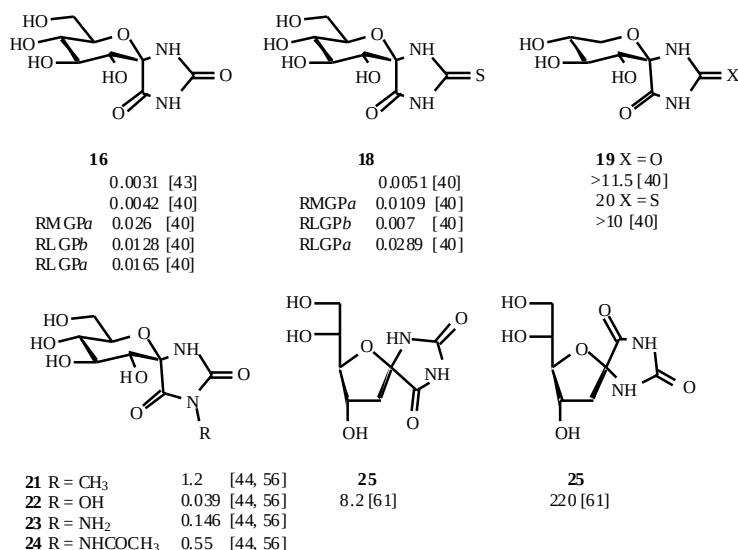


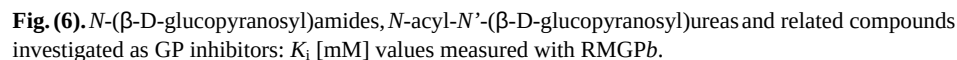
Fig. (5). Glycosylidene-spiro-hydantoin and -thiohydantoin investigated as GP inhibitors: K_i [mM] values measured with RMGP_b unless otherwise stated.

to evaluate their GP inhibiting potency [64, 65], however, these compounds proved inactive in tests with RMGP_b [66].

Compounds exhibiting structural elements of the hydantoin moiety like **6**, **13**, and **14** in Fig. 4 can also bind to GP-s. Owing to a new synthetic protocol [67] it has become possible to prepare and investigate anomeric pairs of *N*-trifluoroacetyl-D-glucopyranosylamines **27** and **31** (Fig. 6). As compared to **6** the presence of the CF₃ group in **27** significantly decreased the inhibition, and anomer **31** had no effect at all [40]. This finding suggests the importance of an *N*-acyl-β-D-glucopyranosylamine structural element in keeping with the influence of the configuration of the spiro carbon in hydantoin **15** and **16**. A hydrophilic amide side chain [67] in **28** and **29** caused weaker inhibition [68], but introduction of a naphthyl group as in **30** resulted in a rather good inhibitor [69]. This suggests to synthesize and test similar compounds with long aliphatic and otherwise hydrophobic side chains that will be discussed further in Table 2.

N-Acyl-*N'*-(β-D-glucopyranosyl) urea derivatives (like **32-35**) can be regarded as “open” hydantoin. While the *N*-acetylated compound **32** proved a weaker inhibitor than urea **8**, increasing the hydrophobicity of the acyl side chain makes the binding stronger [70] (**33-35**). The 2-naphthoyl urea **35** is to date the best glucose analog inhibitor of RMGP_b [68]. Placing the hydrophobic moiety farther from the sugar makes the binding stronger by more than one order of magnitude (compare pairs **7-33**, and **30-35**), although this distance must have an optimum, since **36** is a weak inhibitor. A comparison with compound **9** in Fig. 4 might indicate that the NH(CO)NH(CO) substructure must have significance as well (see also discussion of Table 2). These findings suggest that appropriately positioned large apolar groups can fit into the β-channel next to the active site of the enzyme.

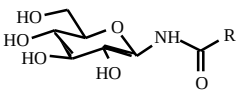
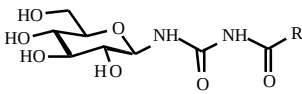
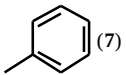
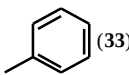
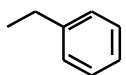
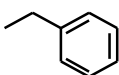
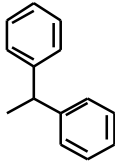
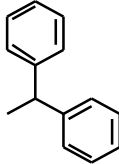
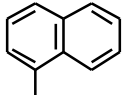
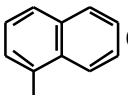
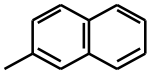
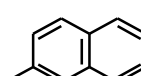
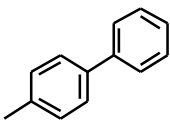
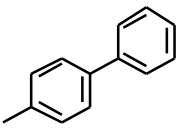
A very interesting peculiarity of some of these ureas is their ability to bind at the new allosteric site as well. This property has been demonstrated for the first time with the benzoyl urea **33** [70], however, **35** and even amide **30** and can also be detected by X-ray



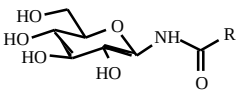
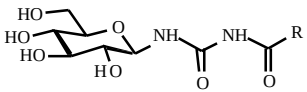
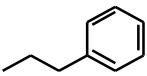
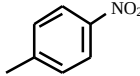
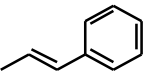
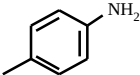
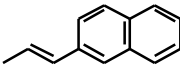
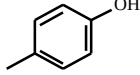
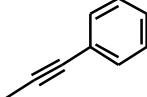
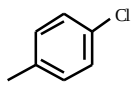
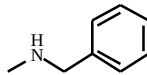
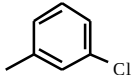
Further structure–activity relationships can be deduced from a series of *N*-(β-D-glucopyranosyl)amides and *N*-acyl-*N'*-(β-D-glucopyranosyl)ureas collected in Table 2.

A comparison of inhibitors in Entries 1, 3, and 4 shows that an increase in the size of the aliphatic substituent makes the inhibition significantly weaker; the same holds for the ureas in Entries 16 and 17. Saturation of the aromatic ring (compare Entries 4-5 and 17-18) also weakens the binding, and this effect is significantly larger in the ureas. A benzylic moiety is rather detrimental for the inhibition in both series (Entries 6 and 19), and a further increase of the size as in the diphenylmethyl group makes no more inhibition at all (Entries 7 and 20). The orientation of the aromatic moiety in both series is a decisive factor (compare Entries 8-10 and 21-23). Introduction of substituents of slightly basic or acidic as well as of neutral character into the 4-position of benzoyl urea **33** (Entries 24-27) brings about no

Table 2. Structure–activity Relationships of *N*-(β -D-glucopyranosyl)amides [69] and *N*-acyl-*N'*-(β -D-glucopyranosyl)ureas.

Entry				Entry			
	R	K_i [mM]	IC_{50} [mM]		R	K_i [mM]	IC_{50} [mM]
1.	-CH ₃ (6)	0.032		16.	-CH ₃ (32)	0.305	
2.	-CH ₂ Cl	0.045[19]					
3.	-C(CH ₃) ₃		7.5				
4.		0.289		17.			5
5.	 (7)	0.081		18.	 (33)	0.0056	
6.			1.1	19.			10
7.		no inhibition		20.			>5
8.		0.444		21.	 (34)	0.013	
9.		0.010		22.	 (35)	0.0004	
10.		0.281		23.			2.5

(Table 2. Contd....)

Entry				Entry			
	R	K_i [mM]	IC_{50} [mM]		R	K_i [mM]	IC_{50} [mM]
11.		0.085		24.		0.003	
12.		0.018		25.			0.015
13.		0.0035		26.		0.007	
14.		0.061		27.		0.012	
15.		0.760		28.		0.113	

significant change in the inhibition, and a chlorine in the 3-position significantly weakens the binding (Entry 28). Aromatic groups attached by versatile aliphatic linkers in the glucosylamide series make rather good inhibitors (Entries 11-14). Restriction of the conformational mobility of the phenyl moiety (compare Entries 11 and 12) makes a better inhibitor, and an increase of the size of the aromatic ring results in the best inhibitor of the glucosylamides (Entry 13). As the distance and the orientation of the aromatic moieties can be very similar in these derivatives and in **33** and **35** (Entries 18 and 22, resp.) one can deduce that the presence of the acyl urea motif is essential for the strong binding. This is further corroborated by the weak inhibition of benzyl urea derivative in Entry 15.

The molecular conformation of *N*-(β -D-glucopyranosyl) chloroacetamide (shown in Entry 2 of Table 2) in the solid state was determined by X-ray crystallography, and compared to the bound conformation of the inhibitor [72]. It turned out that due to hydrogen bonds between the chlorine and the enzyme amino acid residues the torsional angle Cl-CH₂-C(O)-N changes from 131° (free compound) to -51° (bound inhibitor).

Compound **37** [44] (Fig. 7) represents another way of "opening" the hydantoin ring. A comparison of the analogous **38** [73] with **6** as well as **13** reveals that this type of double functionalization of the anomeric center is not very useful for the strength of the inhibition. An additional ethoxy group as in **39** makes the compound much less efficient. An azido group in the anomeric β -position of glucose allows no strong binding even with several additional substituents illustrated by **40-43** [73, 74]. Hydroxy-amide **44** can be regarded as a hybrid of α -D-glucose (**1**) and 2,6-anhydro-heptonamide **14**, however, the bifunctional anomeric center brought about a significant decrease in the inhibition in comparison to both **1** and **14** [40]. In spite of these moderate inhibitory activities further design, synthesis, and

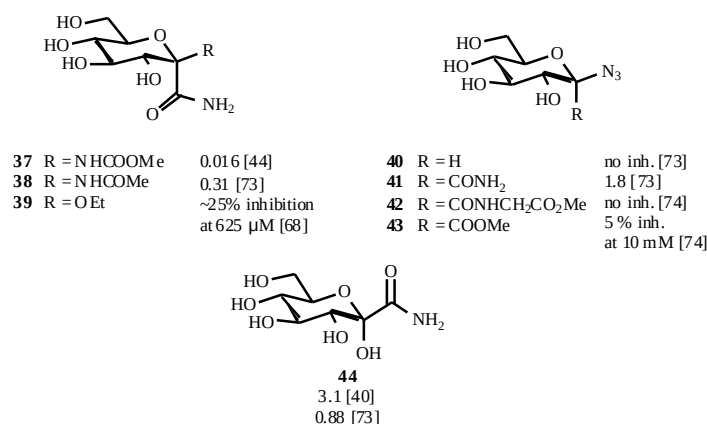


Fig. (7). Anomerically bifunctional derivatives of D-glucose as GP inhibitors. K_i [mM] values tested with RMGPb.

investigations of anomerically bifunctional glucose derivatives (see also Table 1 for computationally predicted structures) may be worthy to future efforts.

β -D-Glucopyranosyl cyanide **45** and C-(β -D-Glucopyranosyl)heterocycles **46-49** (Fig. 8) were prepared [75] in part by adapting published synthetic methods ([76] for **46** and **49**, [77] for **47**, [68] for **48**). Tetrazole **46** of slightly acidic character was not inhibitory, oxadiazole **47** and benzothiazole **49** showed moderate binding, while imidazole **48** proved to be an inhibitor in the low micromolar range. The possible formation of a H-bond to the enzyme by the slightly acidic NH of the imidazole ring might explain the difference between **48** and **49**. Increasing the distance between the sugar and the heterocycle by bridges of 1 or 2 sulfur atoms resulted in much worse inhibitors. The lack of inhibition by **50** and the weak binding of **51** may be due to an unfavorable position of the hydrophobic moieties and the apolar character of the linking sulfur atoms.

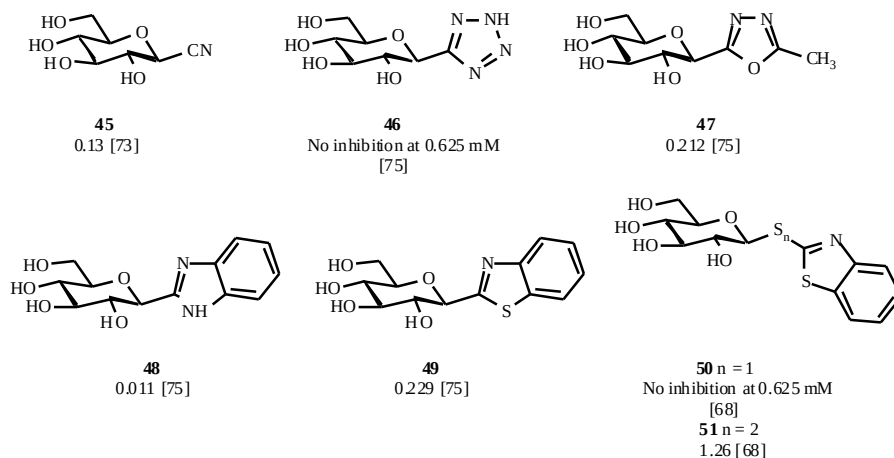


Fig. (8). C-(β -D-glucopyranosyl)-, β -D-glucopyranosylsulfanyl- and -disulfanyl derivatives as GP inhibitors: K_i [mM] values measured with RMGPb.

Iminosugar Derivatives

The phosphorolysis of glycogen catalyzed by GP-s was postulated to proceed through a glycosyl cation like transition state [41], therefore, compounds known to be mimics of glycosylium ions [78] might have the potential to inhibit these enzymes. While classic iminosugar glycosidase inhibitors like nojirimycin exhibit poor effects with GP (see references cited in [41]), isofagomine (**52**, Fig. 9) showed a rather strong binding. However, this could not be improved by introducing substituents at the nitrogen as illustrated by some of the best inhibitors of these series (**53-59**) [79]. Similar observations were made with azafagomine (**61**) and its substituted derivatives obtained as constituents of a combinatorial library of glycosidase inhibitors: substitution at the nitrogen resulted in a weaker inhibition as shown by **62** being the best β -glucosidase inhibitor in the library [80]. Another iminosugar derivative, neuromycin [81] (**60**) binds also to the catalytic center [21], however, its affinity seems to be lower as compared to that of isofagomine **52**, in spite of the presence of the full glucose hydroxylation pattern. For the understanding of this experience further investigations are needed.

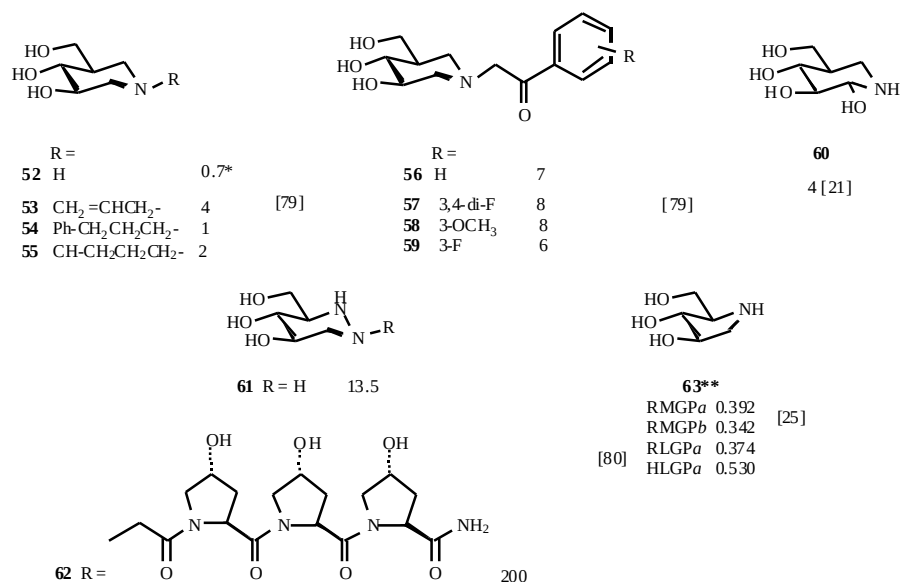


Fig. (9). IC_{50} [μM] values for iminosugar derivatives measured with RLGP α .

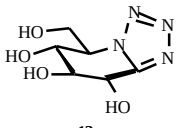
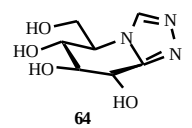
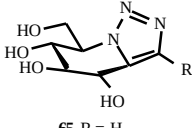
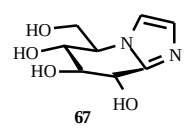
* Essentially the same values were obtained with PLGP α and RMGP α , as well [79].

** K_i [μM] values.

The commercially available natural product five-membered ring iminosugar 1,4-dideoxy-1,4-imino-arabinitol (DAB, **63**) shows a strong structural resemblance to D-glucose as far as the spatial positions of the hydroxyl groups are concerned. Kinetic characterization of DAB revealed that this compound is a strong inhibitor of GP-s with K_i values in the nanomolar range [25] (Fig. 9). The mechanism of action was shown to be a distinct one in comparison to other inhibitors exhibiting elements of un- and noncompetitive inhibition. No crystallographic investigation of a GP–DAB complex has yet been published.

A systematic study [82] of iminosugar-annelated heterocycles (azoloperhydropyridines **64**, **65**, and **67**) as analogs of the good inhibitor nojiritetrazole **12** (Table 3) showed that the fewer the number of the nitrogens in the five-membered ring the weaker the inhibition, and the absence of inorganic phosphate makes this even weaker. In order to explain these findings a charge–dipole interaction between the inorganic phosphate involved in the transition state of the catalyzed reaction and the annelating carbon of the azole moiety in the inhibitor (see Fig. 10) was invoked. This interaction was expected to be stronger for azoles with a lower LUMO energy. Since the necessarily lateral protonation of an azole nitrogen – in the absence of any proton donor amino acid side chain in the active site of GP – could happen by the inorganic phosphate only which, on the other hand, is fixed by a H-bridge to OH(2) (carbohydrate numbering), the sole binding factor due to the azole moiety can be the charge–dipole interaction, the strength of which is reflected in the inhibitor constants. Introduction of a carboxyl group (under conditions of the enzyme activity assay actually a carboxylate ion) into the triazole ring as in **66** caused a significant loss of the activity. This is probably due to unfavorable steric interactions between the inhibitor and the protein which cannot be compensated for by conformational motions of the enzyme [83].

Table 3. Inhibition of RMGPb by iminosugar annelated heterocycles (azoloperhydropyridines) [82].

	K_i [mM] GPb/phosphate	K_i [mM] GPb/Glc-1-P	E_{LUMO}^a [kcal/mol]	$E_{\text{min}}^{a,b}$ [kcal/mol]
 12	0.053 ^c [42]	0.7 ^d [42]	−0.298	−8.6
 64	8.1 ^c	No inhibition	0.156	−7.8
 65 R = H 66 R = COOH	0.54 ^c 7.4 ^d [83]	2.5 ^d	0.111	−6.6
 67	9.7	No inhibition	0.788	−5.9

^a From AM1 semiempirical calculations.

^b Energy level of the transition state analogous to that shown in Fig. 10.

^c K_i [mM] GPb/phosphate, uncompetitive.

^d K_i [mM] GPb/Glc-1-P, competitive.

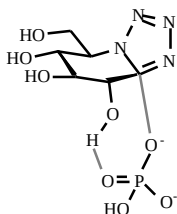


Fig. (10). Postulated interaction of the transition state analog inhibitor **12** with the inorganic phosphate at the catalytic center of GP [82].

Miscellaneous

In a study on the effects of cryoprotectants [84] used in low temperature X-ray crystallographic investigations of GP–inhibitor complexes it has been shown that glycerol can also bind to the catalytic center ($K_i = 3.8\%$ v/v), and its hydroxyl groups occupy the position of OH(3), OH(4), and OH(6) of D-glucose. In the same work sucrose was also shown to bind to the catalytic center with a $K_i = 6.6\%$ w/v.

The cyclic oligosaccharides α - ($K_i = 47.1$ mM), β - ($K_i = 14.1$ mM), and γ -cyclodextrins ($K_i = 7.4$ mM) were also evaluated as inhibitors of RMGPb, and protein crystallography showed these compounds to bind at the glycogen storage site [85].

PHYSIOLOGICAL RESULTS WITH GLUCOSE ANALOG INHIBITORS

The hyperglycemia observed in type 2 diabetes is caused by reduced peripheral glucose deposition and by inappropriate overproduction of glucose by the liver. In the liver, GP_a functions as a glucose receptor. The binding of glucose to the catalytic site of the enzyme inhibits its activity in a competitive manner and glucose also facilitates the dephosphorylation reaction of GP_a into GP_b catalyzed by protein phosphatases. The resulting inactivation of GP_a causes the arrest of glycogenolysis and the subsequent release of the potent allosteric inhibition of GS phosphatase by GP_a. The latter explains why dephosphorylation and inactivation of GP_a during glucose-induced glycogenolysis precedes dephosphorylation and activation of GS. This mechanism prevents simultaneous synthesis and degradation of glycogen and explains why the glucose-induced activation of GS *in vivo* and in isolated hepatocytes only occurs after latency (for details, see [22]).

A series of glucose-analogue inhibitors of GP_b has been investigated in crystallographic binding and kinetic studies. The effects of *N*-acetyl- β -D-glucopyranosylamine (**6**) on the activation states of GP and GS in cell-free preparations and in isolated rat hepatocytes were reported [86]. In gel-filtered liver extracts **6** produced a rapid inactivation of GP_a into GP_b with a subsequent activation of GS. It was shown that the effects of 0.8 mM **6** on both enzymes were equipotent with 50 mM glucose. In isolated hepatocytes, **6** showed a marked enhancement of glucose effects for GP_a inactivation but failed to elicit activation of GS. The phosphorylation of **6** in rat hepatocytes was demonstrated and the formed 6-phosphate of **6** is responsible for the failure of **6** to activate GS.

Spiro-thiohydantoin **18** proved to be one of the most potent glucose-analogue inhibitors. In gel-filtered rat liver extracts **18** increased significantly the inactivation of GP and the sequential activation of GS. It was shown that 50 μ M of **18** was about as effective as 20 mM of glucose [87]. **18** was also effective when administered *in vivo* into the *v. portae* of Wistar rats (100 μ mol/kg body weight) resulting in a significant decrease in the activity of hepatic GP_a within 5 min [60, 88].

The most potent iminosugar inhibiting GP, isofagomine (**52**), was also able to inhibit glycogenolysis in cultured primary hepatocytes. Isofagomine inhibited both basal and glucagon-induced glucose production. In addition, 80 % of the glycogen content could be retained at the highest dose of isofagomine [79]. Furthermore, isofagomine at a concentration of 400 μM completely prevented norepinephrine-induced depletion of glycogen and the concomitant lactate production in cerebral cortical astrocytes [26].

Detailed studies describe the physiological data of DAB (**63**) [20]. Using cultured rat hepatocytes, DAB inhibited basal and glucagon-stimulated glucose production with IC_{50} values of 1-2 μM , and it is related to the prevention of glycogen breakdown, confirming that glycogenolysis was inhibited [24, 89]. No effects on glycogen synthesis were observed, demonstrating that glycogen recycling does not occur in cultured hepatocytes in the presence of DAB. Glucagon-induced glycogen degradation was inhibited by DAB in livers of diabetic *ob/ob* mice and lean, non-diabetic control mice as shown by using ^{13}C -NMR. Both the glycogen levels and the endpoint blood glucose levels were higher in mice intraperitoneally treated with glucagon and DAB [25] confirming the data obtained in cultured hepatocytes. It was also demonstrated that DAB inhibited glucagon-stimulated glycogenolysis and endogenous glucose production in overnight fasted dogs, without influencing the contribution of gluconeogenesis to glucose production [90].

Controversy exists regarding the contributions of glycogenolysis and gluconeogenesis to endogenous glucose production both in non-diabetic and diabetic situations, mainly due to technical difficulties in quantitation of gluconeogenesis [11]. To test the above possibility the effect of DAB on rates of gluconeogenesis, gluconeogenic deposition into glycogen, glycogen recycling was investigated in cultured hepatocytes, in perfused rat liver, and in fed or fasted rats by NMR methodology. These data suggest that no glycogen cycling occurs in the presence of DAB and this compound only inhibits the glycogenolytic pathway [91].

CONCLUSION

Inhibition of GP has proven a promising approach in modulating the action of this enzyme which is the main regulator of blood glucose levels. This offers a new concept for fighting against type 2 diabetes an epidemically expanding metabolic disease. There are several binding sites in GP lending themselves to be targeted by various effectors. The best inhibitors known to date bind either to the AMP site (Bay W1807 of Bayer and other dicarboxylic acid derivatives in Fig. 3) or to the new allosteric site (indole-carboxamide derivatives of Pfizer) with K_i or IC_{50} values in the low nanomolar range. Many glucose derivatives were shown to bind to the catalytic center of GP, and among them glucopyranosylidene-spiro-hydantoin **16** ($K_i = 3\text{--}4\ \mu\text{M}$) was the most efficient inhibitor. More recent efforts resulted in a large scale synthesis of glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin **18** ($K_i = 5\ \mu\text{M}$). Syntheses of „open” derivatives of hydantoins bearing large hydrophobic groups resulted in an order of magnitude better inhibitor *N*-(2-naphthoyl)-*N'*-(β -D-glucopyranosyl)urea (**35**) ($K_i = 0.4\ \mu\text{M}$) indicating that trials to find ligands to fit into the β -channel of GP can be a further aim of forthcoming synthetic works. Another synthetic goal can be the preparation of novel anomerically bifunctional glucose derivatives, that is also in keeping with predictions by computational methods. Furthermore, *N*-acyl-*N'*-(β -D-glucopyranosyl)ureas were shown to bind to the new allosteric site as well, thereby representing new leads for the design of inhibitors of this site. Iminosugars (isofagomine, azafagomine, noeuromycin, DAB with IC_{50} values in the low micromolar range) capable to mimic glycosylium ions form another group of glucose-like compounds which show strong binding properties to GP-s. Although present experience in modifying iminosugars with various substituents on the nitrogens is not encouraging, further trials to introduce

appendages similar those of the acylureas may be interesting. Physiological investigations performed with the glucose analogs have shown blood glucose lowering potential in animal experiments without any apparent indication of hypoglycemia. Because the inhibition of HLGP will also imply metabolic consequences, it is rather promising that these compounds will lead to the development of a novel active site inhibitor of GP as a monotherapy for type 2 diabetes or add-on therapy to existing treatments.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Hungarian Ministry of Health (Grant: ETT 030/2003), and the Hungarian Scientific Research Fund (Grants: OTKA T37210 to PG and TD, T46081 to LS) for supporting their research. ZsH thanks CMS Chemicals Ltd., Oxford, United Kingdom for financing her PhD Thesis with LS at the University of Debrecen.

ABBREVIATIONS

GP	=	Glycogen phosphorylase
GS	=	Glycogen synthase
GK	=	Glucokinase
G6Pase	=	Glucose 6-phosphatase
RMGP	=	Rabbit muscle GP
RLGP	=	Rat liver GP
HLGP	=	Human liver GP
PLGP	=	Pig liver GP
DAB	=	1,4-dideoxy-1,4-imino-arabinitol

REFERENCES

- [1] Moller, D. E. *Nature*, **2001**, 414, 821-827.
- [2] Zimmet, P.; Alberti, K. G. M. M.; Shaw, J. *Nature*, **2001**, 414, 782-861.
- [3] Hengesh, E. J. In *Principles of Medicinal Chemistry*, W. O. Foye; T. L. Lemke; D. A. Williams, eds.; Williams & Wilkins: Baltimore, **1995**, pp. 581-600.
- [4] Martin, J. L.; Veluraja, K.; Ross, K.; Johnson, L. N.; Fleet, G. W. J.; Ramsden, N. G.; Bruce, I.; Orchard, M. G.; Oikonomakos, N. G.; Papageorgiou, A. C.; Leonidas, D. D.; Tsitoura, H. S. *Biochemistry*, **1991**, 30, 10101-10116.
- [5] Cobb, J.; Dukes, I. In *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, J. A. Bristol, ed.; Academic Press: San Diego, **1998**; Vol. 33, pp. 213-222.
- [6] Perfetti, R.; Barnett, P. S.; Mathur, R.; Egan, J. M. *Diabetes/Metabolism Reviews*, **1998**, 14, 207-225.
- [7] Rose, M. L.; Paulik, M. A.; Lenhard, J. M. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, **1999**, 9, 1-14.
- [8] Zhang, B. B.; Moller, D. E. *Current Opinion in Chemical Biology*, **2000**, 4, 461-467.
- [9] Wagman, A. S.; Nuss, J. M. *Current Pharmaceutical Design*, **2001**, 7, 417-450.
- [10] Cohen, P. *Philosophical Transactions of the Royal Society, London, B*, **1999**, 354, 485-495.
- [11] Treadway, J. L.; Mendys, P.; Hoover, D. J. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, **2001**, 10, 439-454.
- [12] Saltiel, A. R.; Kahn, C. R. *Nature*, **2001**, 414, 799-806.
- [13] Staehr, P.; Hother-Nielsen, O.; Beck-Nielsen, H. *Diabetes Obesity & Metabolism*, **2002**, 4, 215-223.
- [14] Morral, N. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, **2003**, 14, 169-175.
- [15] Chu-Moyer, M. Y. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, **2000**, 10, 787-801.
- [16] McCarty, M. F. *Medical Hypotheses*, **2000**, 54, 483-487.
- [17] Oikonomakos, N. G.; Kontou, M.; Zographos, S. E.; Tsitoura, H. S.; Johnson, L. N.; Watson, K. A.; Mitchell, E. P.; Fleet, G. W. J.; Son, J. C.; Bichard, C. J. F.; Leonidas, D. D.; Acharya, K. R. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, **1994**, 185-192.
- [18] Watson, K. A.; Mitchell, E. P.; Johnson, L. N.; Son, J. C.; Bichard, C. J. F.; Orchard, M. G.; Fleet, G. W. J.; Oikonomakos, N. G.; Leonidas, D. D.; Kontou, M.; Papageorgiou, A. *Biochemistry*, **1994**, 33, 5745-5758.

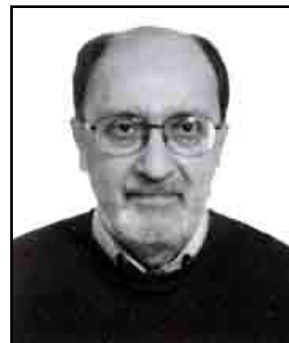
- [19] Watson, K. A.; Mitchell, E. P.; Johnson, L. N.; Cruciani, G.; Son, J. C.; Bichard, C. J. F.; Fleet, G. W. J.; Oikonomakos, N. G.; Kontou, M.; Zographos, S. E. *Acta Crystallographica*, **1995**, D51, 458-472.
- [20] McCormack, J. G.; Westergaard, N.; Kristiansen, M.; Brand, C. L.; Lau, J. *Current Pharmaceutical Design*, **2001**, 7, 1451-1474.
- [21] Oikonomakos, N. G. *Current Protein & Peptide Science*, **2002**, 3, 561-586.
- [22] Bollen, M.; Keppens, S.; Stalmans, W. *Biochemical Journal*, **1998**, 336, 19-31.
- [23] Radziuk, J.; Pye, S. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, **2001**, 17, 250-272.
- [24] Andersen, B.; Rassov, A.; Westergaard, N.; Lundgren, K. *Biochemical Journal*, **1999**, 342, 545-550.
- [25] Fosgerau, K.; Westergaard, N.; Quistorff, B.; Grunnet, N.; Kristiansen, M.; Lundgren, K. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2000**, 380, 274-284.
- [26] Waagepetersen, H. S.; Westergaard, N.; Schousboe, A. *Neurochemistry International*, **2000**, 36, 435-440.
- [27] Goldsmith, E. J.; Sprang, S. R.; Hamlin, R.; Xuong, N. H.; Fletterick, R. J. *Science*, **1989**, 245, 528-532.
- [28] Johnson, L. N. *The FASEB Journal*, **1992**, 6, 2274-2282.
- [29] Oikonomakos, N. G.; Skamnaki, V. T.; Tsitsanou, K. E.; Gavalas, N. G.; Johnson, L. N. *Structure*, **2000**, 8, 575-584.
- [30] Rath, V. L.; Ammirati, M.; LeMotte, P. K.; Fennell, K. F.; Mansour, M. N.; Danley, D. E.; Hynes, T. R.; Schulte, G. K.; Wasilko, D. J.; Pandit, J. *Molecular Cell*, **2000**, 6, 139-148.
- [31] Coats, W. S.; Browner, M. F.; Fletterick, R. J.; Newgard, C. B. *Journal of Biological Chemistry*, **1991**, 266, 16113-16119.
- [32] Rath, V. L.; Ammirati, M.; Danley, D. E.; Ekstrom, J. L.; Gibbs, E. M.; Hynes, T. R.; Mathiowetz, A. M.; McPherson, R. K.; Olson, T. V.; Treadway, J. L.; Hoover, D. J. *Chemistry & Biology*, **2000**, 7, 677-682.
- [33] Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G.; Tsitsanou, K. E.; Leonidas, D. D.; Chrysina, E. D.; Skamnaki, V. T.; Bischoff, H.; Goldmann, S.; Watson, K. A.; Johnson, L. N. *Structure*, **1997**, 5, 1413-1425.
- [34] Oikonomakos, N. G.; Tsitsanou, K. E.; Zographos, S. E.; Skamnaki, V. T.; Goldmann, S.; Bischoff, H. *Protein Science*, **1999**, 8, 1930-1945.
- [35] Oikonomakos, N. G.; Schnier, J. B.; Zographos, S. E.; Skamnaki, V. T.; Tsitsanou, K. E.; Johnson, L. N. *Journal of Biological Chemistry*, **2000**, 275, 34566-34573.
- [36] Lu, Z.; Bohn, J.; Bergeron, R.; Deng, Q.; Ellsworth, K. P.; Geissler, W. M.; Harris, G.; McCann, P. E.; McKeever, B.; Myers, R. W. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2003**, 13, 4125-4128.
- [37] Kristiansen, M.; Andersen, B.; Iversen, L. F.; Westergaard, N. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2004**, 47, 3537-3545.
- [38] Board, M.; Hadwen, M.; Johnson, L. N. *European Journal of Biochemistry*, **1995**, 228, 753-761.
- [39] Gregoriou, M.; Noble, M. E. M.; Watson, K. A.; Garman, E. F.; Krülle, T. M.; Fuente, C.; Fleet, G. W. J.; Oikonomakos, N. G.; Johnson, L. N. *Protein Science*, **1998**, 7, 915-927.
- [40] Somsák, L.; Kovács, L.; Tóth, M.; Ösz, E.; Szilágyi, L.; Györgydeák, Z.; Dinya, Z.; Docsa, T.; Tóth, B.; Gergely, P. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2001**, 44, 2843-2848.
- [41] Johnson, L. N.; Acharya, K. R.; Jordan, M. D.; McLaughlin, P. J. *Journal of Molecular Biology*, **1990**, 211, 645-661.
- [42] Mitchell, E. P.; Withers, S. G.; Ermert, P.; Vasella, A. T.; Garman, E. F.; Oikonomakos, N. G.; Johnson, L. N. *Biochemistry*, **1996**, 35, 7341-7355.
- [43] Bichard, C. J. F.; Mitchell, E. P.; Wormald, M. R.; Watson, K. A.; Johnson, L. N.; Zographos, S. E.; Koutra, D. D.; Oikonomakos, N. G.; Fleet, G. W. J. *Tetrahedron Letters*, **1995**, 36, 2145-2148.
- [44] Krülle, T. M.; Fuente, C.; Watson, K. A.; Gregoriou, M.; Johnson, L. N.; Tsitsanou, K. E.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G.; Fleet, G. W. J. *Synlett*, **1997**, 211-213.
- [45] Ösz, E.; Somsák, L.; Szilágyi, L.; Kovács, L.; Docsa, T.; Tóth, B.; Gergely, P. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **1999**, 9, 1385-1390.
- [46] Krülle, T. M.; Watson, K. A.; Gregoriou, M.; Johnson, L. N.; Crook, S.; Watkin, D. J.; Griffith, R. C.; Nash, R. J.; Tsitsanou, K. E.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G.; Fleet, G. W. J. *Tetrahedron Letters*, **1995**, 36, 8291-8294.
- [47] So, S.-S.; Karplus, M. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1997**, 40, 4360-4371.
- [48] Pastor, M.; Cruciani, G.; Clementi, S. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1997**, 40, 1455-1464.
- [49] Cruciani, G.; Clementi, S.; Pastor, M. *Perspectives in Drug Discovery and Design*, **1998**, 12/13/14, 71-86.
- [50] Venkatarangan, P.; Hopfinger, A. J. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1999**, 42, 2169-2179.
- [51] Venkatarangan, P.; Hopfinger, A. J. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, **1999**, 39, 1141-1150.
- [52] So, S.-S.; Karplus, M. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **1999**, 13, 243-258.
- [53] Marchand-Geneste, N.; Watson, K. A.; Alsberg, B. K.; King, R. D. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2002**, 45, 399-409.
- [54] Hopfinger, A. J.; Reaka, A.; Venkatarangan, P.; Duca, J. S.; Wang, S. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, **1999**, 39, 1151-1160.
- [55] So, S.-S.; Karplus, M. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **2001**, 15, 613-647.

- [56] Fuente, C.; Krülle, T. M.; Watson, K. A.; Gregoriou, M.; Johnson, L. N.; Tsitsanou, K. E.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G.; Fleet, G. W. J. *Synlett*, **1997**, 485-487.
- [57] Ösz, E.; Sós, E.; Somsák, L.; Szilágyi, L.; Dinya, Z. *Tetrahedron*, **1997**, 53, 5813-5824.
- [58] Oikonomakos, N. G.; Skamnaki, V. T.; Ösz, E.; Szilágyi, L.; Somsák, L.; Docsa, T.; Tóth, B.; Gergely, P. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2002**, 10, 261-268.
- [59] Somsák, L.; Nagy, V. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2000**, 11, 1719-1727. Corrigendum 2247.
- [60] Somsák, L.; Nagy, V.; Docsa, T.; Tóth, B.; Gergely, P. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2000**, 11, 405-408.
- [61] Agasimundin, Y. S.; Mumper, M. W.; Hosmane, R. S. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **1998**, 6, 911-923.
- [62] Sprang, S. R.; Goldsmith, E. J.; Fletterick, R. J.; Withers, S. G.; Madsen, N. B. *Biochemistry*, **1982**, 21, 5364-5371.
- [63] Street, I. P.; Armstrong, C. R.; Withers, S. G. *Biochemistry*, **1986**, 25, 6021-6027.
- [64] Nhien, A. N. V.; Villa, P.; Ronco, G.; Postel, D. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **2001**, 53, 939-943.
- [65] Postel, D.; Nhien, A. N. V.; Villa, P.; Ronco, G. *Tetrahedron Letters*, **2001**, 42, 1499-1502.
- [66] Docsa, T.; Gergely, P.; Somsák, L. *unpublished results*, **2004**.
- [67] Kovács, L.; Nagy, V.; Hadady, Z.; Illyés, T. Z.; Szilágyi, L.; Praly, J.-P.; Docsa, T.; Tóth, B.; Gergely, P. *unpublished results*.
- [69] Györgydeák, Z.; Hadady, Z.; Felföldi, N.; Krakomperger, A.; Nagy, V.; Tóth, M.; Brunyánszky, A.; Docsa, T.; Gergely, P.; Somsák, L. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2004**, 12, 4861-4870.
- [70] Oikonomakos, N. G.; Kosmopolou, M.; Zographos, S. E.; Leonidas, D. D.; Somsák, L.; Nagy, V.; Praly, J.-P.; Docsa, T.; Tóth, B.; Gergely, P. *European Journal of Biochemistry*, **2002**, 269, 1684-1696.
- [71] Oikonomakos, N. G. *personal communication*.
- [72] Aich, U.; Lakshmanan, T.; Varghese, B.; Loganathan, D. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, **2003**, 22, 891-901.
- [73] Chrysina, E. D.; Oikonomakos, N. G.; Zographos, S. E.; Kosmopolou, M. N.; Bischler, N.; Leonidas, D. D.; Kovács, L.; Docsa, T.; Gergely, P.; Somsák, L. *Biocatalysis and Biotransformation*, **2003**, 21, 233-242.
- [74] Czifrák, K.; Kovács, L.; Kövér, K. E.; Somsák, L. *manuscript in preparation*.
- [75] Hadady, Z.; Tóth, M.; Somsák, L. *Arkivoc*, **2004**, 140-149.
- [76] Farkas, I.; Szabó, I. F.; Bognár, R. *Carbohydrate Research*, **1977**, 56, 404-406.
- [77] Szabó, I. F.; Farkas, I.; Somsák, L.; Bognár, R. *Acta Chimica Academiae Scientiarum Hungaricae*, **1981**, 106, 61-69.
- [78] Lillelund, V. H.; Jensen, H. H.; Liang, X.; Bols, M. *Chemical Reviews*, **2002**, 102, 515-553.
- [79] Jakobsen, P.; Lundbeck, J. M.; Kristiansen, M.; Breinholt, J.; Demuth, H.; Pawlas, J.; Torres Candela, M. P.; Andersen, B.; Westergaard, N.; Lundgren, K.; Asano, N. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2001**, 9, 733-744.
- [80] Lohse, A.; Jensen, K. B.; Lundgren, K.; Bols, M. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **1999**, 7, 1965-1971.
- [81] Liu, H.; Liang, X.; Sohoel, H.; Bülow, A.; Bols, M. *Journal of the American Chemical Society*, **2001**, 123, 5116-5117.
- [82] Heightman, T. D.; Vasella, A.; Tsitsanou, K. E.; Zographos, S. E.; Skamnaki, V. T.; Oikonomakos, N. G. *Helvetica Chimica Acta*, **1998**, 81, 853-864.
- [83] Krülle, T. M.; Fuente, C.; Pickering, L.; Aplin, R. T.; Tsitsanou, K. E.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G.; Nash, R. J.; Griffiths, R. C.; Fleet, G. W. J. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1997**, 8, 3807-3820.
- [84] Tsitsanou, K. E.; Oikonomakos, N. G.; Zographos, S. E.; Skamnaki, V. T.; Gregoriou, M.; Watson, K. A.; Johnson, L. N.; Fleet, G. W. J. *Protein Science*, **1999**, 8, 741-749.
- [85] Pinotsis, N.; Leonidas, D. D.; Chrysina, E. D.; Oikonomakos, N. G.; Mavridis, I. M. *Protein Science*, **2003**, 12, 1914-1924.
- [86] Board, M.; Bollen, M.; Stalmans, W.; Kim, Y.; Fleet, G. W. J.; Johnson, L. N. *Biochemical Journal*, **1995**, 311, 845-852.
- [87] Docsa, T.; Tóth, B.; Somsák, L.; Gergely, P. In *Protein Modules in Cellular Signalling*, L. Heilmeyer; P. Friedrich, eds.; IOS Press: Amsterdam, **2001**, pp. 142-149.
- [88] Docsa, T.; Tar, K.; Tóth, B.; Somsák, L.; Gergely, P. *Journal of Physiology - London*, **2000**, 526 Suppl., 92P.
- [89] Andersen, B.; Fosgerau, K.; Kristiansen, M.; Lundgren, K.; Westergaard, N. *Diabetes*, **1999**, 48, A447.
- [90] Fosgerau, K.; Mittelman, S. D.; Sunehag, A.; Dea, M. K.; Lundgren, K.; Bergman, R. N. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, **2001**, 281, E375-E383.
- [91] Fosgerau, K.; Breinholt, J.; McCormack, J. G.; Westergaard, N. *Journal of Biological Chemistry*, **2002**, 277, 28648-28655.

Glucose Analog Inhibitors of Glycogen Phosphorylases as Potential Antidiabetic Agents: Recent Developments

László Somsák^{a,*}, Veronika Nagy^a, Zsuzsa Hadady^a, Tibor Docsa^b and Pál Gergely^b

^aDepartment of Organic Chemistry, Faculty of Science, and ^bDepartment of Medical Chemistry, Medical and Health Science Center, University of Debrecen, ^aEgyetem tér 1, POB 20, H-4010 Debrecen, ^bBem tér 18/B, H-4026 Debrecen, Hungary



Abstract: Diabetes is among the largest contributors to global mortality through its long term complications. The worldwide epidemic of type 2 diabetes has been stimulating the quest for new concepts and targets for the treatment of this incurable disease. A new target is glycogen phosphorylase (GP), the main regulatory enzyme in the liver responsible for the control of blood glucose levels. One of several approaches to influence the action of GP is the use of glucose derivatives as active site inhibitors. This field of research commenced 10-15 years ago and, due to joint efforts in computer aided molecular design, organic synthesis, protein crystallography, and biological assays, resulted in glucopyranosylidene-spiro-hydantoin **16** ($K_i = 3-4 \mu\text{M}$) as the most efficient glucose analog inhibitor of GP of that time. The present paper surveys the recent developments of this field achieved mainly in the last five years: the synthesis and evaluation of glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin **18** ($K_i = 5 \mu\text{M}$) which has proven equipotent with **16**, and is available in gram amounts; furanosylidene- and xylopyranosylidene-spiro-(thio)hydantoins whose ineffectiveness ($K_i > 10 \text{ mM}$) confirmed the high specificity of the catalytic site of GP towards the D-glucopyranosyl unit; „open” hydantoins like methyl *N*-(1-carboxamido-D-glucopyranosyl)carbamate **37** ($K_i = 16 \mu\text{M}$) and *N*-acyl-*N'*-(β-D-glucopyranosyl)ureas among them the to date best glucose analog inhibitor *N*-(2-naphthoyl)-*N'*-(β-D-glucopyranosyl)urea (**35**, $K_i = 0.4 \mu\text{M}$) which can also bind to the so-called new allosteric site of GP; C-(β-D-glucopyranosyl)heterocycles (tetrazole, 1,3,4-oxadiazoles, benzimidazole ($K_i = 11 \mu\text{M}$), and benzothiazole). Iminosugars like isofagomine (**45**, $\text{IC}_{50} = 0.7 \mu\text{M}$), noeuromycin (**53**, $\text{IC}_{50} = 4 \mu\text{M}$), and azafagomine (**54**, $\text{IC}_{50} = 13.5 \mu\text{M}$) also bind strongly to the active site of GP, however, substitution on the nitrogens makes the binding weaker. The natural product five-membered iminosugar DAB (**56**) exhibited $\text{IC}_{50} \sim 0.4-0.5 \mu\text{M}$. Azoloperhydropyridines which can be regarded iminosugar-annelated heterocycles show moderate inhibition of GP: nojiritetrazole **12** ($K_i = 53 \mu\text{M}$) is the best inhibitor and fewer nitrogens in the five-membered ring weakens the binding. Physiological investigations have been carried out with *N*-acetyl-β-D-glucopyranosylamine **6**, spiro-thiohydantoin **18**, isofagomine **45**, and DAB **56** to underline the potential use of these compounds in the treatment of type 2 diabetes. Computational methods suggest to synthesize further anomeric bifunctional glucose derivatives which may be good inhibitors of GP.

INTRODUCTION – MOTIVATION OF THE SEARCH FOR GP INHIBITORS

The end of the 20th century has seen a dramatic increase in the number of patients diagnosed with diabetes worldwide. This disease, characterized by chronically elevated blood glucose levels, afflicts approximately 6 % of the adult population in Western society [1]. Most striking is the predicted number of diabetics 220 million for the year 2010 indicating a 46 % enhancement in the world population during a decade [2]. Especially due to its long term complications like retinopathy, neuropathy, and nephropathy, but first of all cardiovascular diseases, diabetes has become one of the largest contributors to mortality.

Diabetes is divided into two main forms: type 1 is characterized by a complete insulin deficiency, and can be

treated by exogenous insulin; type 2 diabetics exhibit abnormal insulin secretion and/or insulin resistance, and their blood glucose levels are controlled mainly by diet, exercise, and oral hypoglycemic agents [3]. While the ratio of type 1 and 2 diabetes was estimated to be $\sim 25 : 75$ in the early nineties [4], the frequency of the latter has gained to more than 90 % for today [1, 2]. The epidemic of type 2 diabetes is in conjunction with genetic susceptibility and in particular with behavioral factors such as sedentary lifestyle, overly rich nutrition, and obesity.

In the absence of a firm understanding of the molecular pathomechanism of the disease several types of oral hypoglycemic drugs (sulfonylureas, biguanides, thiazolidinediones, acarbose) are in use as symptomatic treatments for type 2 diabetes [5-8]. These treatments aim to more or less approach the normal physiological regulation of blood glucose levels, however, have several adverse side effects as well as the danger of causing hypoglycemia, and what's more are inadequate for 30-40 % of the patients [9]. Therefore, other therapeutic concepts (among others novel insulin secretagogues, insulin sensitizers, glucagon receptor

*Address correspondence to this author at the Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, University of Debrecen, POB 20, H-4010 Debrecen, Hungary; Tel: +36-52-512-900, 316-666, 489-100 Ext. 2348 or 2453; Fax: +36-52-453-836; E-mail: somsak@tigris.klte.hu

antagonists, inhibitors of hepatic glucose output, combination therapies) are intensively investigated [1, 10-13], as it turns out also from the patent literature [7, 14], and a wholly nutritional therapy has been suggested as well [15].

The aim of the present article is to highlight a specific area of attempts to reduce glucose production in the liver: inhibition of glycogen phosphorylase enzyme by glucose derivatives. This field of research was started at the beginning of the nineties, and was summarized several times [16-18] or appeared as part of comprehensive reviews [11, 19, 20]. In this paper we survey the most important moments in the development of the topic, and focus on the results obtained in the last five years.

GLYCOGEN METABOLISM

The liver is the predominant source of blood glucose. Numerous studies have shown that hepatic glucose production is increased in type 2 diabetes in the post-absorptive state, and it is directly correlated to fasting hyperglycemia [1, 11, 13, 21, 22]. Hepatic glucose is produced from two pathways: glycogenolysis (the breakdown of glycogen) and gluconeogenesis (*de novo* synthesis of glucose). Glycogenolysis may account for more than 70 % of the hepatic glucose production, furthermore, a substantial portion of glucose formed by gluconeogenesis is cycled through the glycogen pool prior to efflux from the liver cells (for references, see [23]).

Hepatic glucose output is regulated by a complex system of enzymes. The main regulatory enzyme of this system is glycogen phosphorylase, and only the phosphorylated enzyme (GP_a) has significant activity. GP_a releases glucose 1-phosphate from glycogen as shown in Fig. (1) suggesting an important role for glycogenolysis in hepatic glucose production. Gluconeogenesis from lactate and other precursor molecules can also contribute to the elevated blood glucose levels, however, it was clearly demonstrated that glucose arising from gluconeogenesis has cycled through glycogen. Therefore the inhibition of hepatic GP could suppress

glucose production arising from both glycogenolysis and gluconeogenesis [11, 19, 20].

There are three mammalian GP isoenzymes termed as “muscle”, “brain”, and “liver” according to the tissue in which they are preferentially expressed. All encoded by different genes located on human chromosomes 11, 20, and 14, respectively (for details see [19]). GP-s are dimers of two identical subunits (Mr about 97500 Da). All isoenzymes can be converted from the inactive GP_b form into the active GP_a form through the phosphorylation of Ser-14 by phosphorylase kinase. In addition, muscle and brain specific GP-s are also allosteric enzymes: the *b* form can be found predominantly in T state and the *a* form in R state, respectively. Allosteric activators (e.g. AMP) promote degradation of glycogen, while allosteric inhibitors (e.g. glucose, glucose 6-phosphate, ATP) retard degradation by altering the equilibrium between a less active T state and a more active R state (for references see [20]). The liver specific GP, on the other hand, is much more tightly controlled by phosphorylation than by allosteric regulation. Allosteric effectors such as AMP and glucose 6-phosphate have little effect on the activity of the hepatic isoenzyme [21].

It is known that the activity of liver GS is also controlled by reversible phosphorylation of multiple serine residues. Dephosphorylated form of GS is the catalytically active (GS_a) form. Phosphorylation is associated with an inactivation of GS, conversion to the *b* form. The dephosphorylation of GP and GS is interrelated and catalyzed by the glycogen-associated protein phosphatase-1. GP_a, but not GP_b, is a potent inhibitor of the phosphatase action on GS and it is only when GP_a has been dephosphorylated that the phosphatase is free to activate GS, the rate limiting enzyme of glycogen synthesis [21].

INHIBITORS OF GP

GP isoenzymes of muscle and liver origin are well known and characterized (for references see [24]), however, much less information is available about the brain specific

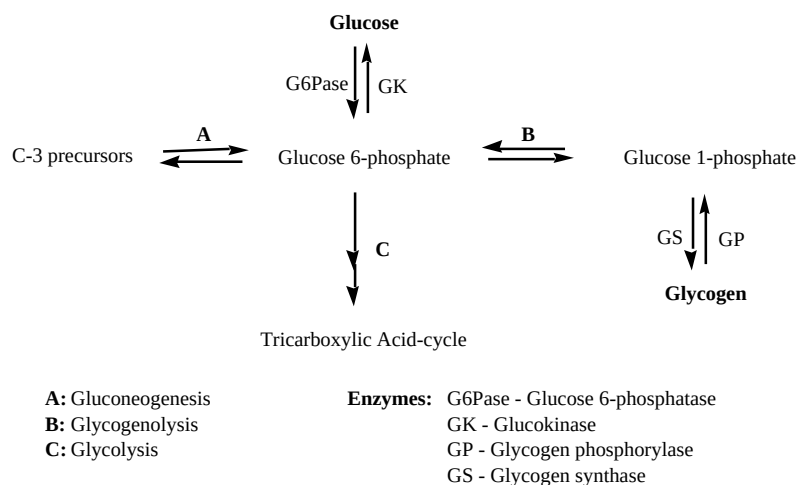


Fig. (1). Overview of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis.

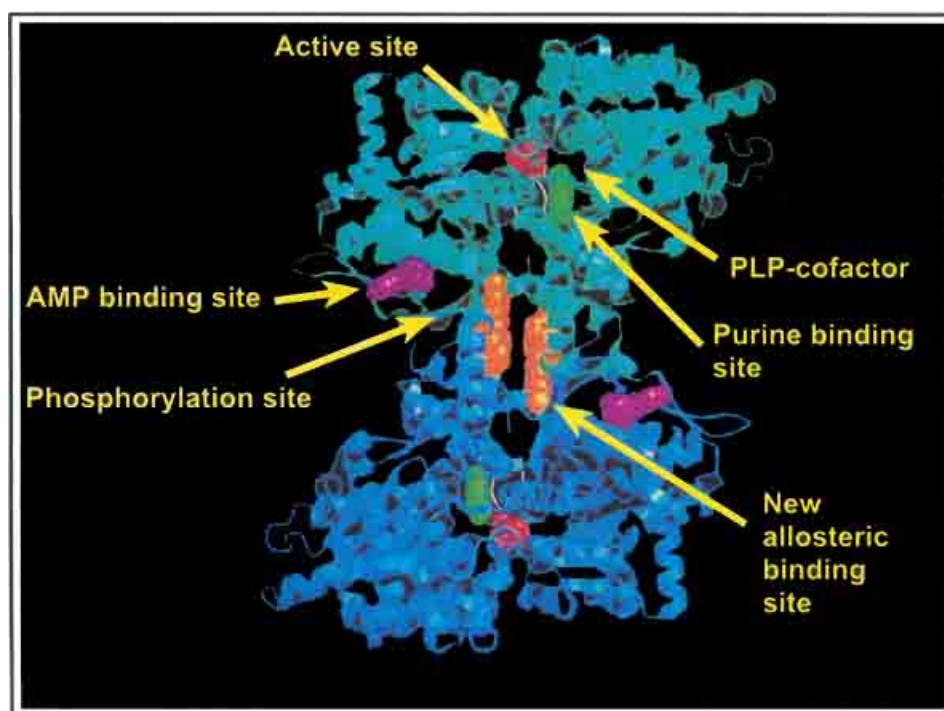


Fig. (2). X-Ray structure of RMGPb showing the binding sites of effectors. (Presentation by courtesy of Prof. Dr. Nikos G. Oikonomakos).

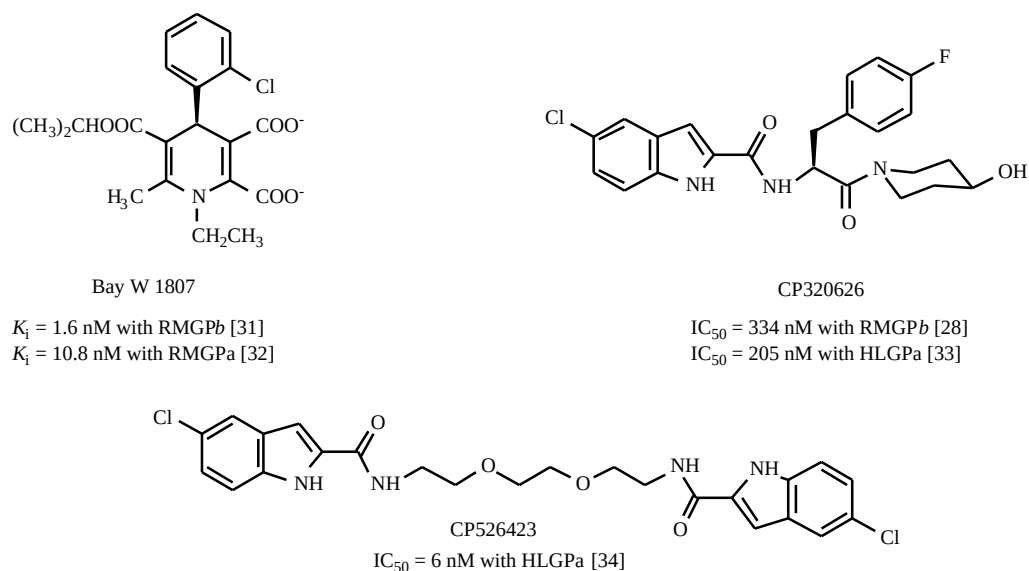


Fig. (3). The most efficient non-glucose analog inhibitors of GP-s.

enzyme [25]. Crystal structures of rabbit muscle glycogen phosphorylase (RMGP) *a* [26] and *b* [27, 28] and human liver glycogen phosphorylase (HLGP) *a* and *b* [29] are also known facilitating the identification of binding modes of effector molecules. Because of accessibility reasons the majority of investigations have been carried out with RMGP enzymes, nevertheless, cloning and expression of HLGP [30] has paved the way for investigations with the real target. Besides the catalytic center there are three sites in RMGP (Fig. 2), AMP- (or nucleotide or allosteric); purin- (or

nucleoside or inhibitor); and a new allosteric- (or indole) binding site, which can accommodate small molecules to induce stabilization of the T state of the enzyme. HLGP has the same binding sites, however, the enzyme is less sensitive to effectors of the AMP site [29]. The to date known best inhibitors of GP-s (Fig. 3) bind either to the AMP site (Bay W1807 of Bayer, (-)(S)-3-isopropyl 4-(2-chlorophenyl)-1,4-dihydro-1-ethyl-2-methyl-pyridine-3,5,6-tricarboxylate), or to the new allosteric site (indole-carboxamide derivatives of Pfizer, e. g. CP320626 and CP526423).

Under physiological conditions glucose acts as a regulator of GP by stabilizing the less active T state of the enzyme through binding to the catalytic center [35]. Although this binding is weak (for K_i values of α - (**1**) and β -D-glucose (**2**) see Fig. 4) it has raised the possibility to search for glucose derivatives with much higher affinity to the active site. Among the early glucose analogs glucosides (**3-5**), *N*-acyl- β -D-glucopyranosylamines (**6, 7, 9**), *N*-(β -D-glucopyranosyl)urea (**8**), thioglucosides (**10**), a 1-deoxy-D-glucro-heptulopyranose 2-phosphate (**11**), nojiritetrazole (**12**), 2,6-anhydro-heptonamides (**13, 14**), and glucopyranosyl-

idene-spiro-heterocycles (**15-17**) were investigated whose representatives with the highest affinity to the enzyme are collected in Fig. (4). The strongest inhibition was achieved by glucopyranosylidene-spiro-hydantoin **16**. Crystallographic studies on the RMGPb-**16** complex revealed the structural features responsible for the tight binding to the catalytic center: i) a hydrogen bond between the N(7)-H of the hydantoin and the main chain oxygen of His377 which also facilitates an optimal hydrogen bond between the CH₂OH moiety in the glucose and the side chain of His377; ii) the rigid planar spirohydantoin group undergoing little loss of

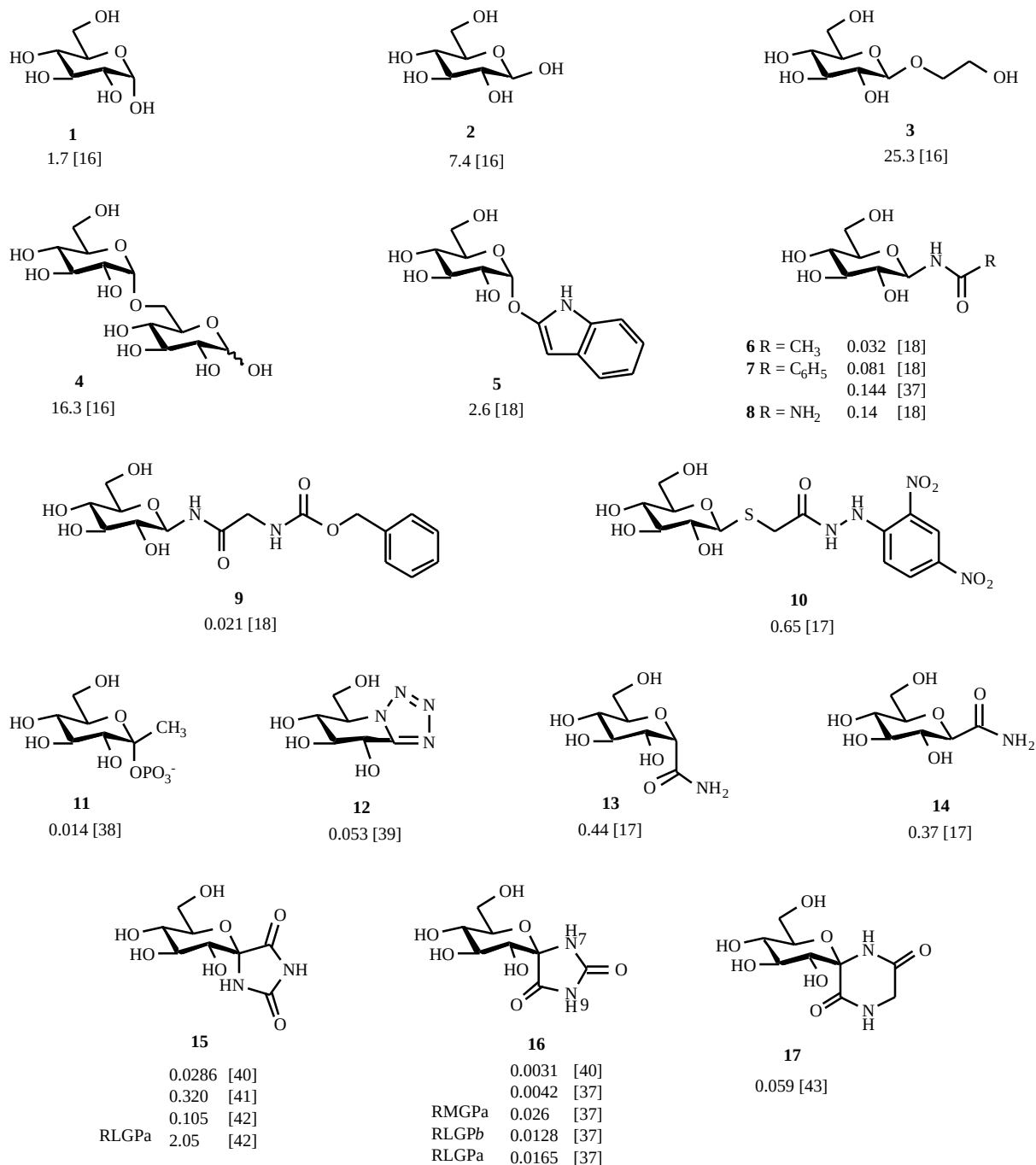


Fig. (4). Early glucose analog inhibitors of GP-s: K_i values [mM] measured with RMGPb unless otherwise stated.

conformational energy on binding; iii) the hydrogen bonding capability of the hydantoin polar groups exploiting existing water structure and creating additional water network to the protein, thereby providing additional enthalpic contributions [36]. Although targeted, none of these inhibitors formed favorable contacts either with the α - or β -channel next to the catalytic center of the enzyme.

Based on the structure of these inhibitors computational methods were used to design and evaluate new structures as potential inhibitors of GP. Given the large number of kinetically characterized compounds for which the binding modes were also discovered by X-ray crystallography several sets of glucose analog inhibitors were used for developing, testing, and training computational chemistry methodologies [44-50]. These methods were also used to suggest new inhibitory structures with estimated inhibitor constants. A 4D-QSAR analysis (based on a training set of 47 glucose analogs with a range of $K_i = 0.016$ -53.1 mM) of a virtual library of 225 compounds, where the anomeric substituents were systematically changed as shown in Table 1, uncovered several compounds with a predicted binding stronger than the best member (**37**, see also Fig. 6) of the training set (Entries 1-10 in Table 1) [51]. In a different approach a multiple screening method was based on compounds **1**, **16**, and **37** as design templates: some of the best 25 computed structures are shown in Entries 11-20 in Table 1 [52]. Interestingly, none of these was predicted to show higher affinity to the enzyme than the templates. To the best of our knowledge these computed structures have not yet been synthesized.

RECENT SYNTHESSES AND EVALUATION OF GLUCOSE ANALOGS AS INHIBITORS OF GP

Derivatives of D-glucose and related monosaccharides

The preparative methods used for the synthesis of spiro-hydantoin **16** [40, 41, 53] were stereochemically not efficient enough because the epimeric **15** was the major product. A synthetic study on the formation of glycopyranosylidene-spiro-hydantoins and -thiohydantoins in the reactions of C-(1-bromo-1-deoxy-D-galacto- and -D-arabinopyranosyl) formamides with cyanate and thiocyanate ions revealed that the former gave spiro-hydantoins with retained anomeric configuration as the major product while the latter yielded spiro-thiohydantoins of inverted anomeric configuration exclusively [54]. This method was applied to the D-*gluco* [37, 42] and D-*xylo* [37] configured formamides as well with the same stereochemical result to give compounds **18**, **19**, and **20**, respectively (Fig. 5). A comparison of the inhibitor constants determined with RMGP α and β as well as RLGP α and β enzymes demonstrates that **16** and **18** are equipotent inhibitors. An X-ray crystallographic investigation revealed that **18** binds to the enzyme in the same way as **16** does [55]. The absence of the CH₂OH side chain of the sugar ring as in **19** and **20** resulted in a practically complete loss of the inhibition even in the presence of the beneficial spiro-(thio)hydantoin moiety. Further improvements in the preparation of **18** made this inhibitor available in gram amounts [56] which facilitated other biological investiga-

tions to be carried out [57]. Substitution of N(9) in the spiro-hydantoin as shown in **21-24** brought about no improvement of the inhibition [53]. Modification of the sugar ring to a furanoid structure as in **25** and **26** led to very weak binding [58] in accordance with early observations with epimers and deoxy derivatives of D-glucose [59, 60]. The findings with **19**, **20**, **25**, and **26** underline and confirm the high specificity of the GP active site towards a fully OH-substituted hexopyranoid sugar moiety of D-*gluco* configuration. Spiro-annellated hydantoins were prepared at the C-3 carbon of D-allopyranose and D-ribopyranose in order to evaluate their GP inhibiting potency, however, no kinetic data have yet been published [61, 62].

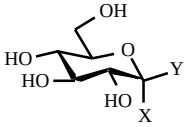
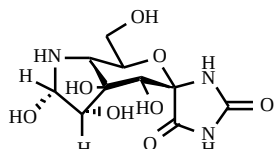
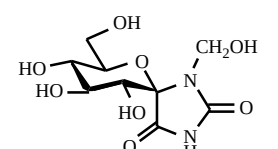
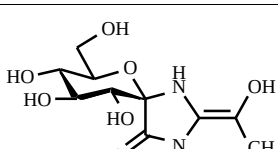
Compounds exhibiting structural elements of the hydantoin moiety like **6**, **13**, and **14** in Fig. (4) can also bind to GP-s. Owing to a new synthetic protocol [63] it has become possible to prepare and investigate anomeric pairs of *N*-trifluoroacetyl-D-glucopyranosylamines **27** and **31** (Fig. 6). As compared to **6** the presence of the CF₃ group in **27** significantly decreased the inhibition, and anomer **31** had no effect at all [37]. This finding suggests the importance of an *N*-acyl- β -D-glucopyranosylamine structural element in keeping with the influence of the configuration of the spiro carbon in hydantoins **15** and **16**. A hydrophilic amide side chain [63] in **28** and **29** caused weaker inhibition [64], but introduction of a naphthyl group as in **30** resulted in a rather good inhibitor [64]. This suggests to synthesize and test similar compounds with long aliphatic and otherwise hydrophobic side chains that remains to be investigated.

N-Acyl-*N'*- β -D-glucopyranosyl urea derivatives (like **32-35**) can be regarded as "open" hydantoins. While the *N*-acetylated compound **32** proved a weaker inhibitor than urea **8**, increasing the hydrophobicity of the acyl side chain makes the binding stronger [65] (**33-35**). The 2-naphthoyl urea **35** is to date the best glucose analog inhibitor of RMGP β [64]. Placing the hydrophobic moiety farther from the sugar makes the binding stronger by more than one order of magnitude (compare pairs **7-33**, and **30-35**), although this distance must have an optimum, since **36** is a weak inhibitor. A comparison with compound **9** in Fig. (4) might indicate that the NH(CO)NH(CO) substructure must have significance as well. These findings suggest that appropriately positioned large apolar groups can fit into the β -channel next to the active site of the enzyme.

A very interesting peculiarity of some of these ureas is their ability to bind at the new allosteric site as well. This property has been demonstrated for the first time with the benzoyl urea **33** [65], however, **35** and even amide **30** can also be detected by X-ray crystallography at that binding site [66]. Thus, new lead structures have been found to explore the properties of the new allosteric binding site.

Another way of "opening" the hydantoin ring is represented by compound **37**. Although there has not yet been a synthetic counterpart of **37** in the *N*-acyl-glycosylamine series, a comparison with **6** shows that the presence of the carboxamido group in the α -position may be beneficial for the binding. Another comparison with **13** (Fig. 4) indicates a more than one order of magnitude stronger inhibition again

Table 1. Virtual Library of Glucose Derivatives Designed by Computational Chemical Methods as Possible Inhibitors of GP

	Substituents (either X or Y) investigated in the 4D-QSAR analysis: H, NH(C=O)CH ₃ , CONHCH ₃ , Cl, CH ₃ , COCH ₂ OCH ₃ , CH ₂ (C=O)CH ₃ , NHCH ₃ , CH ₂ NHCH ₃ , CH ₂ OCH ₃ , CH ₂ (C=O)CH ₂ OH, NO ₂ , NH(C=O)NH ₂ , SO ₂ NH ₂ , SH		
	Best results obtained with the 4D-QSAR analysis [51]		
Entry	X	Y	predicted K _i [mM]
1.	SO ₂ NH ₂	NH(C=O)CH ₃	0.00059
2.	CH ₂ NHCH ₃	NH(C=O)CH ₃	0.0015
3.	CONHCH ₃	NH(C=O)CH ₃	0.0017
4.	CH ₂ (C=O)CH ₂ OH	CH ₃	0.0022
5.	CH ₃	NH(C=O)NH ₂	0.0041
6.	SH	NH(C=O)NH ₂	0.0050
7.	CONHCH ₃	CONHCH ₃	0.0056
8.	NO ₂	NH(C=O)NH ₂	0.0068
9.	NH(C=O)CH ₃	NH(C=O)CH ₃	0.0072
10.	NHCH ₃	NH(C=O)CH ₃	0.0076
Best ligand (37) in the 4D-QSAR training set	CONH ₂	NH(C=O)OCH ₃	0.0160*
	Modifying groups used in the generation of new structures from 1 , 16 , and 37 for the multiple screening analysis (selection from 31 groups): CH ₃ COO ⁻ , CH ₃ COOH, CH ₃ CONH ₂ , C ₆ H ₆ , C ₆ H ₁₂ , CH ₃ NH ₂ , CH ₃ NO ₂ , CH ₃ CN, CH ₃ OH, CH ₃ SH, CH ₃ NHNH ₂ , CH ₃ NHOH, CH ₃ SCF ₃ , CH ₃ SOCH ₃ , C ₆ H ₅ OH		
	Selected results obtained with the multiple screening method [52]		
11.	CONH ₂	NH(C=O)NHOH	0.0288
12.	CONH ₂	NH(C=O)SCN	0.0355
13.	CONH ₂	NH(C=O)CH ₂ F	0.0501
14.	CONH ₂	NH(C=O)NO	0.0550
15.			0.0646
16.			0.0813
17.			0.170
18.	H	NH(C=O)CH ₂ Br	0.174
19.	Cl	NH(C=O)CH ₃	0.219
20.	CN	NH(C=O)CH ₃	0.363

*Experimental value [41].

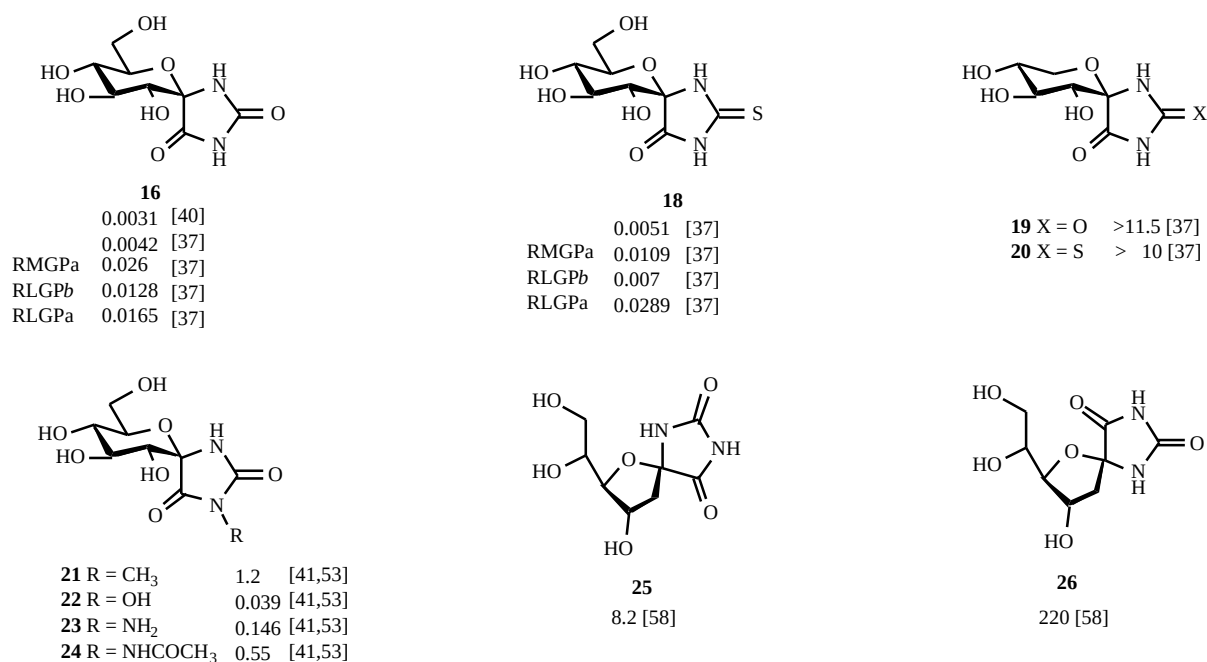


Fig. (5). Glycosylidene-spiro-hydantoin and -thiohydantoin investigated as GP inhibitors: K_i [mM] values measured with RMGP_b unless otherwise stated.

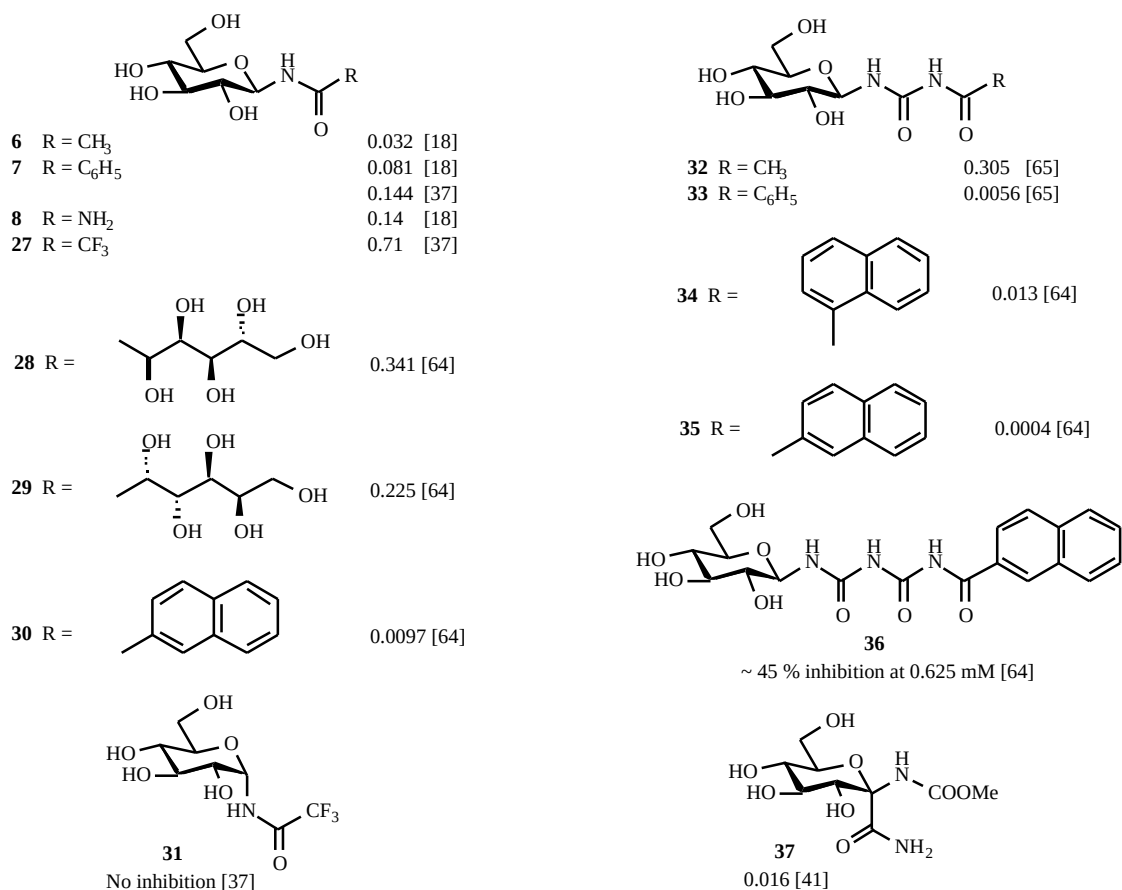


Fig. (6). *N*-(β-D-glucopyranosyl)amides, *N*-acyl-*N'*-(β-D-glucopyranosyl)ureas and related compounds investigated as GP inhibitors: K_i [mM] values measured with RMGP_b.

emphasizing the importance of the *N*-acyl- β -D-glucopyranosylamine structural element. These observations strongly suggest to synthesize and test further anomerically bifunctional glucose derivatives (see also Table 1 for computationally predicted structures).

Hydroxy-amide **38** (Fig. 7) can be regarded as a hybrid of α -D-glucose (**1**) and 2,6-anhydro-heptonamide **14**, however, the bifunctional anomeric center brought about a significant decrease in the inhibition in comparison to both **1** and **14** [37]. The carboxamido-glucoside **39** of opposite anomeric configuration proved also rather ineffective [64].

C-(β -D-Glucopyranosyl)heterocycles **38-42** (Fig. 8) were prepared in part by adapting published synthetic methods ([67] for **38** and **42**, [68] for **39** and **40**, [64] for **41**). Tetrazole **38** of slightly acidic character was not inhibitory, oxadiazole **39** and benzothiazole **42** showed moderate binding, while imidazole **41** proved to be an inhibitor in the low micromolar range. The possible formation of a H-bond to the enzyme by the slightly acidic NH of the imidazole ring might explain the difference between **41** and **42**. The presence of a trifluoromethyl group in **40** made the binding weaker as compared to **39** (see also **6** and **27** in Fig. 6). Increasing the distance between the sugar and the heterocycle by sulfur bridges resulted in much worse

inhibitors. The lack of inhibition by **43** and the weak binding of **44** may be due to an unfavorable position of the hydrophobic moieties and the apolar character of the linking sulfur atoms.

Iminosugar derivatives

The phosphorolysis of glycogen catalyzed by GP-s was postulated to proceed through a glycosyl cation like transition state [38], therefore, compounds known to be mimics of glycosylium ions [69] might have the potential to inhibit these enzymes. While classic iminosugar glycosidase inhibitors like nojirimycin exhibit poor effects with GP (see references cited in [38]), isofagomine (**45**, Fig. 9) showed a rather strong binding. However, this could not be improved by introducing substituents at the nitrogen as illustrated by some of the best inhibitors of these series (**46-52**) [70]. Similar observations were made with azafagomine (**54**) and its substituted derivatives obtained as constituents of a combinatorial library of glycosidase inhibitors: substitution at the nitrogen resulted in a weaker inhibition as shown by **55** being the best β -glucosidase inhibitor in the library [71]. Another iminosugar derivative, noeumycin [72] (**53**) binds also to the catalytic center [20], however, its affinity seems to be lower as compared to that of isofagomine **45**, in spite



Fig. (7). D-Gluco-heptulosonamide derivatives as GP inhibitors tested with RMGPb.

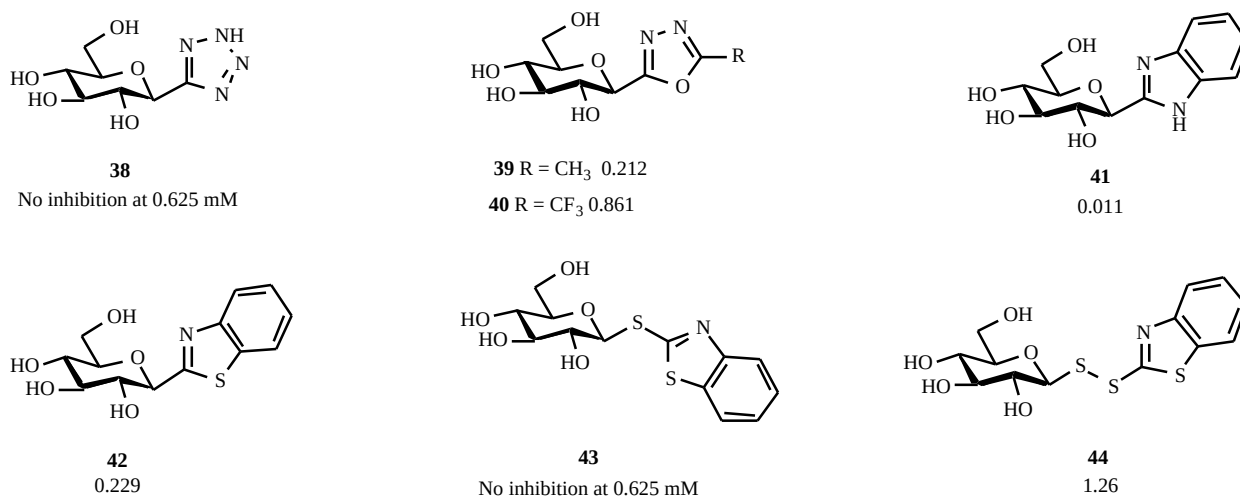


Fig. (8). C-(β -D-glucopyranosyl)-, β -D-glucopyranosylsulfanyl- and -disulfanyl heterocycles as GP inhibitors: K_i [mM] values measured with RMGPb [64].

of the presence of the full glucose hydroxylation pattern. For the understanding of this experience further investigations are needed.

The commercially available natural product five-membered ring iminosugar 1,4-dideoxy-1,4-imino-arabinitol (DAB, **56**) shows a strong structural resemblance to D-glucose as far as the spatial positions of the hydroxyl groups are concerned. Kinetic characterization of DAB revealed that this compound is a strong inhibitor of GP-s with K_i values in the nanomolar range [24] (Fig. 9). The mechanism of action was shown to be a distinct one in comparison to other inhibitors exhibiting elements of un- and noncompetitive inhibition. No crystallographic investigation of a GP-DAB complex has yet been published.

A systematic study [73] of iminosugar-annelated heterocycles (azoloperhydropyridines **57**, **58**, and **60**) as analogs of the good inhibitor nojiritetrazole **12** (Table 2) showed that the fewer the number of the nitrogens in the five-membered ring the weaker the inhibition, and the absence of inorganic phosphate makes this even weaker. In order to explain these findings a charge-dipole interaction between the inorganic phosphate involved in the transition state of the catalyzed reaction and the annelating carbon of the azole moiety in the inhibitor (see Fig. 10) was invoked. This interaction was expected to be stronger for azoles with a lower LUMO energy. Since the necessarily lateral protonation of an azole nitrogen – in the absence of any proton donor amino acid side chain in the active site of GP – could happen by the inorganic phosphate only which, on the other hand, is fixed

by a H-bridge to OH(2) (carbohydrate numbering), the sole binding factor due to the azole moiety can be the charge-dipole interaction, the strength of which is reflected in the inhibitor constants. Introduction of a carboxyl group (under conditions of the enzyme activity assay actually a carboxylate ion) into the triazole ring as in **59** caused a significant loss of the activity. This is probably due to unfavorable steric interactions between the inhibitor and the protein which cannot be compensated for by conformational motions of the enzyme [74].

Miscellaneous

In a study on the effects of cryoprotectants [75] used in low temperature X-ray crystallographic investigations of GP-inhibitor complexes it has been shown that glycerol can also bind to the catalytic center ($K_i = 3.8$ % v/v), and its hydroxyl groups occupy the position of OH(3), OH(4), and OH(6) of D-glucose. In the same work sucrose was also shown to bind to the catalytic center with a $K_i = 6.6$ % w/v.

PHYSIOLOGICAL RESULTS WITH GLUCOSE ANALOG INHIBITORS

The hyperglycemia observed in type 2 diabetes is caused by reduced peripheral glucose deposition and by inappropriate overproduction of glucose by the liver. In the liver, GP_a functions as a glucose receptor. The binding of glucose to the catalytic site of the enzyme inhibits its activity in a

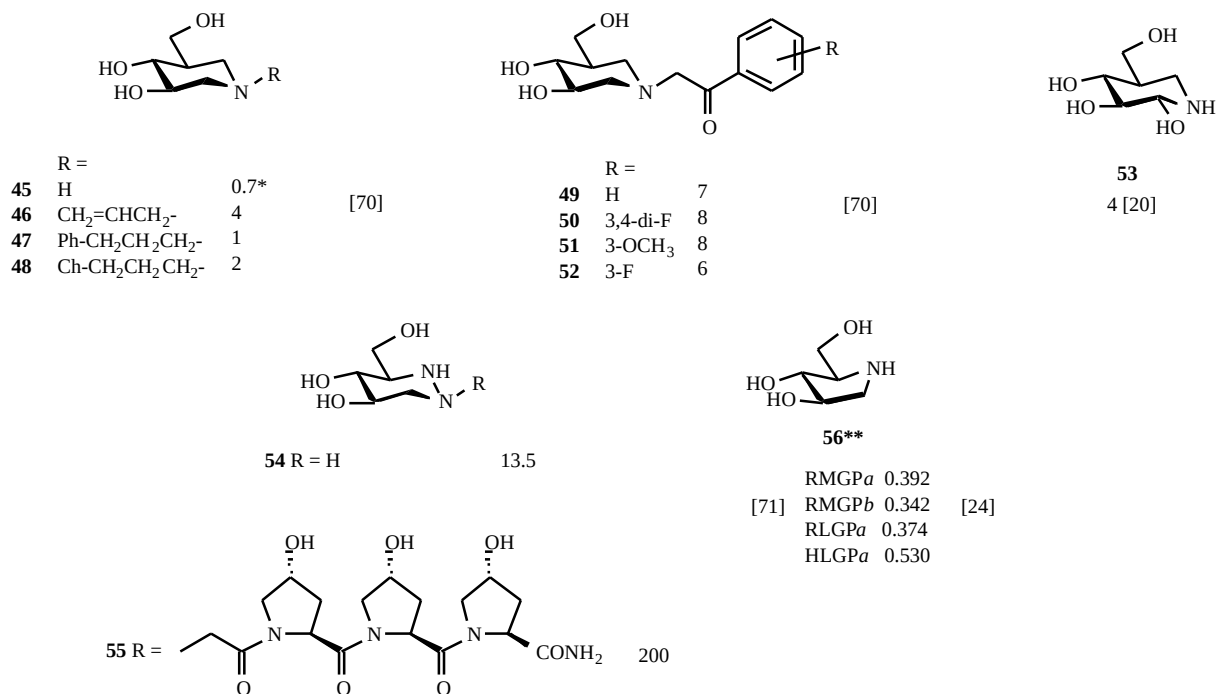
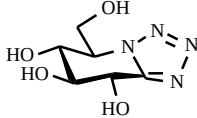
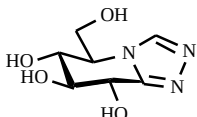
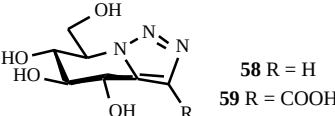
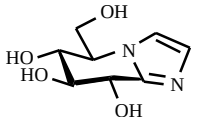


Fig. (9). IC₅₀ [μM] values for iminosugar derivatives measured with RLGP_a.

* Essentially the same values were obtained with PLGP_a and RMGP_a, as well [70].

** K_i [μM] values.

Table 2. Inhibition of RMGPb by Iminosugar Annulated Heterocycles (Azoloperhydropyridines) [73]

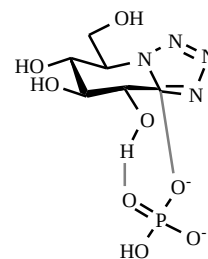
	K_i [mM] GPb/phosphate	K_i [mM] GPb/Glc-1-P	E_{LUMO}^a [kcal/mol]	$E_{\text{min}}^{a,b}$ [kcal/mol]
 12	0.053 ^c [39]	0.7 ^d [39]	-0.298	-8.6
 57	8.1 ^c	No inhibition	0.156	-7.8
 58 R = H 59 R = COOH	0.54 ^c 7.4 ^d [74]	2.5 ^d	0.111	-6.6
 60	9.7	No inhibition	0.788	-5.9

^a From AM1 semiempirical calculations.^b Energy level of the transition state analogous to that shown in Fig. 10.^c K_i [mM] GPb/phosphate, uncompetitive.^d K_i [mM] GPb/Glc-1-P, competitive.

competitive manner and glucose also facilitates the dephosphorylation reaction of GP_a into GP_b catalyzed by protein phosphatases. The resulting inactivation of GP_a causes the arrest of glycogenolysis and the subsequent release of the potent allosteric inhibition of GS phosphatase by GP_a. The latter explains why dephosphorylation and inactivation of GP_a during glucose-induced glycogenolysis precedes dephosphorylation and activation of GS. This mechanism prevents simultaneous synthesis and degradation of glycogen and explains why the glucose-induced activation of GS *in vivo* and in isolated hepatocytes only occurs after latency (for details, see [21]).

A series of glucose-analogue inhibitors of GP_b has been investigated in crystallographic binding and kinetic studies. The effects of of *N*-acetyl- β -D-glucopyranosylamine (**6**) on the activation states of GP and GS in cell-free preparations and in isolated rat hepatocytes were reported [76]. In gel-filtered liver extracts **6** produced a rapid inactivation of GP_a into GP_b with a subsequent activation of GS. It was shown that the effects of 0.8 mM **6** on both enzymes were equipotent with 50 mM glucose. In isolated hepatocytes, **6** showed a marked enhancement of glucose effects for GP_a

inactivation but failed to elicit activation of GS. The phosphorylation of **6** in rat hepatocytes was demonstrated and the formed 6-phosphate of **6** is responsible for the failure of **6** to activate GS.

**Fig. (10).** Postulated interaction of the transition state analog inhibitor **12** with the inorganic phosphate at the catalytic center of GP [73].

Spiro-thiohydantoin **18** proved to be one of the most potent glucose-analogue inhibitors. In gel-filtered rat liver extracts **18** increased significantly the inactivation of GP and

the sequential activation of GS. It was shown that 50 μM of **18** was about as effective as 20 mM of glucose [77]. **18** was also effective when administered *in vivo* into the *v. portae* of Wistar rats (100 $\mu\text{mol/kg}$ body weight) resulting in a significant decrease in the activity of hepatic GP α within 5 min [57, 78].

The most potent iminosugar inhibiting GP, isofagomine (**45**), was also able to inhibit glycogenolysis in cultured primary hepatocytes. Isofagomine inhibited both basal and glucagon-induced glucose production. In addition, 80 % of the glycogen content could be retained at the highest dose of isofagomine [70]. Furthermore, isofagomine at a concentration of 400 μM completely prevented norepinephrine-induced depletion of glycogen and the concomitant lactate production in cerebral cortical astrocytes [25].

Detailed studies describe the physiological data of DAB (**56**) [19]. Using cultured rat hepatocytes, DAB inhibited basal and glucagon-stimulated glucose production with IC_{50} values of 1-2 μM , and it is related to the prevention of glycogen breakdown, confirming that glycogenolysis was inhibited [23, 79]. No effects on glycogen synthesis were observed, demonstrating that glycogen recycling does not occur in cultured hepatocytes in the presence of DAB. Glucagon-induced glycogen degradation was inhibited by DAB in livers of diabetic *ob/ob* mice and lean, non-diabetic control mice as shown by using ^{13}C -NMR. Both the glycogen levels and the endpoint blood glucose levels were higher in mice intraperitoneally treated with glucagon and DAB [24] confirming the data obtained in cultured hepatocytes. It was also demonstrated that DAB inhibited glucagon-stimulated glycogenolysis and endogenous glucose production in overnight fasted dogs, without influencing the contribution of gluconeogenesis to glucose production [80].

Controversy exists regarding the contributions of glycogenolysis and gluconeogenesis to endogenous glucose production both in non-diabetic and diabetic situations, mainly due to technical difficulties in quantitation of gluconeogenesis [11]. To test the above possibility the effect of DAB on rates of gluconeogenesis, gluconeogenic deposition into glycogen, glycogen recycling was investigated in cultured hepatocytes, in perfused rat liver, and in fed or fasted rats by NMR methodology. These data suggest that no glycogen cycling occurs in the presence of DAB and this compound only inhibits the glycogenolytic pathway [81].

CONCLUSION

Inhibition of GP has proven a promising approach in modulating the action of this enzyme which is the main regulator of blood glucose levels. This offers a new concept for fighting against type 2 diabetes an epidemically expanding metabolic disease. There are several binding sites in GP lending themselves to be targeted by various effectors. The best inhibitors known to date bind either to the AMP site (Bay W1807 of Bayer) or to the new allosteric site (indole-carboxamide derivatives of Pfizer) with K_i or IC_{50} values in the low nanomolar range. Many glucose derivatives were shown to bind to the catalytic center of GP, and among them glucopyranosylidene-spiro-hydantoin **16** ($K_i = 3\text{--}4 \mu\text{M}$) was

the most efficient inhibitor. More recent efforts resulted in a large scale synthesis of glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin **18** ($K_i = 5 \mu\text{M}$). Syntheses of „open” derivatives of hydantoins bearing large hydrophobic groups resulted in an order of magnitude better inhibitor *N*-(2-naphthoyl)-*N'*-(β -D-glucopyranosyl)urea (**35**) ($K_i = 0.4 \mu\text{M}$) indicating that trials to find ligands to fit into the β -channel of GP can be a further aim of forthcoming synthetic works. The beneficial presence of an α -carboxamide moiety in carbamate **37** suggests another synthetic goal in preparing novel anomerically bifunctional glucose derivatives, and this is also in keeping with predictions by computational methods. Furthermore, *N*-acyl-*N'*-(β -D-glucopyranosyl)ureas were shown to bind to the new allosteric site as well, thereby representing new leads for the design of inhibitors of this site. Iminosugars (isofagomine, azafagomine, noeuromycin, DAB with IC_{50} values in the low micromolar range) capable to mimic glycosylium ions form another group of glucose-like compounds which show strong binding properties to GP-s. Although present experience in modifying iminosugars with various substituents on the nitrogens is not encouraging, further trials to introduce appendages similar those of the acylureas may be interesting. Physiological investigations performed with the glucose analogs have shown blood glucose lowering potential in animal experiments without any apparent indication of hypoglycemia. Because the inhibition of HLGP will also imply metabolic consequences, it is rather promising that these compounds will lead to the development of a novel active site inhibitor of GP as a monotherapy for type 2 diabetes or add-on therapy to existing treatments.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank the Hungarian Ministry of Education (Grant: FKFP 423/2000 to LS), the Hungarian Ministry of Health (Grant: ETT 1/2000), and the Hungarian Scientific Research Fund (Grant: OTKA T37210 to PG and TD) for supporting their research. VN thanks the French Embassy in Hungary, Budapest and the Ministry for Foreign Affairs of the French Republic, Paris for supporting her co-tutored PhD Thesis at the University of Debrecen with LS and at the University Claude Bernard Lyon 1, ESCPE with Dr. J.-P. Praly. ZsH thanks CMS Chemicals Ltd., Oxford, United Kingdom for financing her PhD Thesis with LS at the University of Debrecen. A fruitful collaboration with Prof. Dr. N. G. Oikonomakos and his team (Athens, Greece) supported by a Greek-Hungarian intergovernmental R&D project (OMFB T  T GR5/99) in the field of protein crystallographical investigation of the synthesized inhibitors is gratefully acknowledged.

ABBREVIATIONS

GP	=	Glycogen phosphorylase
GS	=	Glycogen synthase
GK	=	Glucokinase
G6Pase	=	Glucose 6-phosphatase

RMGP	=	Rabbit muscle GP
RLGP	=	Rat liver GP
HLGP	=	Human liver GP
PLGP	=	Pig liver GP
DAB	=	1,4-dideoxy-1,4-imino-arabinitol

REFERENCES

References 82-84 are related articles recently published in *Current Pharmaceutical Design*.

- [1] Moller D E. *Nature* 2001; 414: 821-827.
- [2] Zimmet P, Alberti K G M M, Shaw J. *Nature* 2001; 414: 782-861.
- [3] Hengesh E J. In *Principles of Medicinal Chemistry*. Foye W O, Lemke T L, Williams D A, eds Williams & Wilkins: Baltimore 1995; pp 581-600.
- [4] Martin J L, Veluraja K, Ross K, Johnson L N, Fleet G W J, Ramsden N G, et al. *Biochemistry* 1991; 30: 10101-10116.
- [5] Cobb J, Dukes I. In *Annual Reports in Medicinal Chemistry* J A Bristol ed Academic Press: San Diego 1998; Vol 33: pp 213-222.
- [6] Perfetti R, Barnett P S, Mathur R, Egan J M. *Diabetes/Metabolism Reviews* 1998; 14: 207-225.
- [7] Rose M L, Paulik M A, Lenhard J M. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 1999; 9: 1-14.
- [8] Zhang B B, Moller D E. *Current Opinion in Chemical Biology* 2000; 4: 461-467.
- [9] Wagman A S, Nuss J M. *Current Pharmaceutical Design* 2001; 7: 417-450.
- [10] Cohen P. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B* 1999; 354: 485-495.
- [11] Treadway J L, Mendys P, Hoover D J. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 2001; 10: 439-454.
- [12] Saltiel A R, Kahn C R. *Nature* 2001; 414: 799-806.
- [13] Staehr P, Hother-Nielsen O, Beck-Nielsen H. *Diabetes Obesity & Metabolism* 2002; 4: 215-223.
- [14] Chu-Moyer M Y. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 2000; 10: 787-801.
- [15] McCarty M F. *Medical Hypotheses* 2000; 54: 483-487.
- [16] Oikonomakos N G, Kontou M, Zographos S E, Tsitoura H S, Johnson L N, Watson K A, et al. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 1994; 185-192.
- [17] Watson K A, Mitchell E P, Johnson L N, Son J C, Bichard C J F, Orchard M G, et al. *Biochemistry* 1994; 33: 5745-5758.
- [18] Watson K A, Mitchell E P, Johnson L N, Cruciani G, Son J C, Bichard C J F, et al. *Acta Crystallographica* 1995; D51: 458-472.
- [19] McCormack J G, Westergaard N, Kristiansen M, Brand C L, Lau J. *Current Pharmaceutical Design* 2001; 7: 1451-1474.
- [20] Oikonomakos N G. *Current Protein & Peptide Science* 2002; 3: 561-586.
- [21] Bollen M, Keppens S, Stalmans W. *Biochemical Journal* 1998; 336: 19-31.
- [22] Radziuk J, Pye S. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 2001; 17: 250-272.
- [23] Andersen B, Rassov A, Westergaard N, Lundgren K. *Biochemical Journal* 1999; 342: 545-550.
- [24] Fosgerau K, Westergaard N, Quistorff B, Grunnet N, Kristiansen M, Lundgren K. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2000; 380: 274-284.
- [25] Waagepetersen H S, Westergaard N, Schousboe A. *Neurochemistry International* 2000; 36: 435-440.
- [26] Goldsmith E J, Sprang S R, Hamlin R, Xuong N H, Fletterick R. *J Science* 1989; 245: 528-532.
- [27] Johnson L N. *The FASEB Journal* 1992; 6: 2274-2282.
- [28] Oikonomakos N G, Skamnaki V T, Tsitsanou K E, Gavalas N G, Johnson L N. *Structure* 2000; 8: 575-584.
- [29] Rath V L, Ammirati M, LeMotte P K, Fennell K F, Mansour M N, Danley D E, et al. *Molecular Cell* 2000; 6: 139-148.
- [30] Coats W S, Browner M F, Fletterick R J, Newgard C B. *Journal of Biological Chemistry* 1991; 266: 16113-16119.
- [31] Zographos S E, Oikonomakos N G, Tsitsanou K E, Leonidas D D, Chrysina E D, Skamnaki V T, et al. *Structure* 1997; 5: 1413-1425.
- [32] Oikonomakos N G, Tsitsanou K E, Zographos S E, Skamnaki V T, Goldmann S, Bischoff H. *Protein Science* 1999; 8: 1930-1945.
- [33] Hoover D J, Lefkowitz-Snow S, Burgess-Henry J L, Martin W H, Armento S J, Stock I A, et al. *Journal of Medicinal Chemistry* 1998; 41: 2934-2938.
- [34] Rath V L, Ammirati M, Danley D E, Ekstrom J L, Gibbs E M, Hynes T R, et al. *Chemistry & Biology* 2000; 7: 677-682.
- [35] Board M, Hadwen M, Johnson L N. *European Journal of Biochemistry* 1995; 228: 753-761.
- [36] Gregoriou M, Noble M E M, Watson K A, Garman E F, Krulle T M, Fuente C, et al. *Johnson L N. Protein Science* 1998; 7: 915-927.
- [37] Somsák L, Kovács L, Tóth M, Ósz E, Szilágyi L, Györgydeák Z, et al. *Journal of Medicinal Chemistry* 2001; 44: 2843-2848.
- [38] Johnson L N, Acharya K R, Jordan M D, McLaughlin P J. *Journal of Molecular Biology* 1990; 211: 645-661.
- [39] Mitchell E P, Withers S G, Ermert P, Vasella A T, Garman E F, Oikonomakos N G, et al. *Biochemistry* 1996; 35: 7341-7355.
- [40] Bichard C J F, Mitchell E P, Wormald M R, Watson K A, Johnson L N, Zographos S E, et al. *Tetrahedron Letters* 1995; 36: 2145-2148.
- [41] Krülle T M, Fuente C, Watson K A, Gregoriou M, Johnson L N, Tsitsanou K E, et al. *Synlett* 1997; 211-213.
- [1] Ósz E, Somsák L, Szilágyi L, Kovács L, Docsa T, Tóth B, et al. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 1999; 9: 1385-1390.
- [43] Krülle T M, Watson K A, Gregoriou M, Johnson L N, Crook S, Watkin D J, et al. *Tetrahedron Letters* 1995; 36: 8291-8294.

- [44] So S -S, Karplus M. *Journal of Medicinal Chemistry* 1997; 40: 4360-4371.
- [45] Pastor M, Cruciani G, Clementi S. *Journal of Medicinal Chemistry* 1997; 40: 1455-1464.
- [46] Cruciani G, Clementi S, Pastor M. *Perspectives in Drug Discovery and Design* 1998; 12/13/14: 71-86.
- [47] Venkatarangan P, Hopfinger A J. *Journal of Medicinal Chemistry* 1999; 42: 2169-2179.
- [48] Venkatarangan P, Hopfinger A J. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* 1999; 39: 1141-1150.
- [49] So S -S, Karplus M. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 1999; 13: 243-258.
- [50] Marchand-Geneste N, Watson K A, Alsberg B K, King R D. *Journal of Medicinal Chemistry* 2002; 45: 399-409.
- [51] Hopfinger A J, Reaka A, Venkatarangan P, Duca J S, Wang S. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* 1999; 39: 1151-1160.
- [52] So S -S, Karplus M. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 2001; 15: 613-647.
- [53] Fuente C, Krülle T M, Watson K A, Gregoriou M, Johnson L N, Tsitsanou K E. et al. *Synlett* 1997; 485-487.
- [1] Ósz E, Sós E, Somsák L, Szilágyi L, Dinya Z. *Tetrahedron* 1997; 53: 5813-5824.
- [55] Oikonomakos N G, Skamnaki V T, Ósz E, Szilágyi L, Somsák L, Docsa T, et al. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2002; 10: 261-268.
- [56] Somsák L, Nagy V. *Tetrahedron: Asymmetry* 2000; 11: 1719-1727 Corrigendum 2247.
- [57] Somsák L, Nagy V, Docsa T, Tóth B, Gergely P. *Tetrahedron: Asymmetry* 2000; 11: 405-408.
- [58] Agasimundin Y S, Mumper M W, Hosmane R S. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 1998; 6: 911-923.
- [59] Sprang S R, Goldsmith E J, Fletterick R J, Withers S G, Madsen N B. *Biochemistry* 1982; 21: 5364-5371.
- [60] Street I P, Armstrong C R, Withers S G. *Biochemistry* 1986; 25: 6021-6027.
- [61] Nhien A N V, Villa P, Ronco G, Postel D. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2001; 53: 939-943.
- [62] Postel D, Nhien A N V, Villa P, Ronco G. *Tetrahedron Letters* 2001; 42: 1499-1502.
- [63] Kovács L, Ósz E, Domokos V, Holzer W, Györgydeák Z. *Tetrahedron* 2001; 57: 4609-4621.
- [64] Somsák L, Nagy V, Hadady Z, Illyés T Z, Szilágyi L, Praly J-P, et al. unpublished results.
- [65] Oikonomakos N G, Kosmopolou M, Zographos S E, Leonidas D D, Somsák L, Nagy V, et al. *European Journal of Biochemistry* 2002; 269: 1684-1696.
- [66] Oikonomakos N G. personal communication.
- [67] Farkas I, Szabó I F, Bognár R. *Carbohydrate Research* 1977; 56: 404-406.
- [68] Szabó I F, Farkas I, Somsák L, Bognár R. *Acta Chimica Academiae Scientiarum Hungaricae* 1981; 106: 61-69.
- [69] Lillelund V H, Jensen H H, Liang X, Bols M. *Chemical Reviews* 2002; 102: 515-553.
- [70] Jakobsen P, Lundbeck J M, Kristiansen M, Breinholt J, Demuth H, Pawlas J, et al. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2001; 9: 733-744.
- [71] Lohse A, Jensen K B, Lundgren K, Bols M. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 1999; 7: 1965-1971.
- [72] Liu H, Liang X, Sohoel H, Bülow A, Bols M. *Journal of the American Chemical Society* 2001; 123: 5116-5117.
- [73] Heightman T D, Vasella A, Tsitsanou K E, Zographos S E, Skamnaki V T, Oikonomakos N G. *Helvetica Chimica Acta* 1998; 81: 853-864.
- [74] Krülle T M, Fuente C, Pickering L, Aplin R T, Tsitsanou K E, Zographos S E, et al. *Tetrahedron: Asymmetry* 1997; 8: 3807-3820.
- [75] Tsitsanou K E, Oikonomakos N G, Zographos S E, Skamnaki V T, Gregoriou M, Watson K A, et al. *Protein Science* 1999; 8: 741-749.
- [76] Board M, Bollen M, Stalmans W, Kim Y, Fleet G W J, Johnson L N. *Biochemical Journal* 1995; 311: 845-852.
- [77] Docsa T, Tóth B, Somsák L, Gergely P. In *Protein Modules in Cellular Signalling* L Heilmeyer P Friedrich eds IOS Press: Amsterdam 2001; pp 142-149.
- [78] Docsa T, Tar K, Tóth B, Somsák L, Gergely P. *Journal of Physiology - London* 2000; 526: Suppl 92P.
- [79] Andersen B, Fosgerau K, Kristiansen M, Lundgren K, Westergaard N. *Diabetes* 1999; 48: A447.
- [80] Fosgerau K, Mittelman S D, Sunehag A, Dea M K, Lundgren K, Bergman R N. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 2001; 281: E375-E383.
- [81] Fosgerau K, Breinholt J, McCormack J G, Westergaard N. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 28648-28655.
- [82] de Souza CJ, Burkey BF. Beta 3-adrenoceptor agonists as anti-diabetic and anti-obesity drugs in humans. *Curr Pharm Des* 2001; 7(14): 1433-49.
- [83] Drucker DJ. Development of glucagon-like peptide-1-based pharmaceuticals as therapeutic agents for the treatment of diabetes. *Curr Pharm Des* 2001; 7(14): 1399-412.
- [84] McCormack JG, Westergaard N, Kristiansen M, Brand CL, Lau J. Pharmacological approaches to inhibit endogenous glucose production as a means of anti-diabetic therapy. *Curr Pharm Des* 2001; 7(14): 1451-74.



Kinetic and Crystallographic Studies of Glucopyranosylidene Spirothiohydantoin Binding to Glycogen Phosphorylase B

Nikos G. Oikonomakos,^{a,*} Vicky T. Skamnaki,^a Erzsébet Ösz,^b László Szilágyi,^b
László Somsák,^b Tibor Docsa,^c Béla Tóth^c and Pál Gergely^c

^a*Institute of Biological Research and Biotechnology, The National Hellenic Research Foundation, 48 Vas. Constantinou Avenue, Athens 11635, Greece*

^b*Department of Organic Chemistry, University of Debrecen, POB 20, H-4010 Debrecen, Hungary*

^c*Department of Medical Chemistry, Medical and Health Science Centre, University of Debrecen, H-4026 Debrecen, Bem ter 18/B, Hungary*

Received 11 May 2001; accepted 25 July 2001

Abstract—Glucopyranosylidene spirothiohydantoin (TH) has been identified as a potential inhibitor of both muscle and liver glycogen phosphorylase b (GPb) and a (GPa) and shown to diminish liver GPa activity in vitro. Kinetic experiments reported here show that TH inhibits muscle GPb competitively with respect to both substrates phosphate ($K_i = 2.3 \mu\text{M}$) and glycogen ($K_i = 2.8 \mu\text{M}$). The structure of the GPb–TH complex has been determined at a resolution of 2.26 Å and refined to a crystallographic R value of 0.193 ($R_{\text{free}} = 0.211$). The structure of GPb–TH complex reveals that the inhibitor can be accommodated in the catalytic site of T-state GPb with very little change of the tertiary structure, and provides a basis of understanding potency and specificity of the inhibitor. The glucopyranose moiety makes the standard hydrogen bonds and van der Waals contacts as observed in the glucose complex, while the rigid thiohydantoin group is in a favourable electrostatic environment and makes additional polar contacts to the protein. © 2001 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

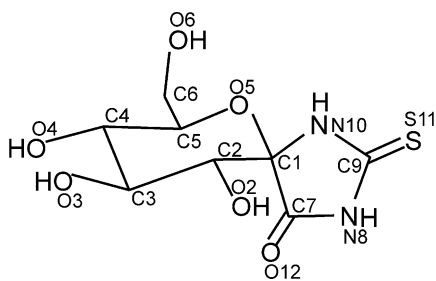
Introduction

Glycogen phosphorylase (GP) catalyses the degradative phosphorolysis of glycogen to glucose 1-phosphate (Glc-1-P). In muscle, Glc-1-P is utilised via glycolysis to generate metabolic energy, and in the liver it is converted to glucose.¹ The enzyme exists in two interconvertible forms: the dephosphorylated form, GPb, and the phosphorylated form, GPa. In resting muscle the enzyme exists in the inactive form (GPb), which can be activated either by non-covalent co-operative binding of AMP (or IMP) or by covalent phosphorylation to form GPa. Both forms can exist in a less active T state and a more active R state according to the Monod–Wyman–Changeux model for allosteric proteins.² The R state is induced by AMP (or IMP), substrates or certain substrate analogues and the T state is stabilised by the binding of ATP, Glc-6-P, glucose and caffeine.^{3–5}

Because of its central role in glycogen metabolism, GP has been exploited as a target for structure-assisted design of compounds that might prevent unwanted glycogenolysis under high glucose conditions that may be relevant to the control of diabetes. An understanding of how these inhibitors bind to the enzyme should provide a rational basis for the development of new molecules with an increased affinity and specificity for GP. Several binding sites, for example the catalytic, the allosteric, and the inhibitor sites, have been identified as targets for inhibitor binding and protein crystallography has contributed significant information on the specificity and interactions that distinguish the binding sites and also revealed unexpected binding sites.^{6–18}

The catalytic site has been probed with glucose and glucose analogues inhibitors. A systematic work involving structure-assisted design, synthesis, kinetic characterisation, and X-ray crystallographic binding studies has led to the discovery of over 80 glucose analogues inhibitors of GPb with similar kinetic and structural characteristics.^{6–10,12,19} The common kinetic and

*Corresponding author. Tel.; +30-1727-3761; fax: +30-1727-3758; e-mail: ngo@eie.gr



Scheme 1. Glucopyranosylidene spirothiohydantoin structure, showing the numbering system used.

structural features of these compounds is that they are highly selective for GPb, they are competitive inhibitors with respect to the substrate Glc-1-P, and they bind at the catalytic site by stabilising the T-state enzyme.

Glucopyranosylidene spirohydantoin (H) is the most effective glucose analogue inhibitor for GPb with a $K_i = 3.1 \mu\text{M}$,⁸ more than 500 times lower than the corresponding K_i (1.7 mM) for glucose.⁶ H binds at the catalytic site with the spirohydantoin group filling the empty space at the β configuration adjacent to C1 of glucopyranose as defined previously.⁶ In an attempt to fill the space available in the position O11 (see Scheme 1) with a group that was nonpolar but easily polarised we found that TH was indeed a good competitive inhibitor ($K_i = 5.1 \mu\text{M}$) with respect to Glc-1-P. Assays with muscle and liver GPb and GPa enzyme render TH and H to be equipotent inhibitors.^{20,21} However, the synthetic routes to H are rather lengthy (almost 10 or more steps from an easily available precursor or the free sugar) or give much less efficient inhibitor as the major product. The synthesis of TH has been reported previously²⁰ and it has been demonstrated that TH, contrary to H, can be produced in gram amounts,²² thereby facilitating more sophisticated biological studies to be carried out.²³

In this work, we demonstrate through kinetic studies that TH has a similar potency on rabbit muscle enzyme in the direction of glycogen breakdown to that observed in the direction of glycogen synthesis. We have also determined the structure of the GPb-TH complex by X-ray crystallographic methods at 2.26 Å resolution. The structural results show that TH binds at the catalytic site in a similar position to that occupied by H and mimicks the contacts of H that stabilise the closed position of the 280s loop (residues 282–286).

Results and Discussion

Kinetics

Inhibition constants of TH for muscle and liver GPb and GPa assayed into the direction of glycogen synthesis have been reported previously.^{20,21} The inhibitory efficiency of TH was also tested with GPb assayed into the direction of glycogen breakdown. The physiologically relevant assay conditions proved that TH is a very potent inhibitor of muscle glycogen phosphorylase b

(Fig. 1a and b). The K_i values for both substrates, $K_i = 2.8 \pm 0.3 \mu\text{M}$, with respect to varying glycogen concentrations, and $K_i = 2.3 \pm 0.3 \mu\text{M}$, with respect to varying Pi concentrations, respectively, are in agreement with the previously published K_i ($5.1 \pm 0.1 \mu\text{M}$) determined into the direction of glycogen synthesis.

X-ray crystallography

The overall architecture of the native T-state GPb with the location of the catalytic site, the allosteric site, the inhibitor site, and a novel allosteric site that has been described previously¹⁷ is presented in Fig. 2. The two subunits of the functionally active dimer are related by a crystallographic 2-fold symmetry axis. A summary of the data processing statistics and refinement parameters for the GPb-TH complex structure is given in Table 1. The structure of the GPb-TH complex has been refined at 2.26 Å to a crystallographic R value 0.193 ($R_{\text{free}} = 0.211$) (Table 1). TH binds at the catalytic site which is buried some 15 Å from the surface of the enzyme at the bottom of a long channel.

Table 1. Summary of diffraction data and refinement statistics for T-state GPb-TH complex

Space group	$P4_32_12$
No. of images (°)	58 (46.4°)
Unit cell dimensions	$a = b = 128.8 \text{ Å}$, $c = 116.2 \text{ Å}$
Resolution range	30–2.26 Å
No. of observations	255,617
No. of unique reflections	45,104
$I/\sigma(I)$ (outermost shell)	17.5 (5.5)
Completeness (outermost shell)	97.4% (99.9%)
R_m (outermost shell)	0.041 (0.158)
Multiplicity	3.8
Outermost shell	2.30–2.26 Å
Mosaicity	0.25
Refinement (resolution)	28.06–2.26 Å
No of reflections used (free)	42,768 (2278 free)
Residues included	13–842
No of protein atoms	6749
No of water molecules	243
No of ligand atoms	15 (PLP)
	17 (TH)
Final R (R_{free})	19.3% (22.1%)
RMSD in bond lengths (Å)	0.008
RMSD in bond angles (°)	1.4
RMSD in dihedral angles (°)	25.4
RMSD in improper angles (°)	0.75
Average B (Å ²) for protein residues	13–842
Overall	34.6 (30.8)*
CA,C,N,O	33.1 (29.3)*
Side chains	36.0 (32.3)*
Average B (Å ²) for ligands	
PLP	19.6
TH	18.6
Water	38.3

Merging R_m is defined as $R_m = \sum_i \sum_h |<I_h> - I_{ih}| / \sum_i \sum_h I_{ih}$, where $<I_h>$ and I_{ih} are the mean and i th measurement of intensity for reflection h , respectively. $\sigma(I)$ is the standard deviation of I . Crystallographic R factor is defined as $R = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$, where $|F_o|$ and $|F_c|$ are the observed and calculated structure factor amplitudes, respectively. R_{free} is the corresponding R value for a randomly chosen 5% of the reflections that were not included in the refinement. *Average B (Å²) is given in parentheses for protein residues if the poorly defined residues (13–16, 209–212, 250–260, 313–326, 548–557, 831–842) were excluded. RMSD is the root-mean-square deviation.

TH binding site

The electron density difference map (against native T-state GPb) showed a strong positive peak representing binding of TH, and concomitant changes of the enzyme, normally observed on binding glucose or glucose analogues at the catalytic site,^{6,9,24} indicating a small movement of His377 away from the sugar in order to optimise contacts to O6 and displacement of four water molecules. Views of the final $2F_o - F_c$ electron density map for the TH molecule itself and in complex with GPb are shown in Figure 3a and b.

The electron density suggests that TH is tightly bound to the enzyme, consistent with the kinetic results (ref 20 and this work). TH could be fitted unambiguously, since clear density was present for all atoms of the inhibitor. In addition, after refinement of the protein and TH atoms, the position of the sulphur atom (S11) was apparent as the highest peak in the difference Fourier

synthesis. The final refinement gave an average B -factor of $18.6 \text{ \AA}^2$ for the TH molecule.

Interactions between TH and catalytic site residues

The mode of binding of TH with GPb resembles that of H with GPb previously reported for room temperature⁸ and 100 K GPb–H complex structures.¹² The glucopyranose moiety of TH makes the standard hydrogen bonds and van der Waals contacts as observed previously for glucose.²⁴ The amide nitrogen (N10) makes a hydrogen bond to the main-chain O of His377, an interaction that was observed for the β -D-*N*-acetylglucopyranosylamine.^{9,10} In the GPb–TH complex, the hydrogen bond to N8 is maintained, but it is longer (3.4 Å) than in the GPb–H complex (3.1 Å). The hydrogen bonds to O12 are also maintained in both complexes, but TH forms an additional hydrogen bond between O12 and main-chain N of Gly135. In the GPb–H complex, O11 makes a rather weak hydrogen bond to ND2 of Asn284 (3.4 Å) and an indirect hydrogen bond to OD1 Asp339 through a water molecule (Wat10). In the GPb–TH complex, S11 makes 6 van der Waals contacts to Asn284 and to a water molecule (Wat10).

TH, on binding to GPb, makes a total of 15 hydrogen bonds — an additional rather long hydrogen bond (3.4 Å) is made between the N8 and ND2 atom of Asn284 and 67 van der Waals interactions (3 nonpolar/nonpolar, 13 polar/polar, and 45 polar/nonpolar). The

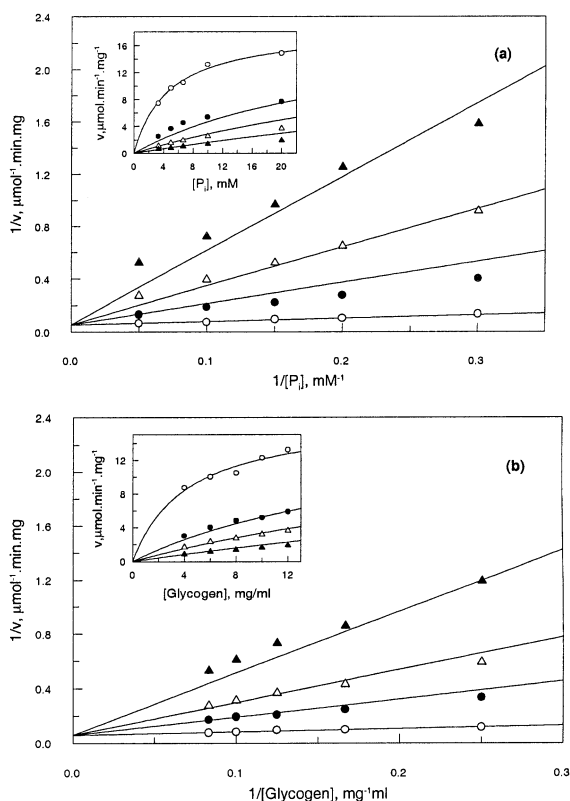


Figure 1. Kinetics of glucopyranosylidene spirothiohydantoin (TH) inhibition of GPb. (a) Double reciprocal plots of initial reaction velocity versus $1/[P_i]$ at constant concentration of glycogen (10 mg/mL), and varying concentrations of phosphate (3.33–20 mM). Concentrations of TH were as follows: 0 (○), 12.5 (●), 25 (△), and 50 μM (▲). Best fit lines were computer generated according to the equation for competitive inhibition (GrafFit) by fitting all of the data at once. The kinetic parameters determined by this method are as follows: $K_m = 4.7 \pm 0.9 \text{ mM}$, $V = 18.5 \pm 1.2 \text{ U/mg}$, $K_i = 2.3 \pm 0.3 \text{ } \mu\text{M}$. Inset: Fit of the calculated lines to the initial rate measurements. (b) Double reciprocal plots of initial reaction velocity versus $1/[\text{Glycogen}]$ at constant concentration of phosphate (20 mM), and varying concentrations of glycogen (4–12 mg/mL). Concentrations of TH were as follows: 0 (○), 12.5 (●), 25 (△), and 50 μM (▲). Best fit lines were computer generated as in (a). The calculated kinetic parameters are as follows: $K_m = 4.2 \pm 0.7 \text{ mM}$, $V = 17.2 \pm 1.0 \text{ U/mg}$, $K_i = 2.8 \pm 0.3 \text{ } \mu\text{M}$. Inset: Fit of the calculated lines to the initial rate measurements.

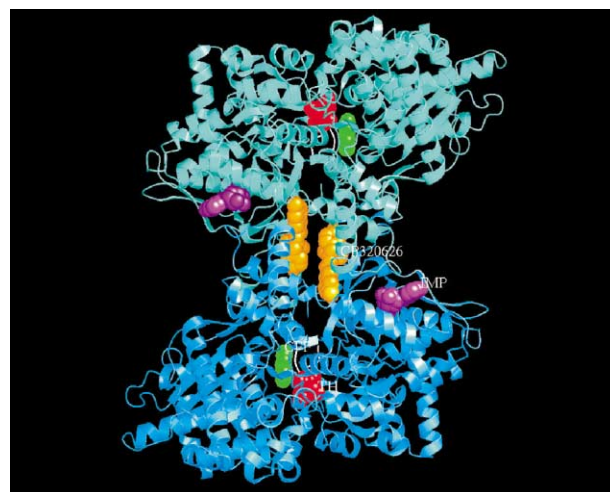


Figure 2. A schematic view of the GPb dimeric molecule viewed down the molecular dyad. The catalytic site, which includes the essential cofactor pyridoxal phosphate (PLP) (not shown), is buried at the centre of the subunit accessible to the bulk solvent through a 15 Å long channel. Glucopyranosylidene spirothiohydantoin (shown in red) binds at this site and promotes the less active T state through stabilisation of the closed position of the 280s loop (shown in white). The allosteric site, which binds the activator AMP, the weak activator IMP (shown in magenta), and other phosphorylated compounds, is situated at the subunit–subunit interface some 30 Å from the catalytic site. The inhibitor site, which binds purine compounds such as caffeine (CFF, shown in green), is situated at the entrance to the catalytic site tunnel, formed by two hydrophobic residues of Phe285 and Tyr613. The CP320626 binding site, located inside the central cavity formed on association of the two subunits, binds CP320626 molecule (shown in orange) and is some 15 Å from the allosteric effector site, 33 Å from the catalytic site and 37 Å from the inhibitor site.¹⁷

hydrogen bond interactions formed between the ligand and the protein are illustrated in Fig. 4. The structural results show that sulphur can be accommodated in this position with essentially no disturbance of the structure. There are no changes at the allosteric site, at the inhibitor site or at the tower/tower subunit interface.

Comparisons between GPb–TH and T-state GPb–H complex structures

The crystallographic analysis of the room temperature GPb–H complex, in which H was diffused into pre-formed crystals has been reported at a resolution of 2.4 Å.⁸ The structure of the GPb–H complex was further refined by applying solvent mask correction and including all data between 15 and 2.36 Å. The LSQKAB²⁵ superposition of the structure of the room

temperature T-state GPb–H with the refined GPb–TH complex structure over well defined residues 17–208, 213–249, 261–312, 327–547 and 558–830 gave RMSDs of 0.066, 0.083, and 0.132 Å for C α , main chain, and side-chain atoms, respectively, indicating that the two structures have very similar overall conformations to within the limits of the 2.26 Å resolution data and do not differ significantly at the interfaces between monomers. Similarly, the LSQKAB superposition of the 100K T-state GPb–H¹² and GPb–TH structures over well defined regions (residues 17–208, 213–249, 261–312, 327–547 and 558–830) gave RMSDs of 0.287, 0.307, and 1.045 Å for C α , main-chain and side-chain atoms, respectively. A comparison of the positions of TH and H at the catalytic site is shown in Figure 5.

Potency and specificity

The structure of the GPb–TH complex pinpoints specific interactions responsible for the high affinity and specificity of TH for the enzyme. The hydrogen bonding network to the peripheral hydroxyls of the glucopyranosylidene moiety of TH is analogous to that observed for the glucose complex.²⁴ Inhibitor binding occurs with the displacement of four water molecules. The increase in entropy from the release of these waters, together with the specific hydrogen bonds and van der Waals interactions (Table 2) appear to be the major source of binding energy that results in an inhibitor with μ M affinity for GPb. The rigid planar nature of the substituent group suggests that there is little conformational energy change on binding, a further favourable factor. In native T-state enzyme there is no access from the buried catalytic site to the surface. Access to this site is partly blocked by the 280s loop in the T-state enzyme.³ On transition from T-state to R-state, the 280s loop becomes disordered and displaced, thus opening a channel that allows substrate (glycogen) access to the catalytic site. The shift and disordering of the 280s loop is associated with changes at the intersubunit contacts of the dimer that give rise to allosteric effects.⁴ The refined structure of the GPb–TH complex shows that TH, by making a hydrogen bond, through its O-2 hydroxyl, to Asn 284, 10 van der Waals contacts,

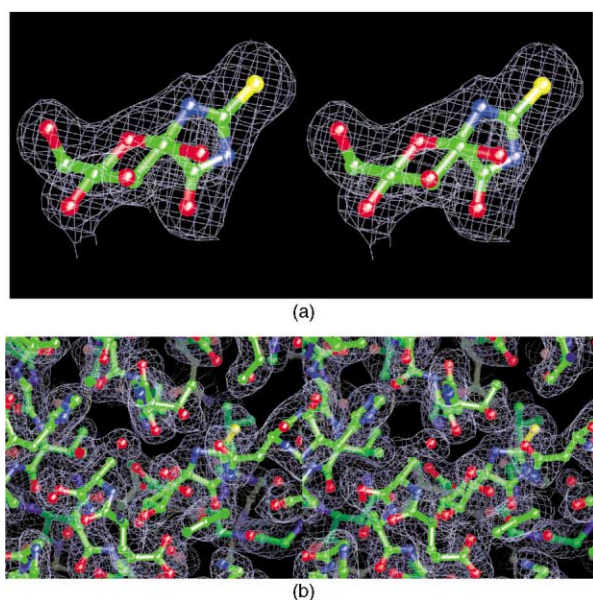


Figure 3. Electron density maps of the GPb–glucopyranosylidene spirothiohydantoin complex structure. Stereo diagrams of the glucopyranosylidene spirothiohydantoin molecule (a), and the catalytic site of the refined GPb–glucopyranosylidene spirothiohydantoin complex (b), showing bound glucopyranosylidene spirothiohydantoin and electron densities from the final weighted $2F_o - F_c$ map, contoured at 1σ .

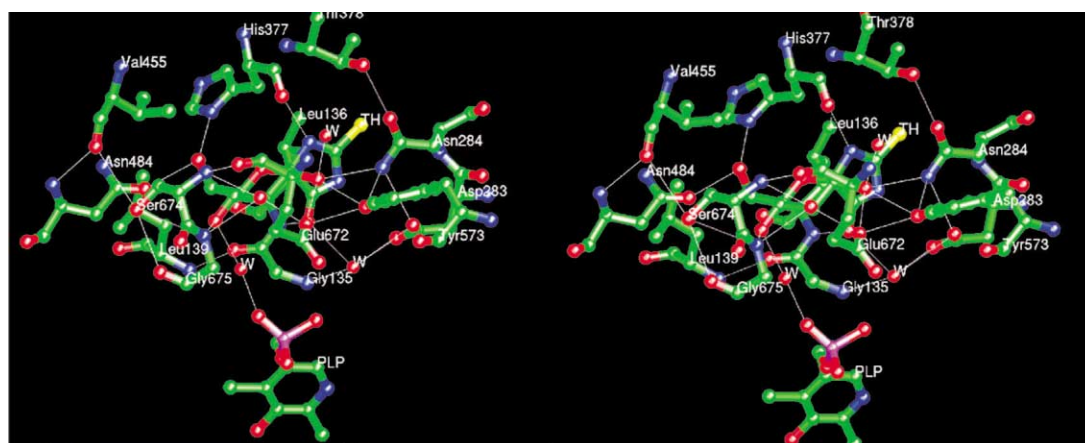


Figure 4. Binding mode of glucopyranosylidene spirothiohydantoin to GPb. Contacts between glucopyranosylidene spirothiohydantoin and GPb residues of the catalytic site.

Table 2. Hydrogen bonds and van der Waals contacts between glucopyranosylidene spirothiohydantoin and residues of the catalytic site of GPb A.

Inhibitor atom	Protein atom	Distance (Å)
Hydrogen bonds ^a		
O2	Asn284 ND2	2.9
	Tyr573 OH	3.1
	Glu672 OE1	3.2
	Wat102	2.8
O3	Glu672 OE1	2.6
	Ser674 N	3.1
	Gly675 N	3.0
O4	Gly675 N	2.8
	Wat131	2.5
O6	His377 ND1	2.6
	Asn484 OD1	2.8
N10	His377 O	2.9
N8	Asn284 ND2	23.4
O12	Gly135 N	3.2
	Leu136 N	3.2
	Wat69	2.8
B. Van der Waals contacts		
Inhibitor atom	Protein atom	No. of contacts
C1	His377 O	1
C2	His377 O;Glu672OE1; Wat 102	3
O2	Asn284 OG	1
C3	Glu672 OE1; Gly675 N; Wat 131	3
O3	Glu672 C, CG, CD; Ala673 C,CA, CB, N; Ser674 C, CA; Gly675 CA; Wat 102	11
C4	Asn484 OD1; Gly675 N; Wat 131	3
O4	Asn484 OD1; Ser674 C, CB; Gly675 C, CA, O	6
C5	Gly135 C; Leu136 N; Wat131	3
C6	Gly135 O; Leu139 CD2; His377 ND1; Asn484 OD1	4
O6	Leu139 CD2; His377 CG, CE1; Val455 CB, CG1, CG2; Asn484 Cg	7
O5	Leu136 N; His377 CB,O,ND1	4
N10	Asn284ND2; His377 C, CB	3
C9	Asn284 CG, ND2	2
S11	Asn284 CA, CG, N, OD1 ND2; Wat 10	6
N8	Asp283 OD1,OD2; Wat59; Wat 165	4
C7	Leu136 N; Asn284 ND2; Wat59	3
O12	Gly135 C, CA; Wat131	3
Total		67

^aWat102 is hydrogen bonded to Thr671 O (3.0 Å) and to Ala673 N (3.2 Å); Wat131 is in turn hydrogen bonded to Thr676 N (2.8 Å) and OG1 (3.2 Å); Wat59 is hydrogen bonded to Gly135 N (3.0 Å), to Asp283 OD1 (2.8 Å) and OD2 (3.2 Å), and to Arg569 N (2.7 Å) and Lys574 (3.2 Å) through another water molecule (Wat63).

through its O2, N10, C9, S11 and C7, to Asn284, and 2 van der Waals contacts, through its N8, to Asp283, stabilises the geometry of the 280s loop occurring in the T-state GPb because it interacts with residues from this loop, therefore inhibiting access of the substrate to the catalytic site.

In conclusion, the structural results show that sulphur can be accommodated in the catalytic site, and in particular, in the empty pocket in the β -configuration of C1 with essentially no disturbance of the structure. The gram-scale availability of TH and its promising biological effects ^{22,23} indicate that this compound can be of

potential use in controlling hyperglycemia. Furthermore, knowing the details of TH interactions with the enzyme may help in the design of more potent and selective related inhibitors by making chemical modifications to the spirothiohydantoin ring.

Materials and Methods

Materials

GPb was isolated from rabbit skeletal muscle according to the method of Fischer and Krebs²⁶ with

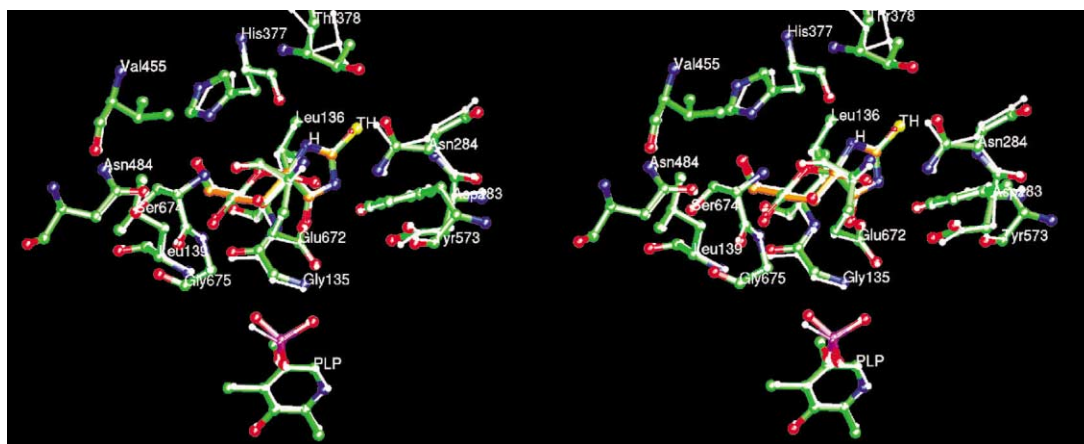


Figure 5. Comparison of the structures of the GPb-glucopyranosylidene spirothiohydantoin complex with the GPb-glucopyranosylidene spirothiohydantoin. Superposition of residues from the catalytic site in GPb. The view is similar to that of Fig. 4. The GPb-glucopyranosylidene spirothiohydantoin complex structure (green) with that of the 100K T-state GPb-glucopyranosylidene spirothiohydantoin (white) complex structure are shown superimposed in stereo.

the difference of using 2-mercaptoethanol instead of L-cysteine. Phosphoglucumutase and glucose 1,6-bisphosphate were obtained from Boehringer Mannheim GmbH, glucose-6-phosphate dehydrogenase and AMP from Sigma. All other chemicals were purchased from Reanal (Hungary).

Assay of GPb activity

Enzyme activity was assayed in the physiological direction of glycogen breakdown. The assay mixture contained 50 mM pipes (pH 6.8), 10 μ g/mL muscle GPb, 0.4 mM NADP, 10 μ M glucose 1,6-bisphosphate, 2.5 mM magnesium-acetate, 4 U/mL phosphoglucumutase (NH_4^+ -free, dialyzed 18 h against 50 mM sodium acetate, pH 5.3), 10 U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase (NH_4^+ -free, dialyzed 18 h against 50 mM pipes, pH 6.8) and appropriate concentrations of glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin (TH) inhibitor. Control experiments demonstrated that TH did not influence the activities of coupling enzymes. For assays intended for calculation of K_i , fixed concentration of glycogen (10 mg/mL) and varying concentrations of phosphate (3.33–20 mM) or fixed concentration of phosphate (20 mM) and varying concentrations of glycogen (4–12 mg/mL) were used. The rate of enzyme-catalyzed reaction was monitored by absorbance measurements at 340 nm and 30 °C due to the formation of NADPH. Kinetic data were analyzed by the use of the nonlinear regression program GraFit.²⁷

Crystallisation, data collection and processing

Tetragonal crystals of GPb were grown under conditions similar to those described previously,²⁸ except that the weak activator IMP was not added in the crystallisation medium. Prior to data collection at room temperature, a crystal was mounted in a thin-walled glass capillary and soaked for approximately 1 h in a freshly prepared buffered solution (10 mM Bes, 0.1 mM EDTA, 0.02 % sodium azide, pH 6.7) containing 70 mM TH. Data for GPb–TH complex were collected from a single crystal on an image plate RAXIS IV using

a Rigaku Ru-H3RHB belt drive rotating anode ($\lambda = 1.5418$ Å), operating at 60 kV, 100 mA. The crystal to image plate distance was set at 180 mm to give a maximum resolution of 2.26 Å at the edge of the detector. Data frames of 0.8° oscillation angle were collected over total angular ranges of 46.4°. Crystal orientation and integration of reflections were performed using DENZO.²⁹ Inter-frame scaling, partial reflection summation, data reduction and post-refinement were all completed using SCALEPACK.²⁹

Structure refinement

Crystallographic refinement of the GPb–TH complex was performed with X-PLOR version 3.8³⁰ using bulk solvent corrections. All data between 28.06 and 2.26 Å were included with no sigma cut-offs. Throughout the refinement, 5% of the data were flagged for calculation of R_{free} . The starting protein structure was the refined model of the room temperature GPb–H complex (see below). The Fourier maps calculated with SIGMA³¹ weighted ($F_o - F_c$) and ($2F_o - F_c$) coefficients indicated tight binding of TH at the catalytic site. A model of TH generated using the programme SYBYL [Tripos Associates Inc. (1992) SYBYL Molecular Modelling Software, St Louis, MO, USA] was fitted to the electron density map. Map interpretation was performed using the program O.³² Several side chains of the enzyme model were adjusted and additional water molecules were added to the atomic model and retained only if they met stereochemical requirements by using WATERPICK (in X-PLOR). The final model was then refined by the conventional positional and restrained individual B -factor refinement protocol in X-PLOR 3.8 to give a final R factor value of 19.3% ($R_{\text{free}} = 22.1\%$). The final structure contained residues 13–842 and 256 water molecules. The first 12 N-terminal residues were not visible; this is true for all other reported structures of T-state GPb and GPb complexes. A Luzatti plot,³³ determined by using XPLOR 3.8 protocol, suggests an average positional error of approximately 0.25 Å. The Ramachandran plot³⁴ showed 87.3% of residues to be in the most favoured regions.

Refinement of the room temperature GPb–H complex, by using the structure of the GPb–glucose complex (PDB accession 2GPB) as a starting model for X-PLOR (version 3.1),³⁰ to a crystallographic *R* value of 0.177 for data between 8.0 and 2.4 Å, was summarised previously.⁸ Further crystallographic refinement of the GPb–H complex was performed using the version 3.8 of the X-PLOR by applying solvent mask correction and including all reflections between 15 and 2.36 Å. In brief, the crystallographic *R* value for 31,588 reflections is 0.189 ($R_{\text{free}} = 0.233$) and the current model, comprising residues 13–842, consists of 6749 protein atoms, 32 ligand atoms, and 220 water molecules. The RMSDs from ideal bond lengths and angles are 0.008 Å and 1.4°, respectively. The average *B*-factors for main-chain atoms, side-chain atoms, PLP, H, and water molecules were 30.1, 33.6, 20.0, 23.7, and 38.5 Å², respectively, if residues that exceeded 60 Å² (13–22, 209–211, 250–261, 314–326, 548–557, and 831–842) were excluded.

The structures were analysed with the graphics program O.³² Hydrogen-bonds were assigned if the distance between the electronegative atoms was less than 3.3 Å and if both angles between these atoms and the preceding atoms were greater than 90°. Van der Waals interactions were assigned for non-hydrogen atoms separated by less than 4 Å. The protein structures were compared using either the LSQ option in O³² or LSQKAB.²⁵

Coordinates for T-state GPb–H and GPb–TH complexes have been deposited with the RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/>) (codes 1GGN, and 1HLF, respectively).

Acknowledgements

This work was supported by a Joint Research and Technology project between Greece and Hungary (2000–2002) (to N.G.O. and P.G.), Hungarian Scientific Research Fund (OTKA T26541), Hungarian Ministry of Health (ETT 01/2000), Hungarian Ministry of Education (FKFP 423/2000), Zsigmond Diabetes Foundation (Hungary), SRS Daresbury Laboratory (HPRI-CT-1999-00012), and EMBL, Hamburg Outstation (HPRI-CT-1999-00017). We wish to acknowledge the assistance of Irene Mavridis, Stella Makedonopoulou and Nikos Pinotsis, at the National Center for Scientific Research “Demokritos”, Athens, Greece, for providing excellent facilities for data collection, and Katerina Tsitsanou and Spyros Zographos for their contribution to the project. Figures were produced using XOB-JECTS, a molecular illustration programme (M.E.M. Noble, unpublished results).

References and Notes

- Newgard, C. B.; Hwang, P. K.; Fletterick, R. J. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1989**, *24*, 69.
- Monod, J.; Changeux, J. P.; Jacob, F. *J. Mol. Biol.* **1965**, *12*, 88.
- Johnson, L. N.; Hajdu, J.; Acharya, K. R.; Stuart, D. I.; McLaughlin, P. J.; Oikonomakos, N. G.; Barford, D. In *Allosteric Enzymes*; Herve, G., Ed.; CRC: Boca Raton, FL, 1989; p. 81.
- Johnson, L. N. *FASEB J.* **1992**, *6*, 2274.
- Oikonomakos, N. G.; Acharya, K. R.; Johnson, L. N. In *Post-translational Modification of Proteins*; Harding, J.J., Crabbe, M.J.C., Eds.; CRC: Boca Raton, FL, 1992; p. 81.
- Martin, J. L.; Veluraja, K.; Johnson, L. N.; Fleet, G. W. J.; Ramsden, N. G.; Bruce, I.; Oikonomakos, N. G.; Papageorgiou, A. C.; Leonidas, D. D.; Tsitoura, H. S. *Biochemistry* **1991**, *30*, 10101.
- Watson, K. A.; Mitchell, E. P.; Johnson, L. N.; Son, J. C.; Bichard, C. J. F.; Orchard, M. G.; Fleet, G. W. J.; Oikonomakos, N. G.; Leonidas, D. D.; Kontou, M.; Papageorgiou, A. C. *Biochemistry* **1994**, *33*, 5745.
- Bichard, C. J. F.; Mitchell, E. P.; Wormald, M. R.; Watson, K. A.; Johnson, L. N.; Zographos, S. E.; Koutra, D. D.; Oikonomakos, N. G.; Fleet, G. W. J. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 2145.
- Oikonomakos, N. G.; Kontou, M.; Zographos, S. E.; Watson, K. A.; Johnson, L. N.; Bichard, C. J. F.; Fleet, G. W. J.; Acharya, K. R. *Protein Sci.* **1995**, *4*, 2469.
- 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 Crystallogr.* **1995**, *D51*, 458.
- Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G.; Tsitsanou, K. E.; Leonidas, D. D.; Chrysina, E. D.; Skamnaki, V. T.; Bischoff, H.; Goldman, S.; Schram, M.; Watson, K. A.; Johnson, L. N. *Structure* **1997**, *5*, 1413.
- Gregoriou, M.; Noble, M. E. M.; Watson, K. A.; Garman, E. F.; Krulle, T. M.; Fuente, C.; Fleet, G. W. J.; Oikonomakos, N. G.; Johnson, L. N. *Protein Sci.* **1998**, *7*, 915.
- Martin, W. H.; Hoover, D. J.; Armento, S. J.; Stock, I. A.; McPherson, R. K.; Danley, D. E.; Stevenson, R. W.; Barrett, E. J.; Treadway, J. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 1776.
- Hoover, D. J.; Lefkowitz-Snow, S.; Burgess-Henry, J. L.; Martin, W. H.; Armento, S. J.; Stock, I. A.; McPherson, R. K.; Genereux, P. E.; Gibbs, E. M.; Treadway, J. L. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2934.
- Oikonomakos, N. G.; Tsitsanou, K. E.; Zographos, S. E.; Skamnaki, V. T.; Goldmann, S.; Bischoff, H. *Protein Sci.* **1999**, *8*, 1930.
- Oikonomakos, N. G.; Zographos, S. E.; Skamnaki, V. T.; Tsitsanou, K. E.; Johnson, L. N. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 34566.
- Oikonomakos, N. G.; Skamnaki, V. T.; Tsitsanou, K. E.; Gavalas, N. G.; Johnson, L. N. *Structure* **2000**, *8*, 575.
- Rath, V. L.; Ammirati, M.; Danley, D. E.; Ekstrom, J. L.; Gibbs, E. M.; Hynes, T. R.; Mathiowetz, A. M.; McPherson, R. K.; Olson, T. V.; Treadway, J. L.; Hoover, D. J. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 677.
- Tsitsanou, K. E.; Oikonomakos, N. G.; Zographos, S. E.; Skamnaki, V. T.; Gregoriou, M.; Watson, K. A.; Johnson, L. N.; Fleet, G. W. J. *Protein Sci.* **1999**, *8*, 741.
- Ösz, E.; Somsák, L.; Szilágyi, L.; Kovács, L.; Docsa, T.; Tóth, B.; Gergely, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1385.
- Somsák, L.; Kovács, L.; Tóth, M.; Ösz, E.; Szilágyi, L.; Györgydeák, Z.; Dinya, Z.; Docsa, T.; Tóth, B.; Gergely, P. *Chem. Eur. J.* **2001**, *44*, 2843.
- Somsák, L.; Nagy, V. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 1719 (*Tetrahedron: Asymmetry* corrigendum: *11*, 2247).
- Somsák, L.; Nagy, V.; Docsa, T.; Tóth, B.; Gergely, P. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 405.
- Martin, J. L.; Withers, S. G.; Johnson, L. N. *Biochemistry* **1990**, *29*, 10745.

25. Collaborative Computational Project *Acta Crystallogr.* **1994**, *D50*, 760.
26. Fischer, E. H.; Krebs, E. G. *Methods Enzymol.* **1962**, *5*, 369.
27. Leatherbarrow, R. J. *GraFit Version 3.0.*; Erithakus Software: Staines, UK, 1992.
28. Oikonomakos, N. G.; Melpidou, A. E.; Johnson, L. N. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *832*, 248.
29. Otwinowski, Z.; Minor, W. *Methods Enzymol.* **1997**, *276*, 307.
30. Brunger, A. T. *X-PLOR Version 3.1. A System for X-ray Crystallography and NMR.* Yale University Press: New Haven, CT, 1992.
31. Read, R. J. *Acta Crystallogr.* **1986**, *A42*, 140.
32. Jones, T. A.; Zou, J. Y.; Cowan, S. W.; Kjeldgaard, M. *Acta Crystallogr.* **1991**, *A47*, 110.
33. Luzatti, V. *Acta Crystallogr.* **1952**, *5*, 802.
34. Laskowski, R. A.; MacArthur, M. W.; Moss, D. S.; Thornton, J. M. *J. Appl. Crystallogr.* **1993**, *26*, 283.

Binding of *N*-acetyl-*N'*- β -D-glucopyranosyl urea and *N*-benzoyl-*N'*- β -D-glucopyranosyl urea to glycogen phosphorylase *b*

Kinetic and crystallographic studies

Nikos G. Oikonomakos¹, Magda Kosmopoulou¹, Spyros E. Zographos¹, Demetres D. Leonidas¹, Evangelia D. Chrysina¹, László Somsák², Veronika Nagy², Jean-Pierre Praly³, Tibor Docsa⁴, Béla Tóth⁴ and Pál Gergely⁴

¹Institute of Biological Research and Biotechnology, The National Hellenic Research Foundation, Athens, Greece;

²Department of Organic Chemistry, University of Debrecen, Hungary;

³Claude-Bernard University Lyon 1, Villeurbanne, France;

⁴Department of Medical Chemistry, Medical and Health Science Centre, University of Debrecen, Hungary

Two substituted ureas of β -D-glucose, *N*-acetyl-*N'*- β -D-glucopyranosyl urea (Acurea) and *N*-benzoyl-*N'*- β -D-glucopyranosyl urea (Bzurea), have been identified as inhibitors of glycogen phosphorylase, a potential target for therapeutic intervention in type 2 diabetes. To elucidate the structural basis of inhibition, we determined the structure of muscle glycogen phosphorylase *b* (GPb) complexed with the two compounds at 2.0 Å and 1.8 Å resolution, respectively. The structure of the GPb–Acurea complex reveals that the inhibitor can be accommodated in the catalytic site of T-state GPb with very little change in the tertiary structure. The glucopyranose moiety makes the standard hydrogen bonds and van der Waals contacts as observed in the GPb–glucose complex, while the acetyl urea moiety is in a favourable

electrostatic environment and makes additional polar contacts with the protein. The structure of the GPb–Bzurea complex shows that Bzurea binds tightly at the catalytic site and induces substantial conformational changes in the vicinity of the catalytic site. In particular, the loop of the polypeptide chain containing residues 282–287 shifts 1.3–3.7 Å (C α atoms) to accommodate Bzurea. Bzurea can also occupy the new allosteric site, some 33 Å from the catalytic site, which is currently the target for the design of antidiabetic drugs.

Keywords: glucopyranosyl ureas; glycogen metabolism; glycogen phosphorylase; inhibition; structure.

Glycogen phosphorylase (GP) has been exploited as a potential target for inhibitors that might prevent glycogenolysis under high glucose conditions in type 2 diabetes. Several binding sites have been identified as specific targets for inhibitor binding, and in some cases detailed X-ray crystallographic studies have elucidated key interactions responsible for inhibitor potency and have revealed the structural mechanisms of enzyme inhibition [1–9]. More specifically, the catalytic site has been probed with glucose and glucose analogue inhibitors, designed on the basis of information derived from the crystal structure of T-state glycogen phosphorylase *b* (GPb) [1–6]. The common kinetic and structural features of these compounds is that

they are highly selective for GPb, they are competitive inhibitors with respect to the substrate Glc1-P, and they bind at the catalytic site by stabilizing the 280s loop (residues 282–287). In the T-state enzyme (less active), this loop partly blocks access from the surface to the buried catalytic site [10]. On transition from T state to R state (active), the 280s loop becomes disrupted and displaced, thus opening up a channel that allows substrate (glycogen) access to the catalytic site [11–16]. In the nonregulatory maltodextrin phosphorylase (MalP), the 280s loop is held permanently in an open conformation [17,18], allowing access to the catalytic site and creation of a constitutively active enzyme.

One of the early successes in the design of glucose-like compounds was the design and synthesis of *N*-acetyl- β -D-glucopyranosylamine (1-GlcNAc), which exhibited a K_i value of 32 μ M, $\approx$ 60 times better than glucose (K_i = 1.7 mM) and also achieved the desired effects in modulating GP activity in hepatic cells [19,20]. The amide made a strong hydrogen bond to the main-chain carbonyl O of His377, a group for which the hydrogen-bonding capacity was otherwise unsatisfied, and the methyl group displaced two water molecules [4,5]. After crystallographic analysis of the 1-GlcNAc, a series of β -D-glucopyranosylamines were synthesized and studied in kinetic and crystallographic experiments [5], but none of them resulted in improved K_i values compared with 1-GlcNAc. The lead to

Correspondence to N. G. Oikonomakos, Institute of Biological Research and Biotechnology, The National Hellenic Research Foundation, 48 Vas. Constantinou Avenue, Athens 11635, Greece. Fax: + 3010 7273758, Tel.: + 3010 7273761, E-mail: ngo@eie.gr
Abbreviations: GP, glycogen phosphorylase; GPb, muscle glycogen phosphorylase *b*; MalP, maltodextrin phosphorylase; glucose, α -D-glucose; glucose-1-P, α -D-glucose 1-phosphate; Acurea, *N*-acetyl-*N'*- β -D-glucopyranosyl urea; Bzurea, *N*-benzoyl-*N'*- β -D-glucopyranosyl urea; CP320626, 5-chloro-1*H*-indole-2-carboxylic acid [1-(4-fluorobenzyl)-2-(4-hydroxypiperidin-1-yl)-2-oxoethyl]amide.
(Received 24 September 2001, revised 24 January 2002, accepted 25 January 2002)

the best glucose analogue inhibitor of GPb came from (+)-hydantocidin, a ribofuranosylidene-spiro-hydantoin; the corresponding glucopyranose derivative exhibited a K_i value of 3.1 μM , more than 500 times lower than the corresponding K_i for glucose. The compound utilized the same hydrogen bond to the CO of His377 as in 1-GlcNAc and made additional hydrogen bonds from its own CO group [3,6]. The analogous glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin, which can be produced in gram amounts, was recently shown to have a similar potency on GPb in the direction of glycogen breakdown ($K_i = 5.1 \mu\text{M}$) and an analogous mode of binding to GPb [21–23].

Because of its potential application to the control of hyperglycaemia in type 2 diabetes, the study of GP inhibition is a continuing challenge for physiology, synthetic, and medicinal chemistry, and also protein crystallography [8,9,24–26]. We report here on the kinetic

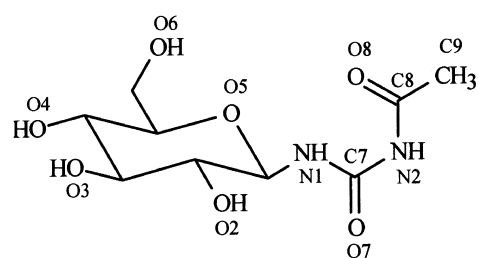
and crystallographic studies of two new glucose derivatives, *N*-acetyl-*N'*- β -D-glucopyranosyl urea (Acurea) and *N*-benzoyl-*N'*- β -D-glucopyranosyl urea (Bzurea). Both of these compounds bind at the catalytic site. In addition, Bzurea can also occupy the so-called new allosteric inhibitor site. This compound is the first glucose analogue to show affinity for this site.

MATERIALS AND METHODS

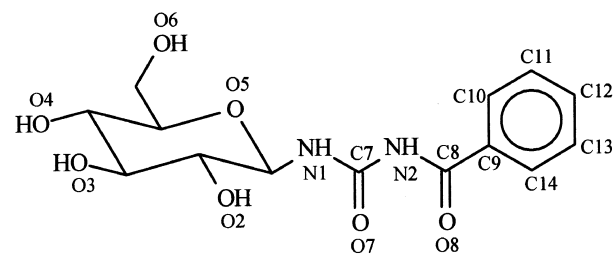
Rabbit GPb was isolated, purified, recrystallised four times, and assayed as described [7,8]. Glucose-1-*P* (dipotassium salt), AMP (oyster) glycogen, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and other chemicals were obtained from Sigma Chemical Company. Glycogen was freed of AMP by the method of Helmreich & Cori [27]. Phosphoglucomutase and glucose 1,6-bisphosphate were obtained from Boehringer Mannheim GmbH.

Native T-state tetragonal ($P4_32_12$) GPb crystals were grown as previously described [28] without IMP. Before data collection, crystals were mounted in thin-walled glass capillaries and soaked with (a) 100 mM Acurea (3 h), (b) 100 mM Bzurea (1.5 h), and (c) 10 mM Bzurea (3.5 h) in a buffered solution (10 mM Bes, 0.1 mM EDTA, 0.02% sodium azide, pH 6.7). Data for GPb–Acurea complex were collected on the beamline X-31 at Hamburg ($\lambda = 1.05 \text{ \AA}$), at a maximum resolution of 1.97 $\text{\AA}$. Data for the 100 mM Bzurea soak were collected on Station 9.6 at Daresbury Laboratory at a resolution of 1.80 $\text{\AA}$ ($\lambda = 0.87 \text{ \AA}$). Data for the 10 mM Bzurea soak were collected at a resolution of 2.26 $\text{\AA}$ on an Image Plate RAXIS IV mounted on a Rigaku Ru-H3RHB generator with a belt drive rotating anode ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$). Crystal orientation and integration of reflections were performed using DENZO [29]. Inter-frame scaling, partial reflection summation, data reduction and postrefinement were all completed using SCALEPACK [29].

Crystallographic refinement, with either XPLOR 3.8 or CNS 1.0 using positional and individual *B*-factor refinement with bulk-solvent correction [30,31], structural analysis and comparisons were performed as previously described [7,8]. Models of Acurea and Bzurea, generated using the program SYBYL (Tripos Associates Inc., St Louis, MO, USA) were fitted to the electron-density maps after torsion angles of the computed models had been adjusted. For the bound Acurea, two possible conformations that differed by 180° in the torsion angle about N2–C8 were explored in the refinement. Both gave similar crystallographic *R* values and similar temperature factors



N'-acetyl- β -D-glucopyranosyl urea



N'-Benzoyl- β -D-glucopyranosyl urea

Scheme 1. Acurea and Bzurea, showing the numbering system used.

Table 1. Kinetic parameters for *N*-substituted β -D-glucopyranosylamine analogues.

Compound	Substituent at C1	K_i (μM)
<i>N</i> -Acetyl- <i>N'</i> - β -D-glucopyranosyl urea	β -NHCONHCOCH ₃	370 $\pm$ 70 ^a
<i>N</i> -Benzoyl- <i>N'</i> - β -D-glucopyranosyl urea	β -NHCONHCOPh	4.6 $\pm$ 0.9 ^b
<i>N</i> -Acetyl- α -D-glucopyranosylamine	β -NHCOCH ₃	32 $\pm$ 1 ^c
<i>N</i> -Benzoyl- α -D-glucopyranosylamine	β -NHCOPh	81 $\pm$ 7 ^d
<i>N</i> -Benzyloxycarbonyl- α -D-glucopyranosylamine	β -NHCOOCH ₂ Ph	350 $\pm$ 20 ^d

^a Calculated from double-reciprocal plots with varied Glc1-P concentrations (3–20 mM), constant concentrations of glycogen (1% w/v) and AMP (1 mM) and 0.5, 1.0, and 2.0 mM inhibitor as described in Materials and methods. ^b Calculated from double-reciprocal plots as in ^a with 10, 20, and 30 μM inhibitor. ^c Data taken from [4]. ^d Data taken from [5].

Table 2. Diffraction data and refinement statistics for GPb–Acurea and GPb–Bzurea complexes. PLP, pyridoxal 5'-phosphate.

Experiment	100 mM Acurea	100 mM Bzurea	10 mM Bzurea
Space group	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2
No. of images (degrees)	59 (0.8°)	85 (0.8°)	91 (0.8°)
Unit cell dimensions	a = b = 128.6 Å c = 116.2 Å	a = b = 128.7 Å c = 116.8 Å	a = b = 128.5 Å c = 116.5 Å
Resolution range	28.8–1.97 Å	27.84–1.80 Å	28.75–2.26 Å
No. of observations	356 285	668 695	391 254
No. of unique reflections	66 108	88 865	44 261
< I/σ(I) > (outermost shell) ^a	16.7 (5.4)	15.63 (1.94)	10.9 (2.6)
B-values (Å ²) (Wilson plot)	17.0	25.1	28.0
Completeness (outermost shell)	95.6% (97.7%)	97.6% (95.0%)	95.8% (86.5%)
R _{merge} (outermost shell) ^b	0.048 (0.255)	0.038 (0.481)	0.096 (0.424)
outermost shell	2.00–1.97 Å	1.83–1.80 Å	2.30–2.26 Å
Multiplicity (outermost shell)	3.6 (3.4)	4.9 (4.2)	5.3 (4.2)
Refinement (resolution)	28.8–1.97 Å	27.84–1.80 Å	28.75–2.26 Å
No. of reflections used (free)	62 517 (3341 free)	84 264 (4447 free)	41 952 (2247 free)
Residues included	13–251,261–314, 325–836	13–251,261–314, 324–837	13–315,324–837
No. of protein atoms	6547	6560	6642
No. of water molecules	286	288	249
No. of ligands atoms	15 (PLP) 18 (Acurea)	15 (PLP) 46 (Bzurea)	15 (PLP) 46 (Bzurea)
Final R (R _{free}) ^c	19.0% (21.9%)	21.5% (24.6%)	18.0% (21.3%)
R (R _{free}) (outermost shell)	23.1% (27.7%)	36.3% (37.1%)	31.4% (33.3%)
rmsd in bond lengths (Å)	0.005	0.007	0.007
rmsd in bond angles (°)	1.24	1.23	1.26
rmsd in dihedral angles (°)	22.1	24.9	25.1
rmsd in improper angles (°)	0.78	0.67	0.72
Average B (Å ²) for residues	13–251,261–314, 325–836	13–251,261–314, 324–837	13–315,324–837
Overall	28.7 (27.2) ^d	31.4 (29.9) ^d	33.4 (30.8) ^d
CA,C,N,O	26.5 (25.0) ^d	29.4 (27.9) ^d	31.4 (28.9) ^d
Side chain	30.8 (29.3) ^d	33.4 (31.8) ^d	35.2 (32.7) ^d
Average B (Å ²) for ligands			
PLP	17.5	20.1	21.2
Acurea	18.7	–	–
Bzurea (catalytic)	–	20.8	20.2
Bzurea (allosteric)	–	56.1	88.9
Water	32.8	38.9	34.6

^a $\sigma(I)$ is the standard deviation of I . ^b $R_{\text{merge}} = \sum_i \sum_h |< I_h > - I_{ih}| / \sum_i \sum_h I_{ih}$, where $< I_h >$ and I_{ih} are the mean and i th measurement of intensity for reflection h , respectively. ^c Crystallographic $R = \sum | |F_o| - |F_c| | / \sum |F_o|$, where $|F_o|$ and $|F_c|$ are the observed and calculated structure factor amplitudes, respectively. R_{free} is the corresponding R value for a randomly chosen 5% of the reflections that were not included in the refinement. ^d Average B (Å²) (given in parentheses) for protein residues if the poorly defined residues were excluded.

for the relevant atoms. However, in one conformation, the methyl group (C9) came within 2.5 Å of the N1 atom, and this unfavourable contact led us to choose the alternative conformation. A Luzatti plot [32] suggests an average positional error for all structures of ≈ 0.22 – 0.25 Å. Solvent-accessible areas were calculated with the program NACCESS [33]. Hydrogen bonds were assigned if the distance between the electronegative atoms was less than 3.3 Å and if both angles between these atoms and the preceding atoms were greater than 90°. Van der Waals interactions were assigned for nonhydrogen atoms separated by less than 4 Å. Co-ordinates for the 2.0-Å resolution GPb–Acurea, the 1.8-Å resolution GPb–Bzurea (100 mM), and the 2.26 Å resolution GPb–Bzurea (10 mM) complexes have been deposited with the RCSB

Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/>) (codes 1KTI, 1K06 and 1K08, respectively).

RESULTS AND DISCUSSION

The new compounds studied in this work (Scheme 1) and their kinetic parameters (K_i) are summarized in Table 1. Crystallographic data collection, processing and refinement statistics for the structure determinations are shown in Table 2. The overall architecture of the native T-state GPb with the location of the catalytic allosteric effector and the new allosteric inhibitor site is presented in Fig. 1. Electron-density maps clearly defined the position of the inhibitors at the catalytic site (Fig. 2A,B), consistent with the kinetic results. Additional density at the new allosteric inhibitor site

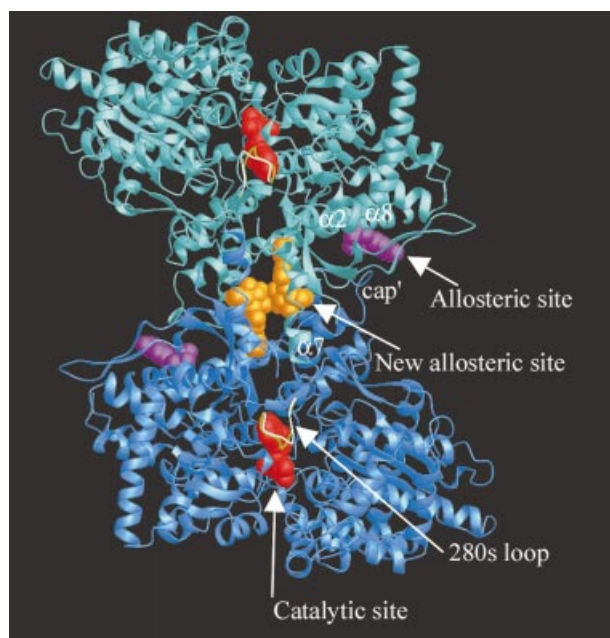


Fig. 1. A schematic diagram of the GPb dimeric molecule viewed down the twofold. The positions are shown for the catalytic, allosteric, and the new allosteric inhibitor site. The catalytic site, marked by Bzurea (shown in red), is buried at the centre of the subunit accessible to the bulk solvent through a 15-Å-long channel. By binding at this site, Bzurea promotes the less active T state through rearrangement and stabilization of the closed position of the 280s loop (shown in white and green). The allosteric site, which binds the allosteric activator AMP (shown in magenta), is situated at the subunit-subunit interface, where the C-termini of the helices $\alpha 2$ (residues 47–78) and $\alpha 8$ (residues 289–314) come together, and it is closed by the cap' region (residues 36' to 47') from the symmetry-related subunit; it is some 30 Å from the catalytic site. The new allosteric inhibitor site, located inside the central cavity formed on association of the two subunits, is closed at one end by residues from the cap and $\alpha 2$ helices and at the other end by the tower helices (residues 262–276) and the symmetry-related residues; it binds another Bzurea molecule (shown in orange) and is some 15 Å from the allosteric effector site, 33 Å from the catalytic site, and 37 Å from the inhibitor site.

indicated binding of Bzurea (Fig. 2C) but not Acurea. We describe briefly the GPb–Acurea interactions at the catalytic site and in more detail the GPb–Bzurea interactions at both sites.

Binding of Acurea

As expected, the mode of binding of Acurea to GPb is similar to those of 1-GlcNAc, *N*-benzoyloxycarbonyl- β -D-glucopyranosylamine, and *N*-benzyloxycarbonyl- β -D-glucopyranosylamine derivatives (Table 1), but not identical. There is a hydrogen bond between the amide N atom and His377 O in the latter three analogues. In the GPb–Acurea complex, this hydrogen bond is not maintained; in the complex with Acurea, N1 is just too far away from the main-chain O of His377 (3.9 Å). However, both the carbonyl O7 and N2 contact Asp283 OD1 through a water molecule (Wat52). In addition O7 forms a hydrogen bond with the Leu136 N, and carbonyl O8 is hydrogen-bonded to the

Asn284 ND2. There is also a possible intramolecular hydrogen bond from N2 to O8 as suggested by the program HBPLUS [34]. One water molecule (Wat10 in the native structure) was displaced by the methyl group (C9), in addition to those displaced by the glucopyranose (Wat284, Wat297). Acurea, on binding to GPb, makes a total of 16 hydrogen bonds and 83 van der Waals interactions (five nonpolar/nonpolar, 19 polar/polar, and 59 polar/nonpolar) (Tables 3 and 4). The hydrogen bonds formed between the ligand and the protein are illustrated in Fig. 3A.

The structural results show that Acurea can be accommodated at the catalytic site with essentially no disturbance of the structure (Fig. 4A). The rmsd between the structures of native GPb and the GPb–Acurea complex for well-defined regions (18–249, 262–312, 326–829) are 0.124, 0.134 and 0.287 Å for C α , main-chain and side-chain atoms, respectively. By making a hydrogen bond to Asn284 and Asp283 via a water molecule and several van der Waals contacts to Asp283 OD1, Asn284 CG, OD1, and ND2 (through its O8, N2, O7, C7, and C8 atoms) Acurea stabilizes the geometry of the 280s loop. There are no changes at the allosteric effector site, the new allosteric site, the inhibitor site, or the tower/tower subunit interface.

The Acurea was found to have a K_i value of 370 μ M (Table 1), indicating that it is 10 times weaker as an inhibitor than *N*-acetyl- β -D-glucopyranosylamine ($K_i = 32 \mu$ M). The bound Acurea adopts a rather unfavourable conformation, formed by the intermolecular contact between its N1 and O8 (2.5 Å). Straightforward energy minimization of Acurea using the program SYBYL (with the Powell minimizer and default parameters) resulted in an extended conformation, different from the bound structure. In the bound Acurea structure, the torsion angle O7–C7–N2–C8 is 178.5°, so that the conformation about the C7–N2 bond is significantly different from that in the computed structure (0.2°) of Acurea. Although there may be some favourable energy from the release of one water molecule, the increase in conformational energy of the ligand appears to be the reason for its low binding energy.

Binding of Bzurea

Catalytic site. Bzurea binds at the catalytic site with the urea and benzoyl moieties filling the empty space of the so-called β -pocket, a side channel from the catalytic site that leads toward residue His341, but with no access to the bulk solvent [1,35]. There are in total 21 hydrogen bonds and 96 van der Waals interactions (seven nonpolar/nonpolar, 16 polar/polar, and 73 polar/nonpolar) in the GPb–Bzurea complex. There is no hydrogen bond between the amide N1 and His377 O in the Bzurea complex as in the case of the Acurea complex. N1 and N2 are hydrogen-bonded to Asp339 OD1 through two water molecules, Wat200, and Wat251 which is also hydrogen-bonded to His341 NE2 of the β -pocket (Fig. 3B). The carbonyl O7 contacts Leu136N and Gly135N and Arg569N through Wat47, and there are also water-mediated (Wat242) contacts to Gly134N and carboxyl OD1 and OD2 of Asp283, which undergoes conformational change.

There are negligible changes in the overall conformation on binding Bzurea to GPb, but there is a dramatic shift in the 280s loop with concomitant changes in the adjacent imidazole of His571, and some differences in the water

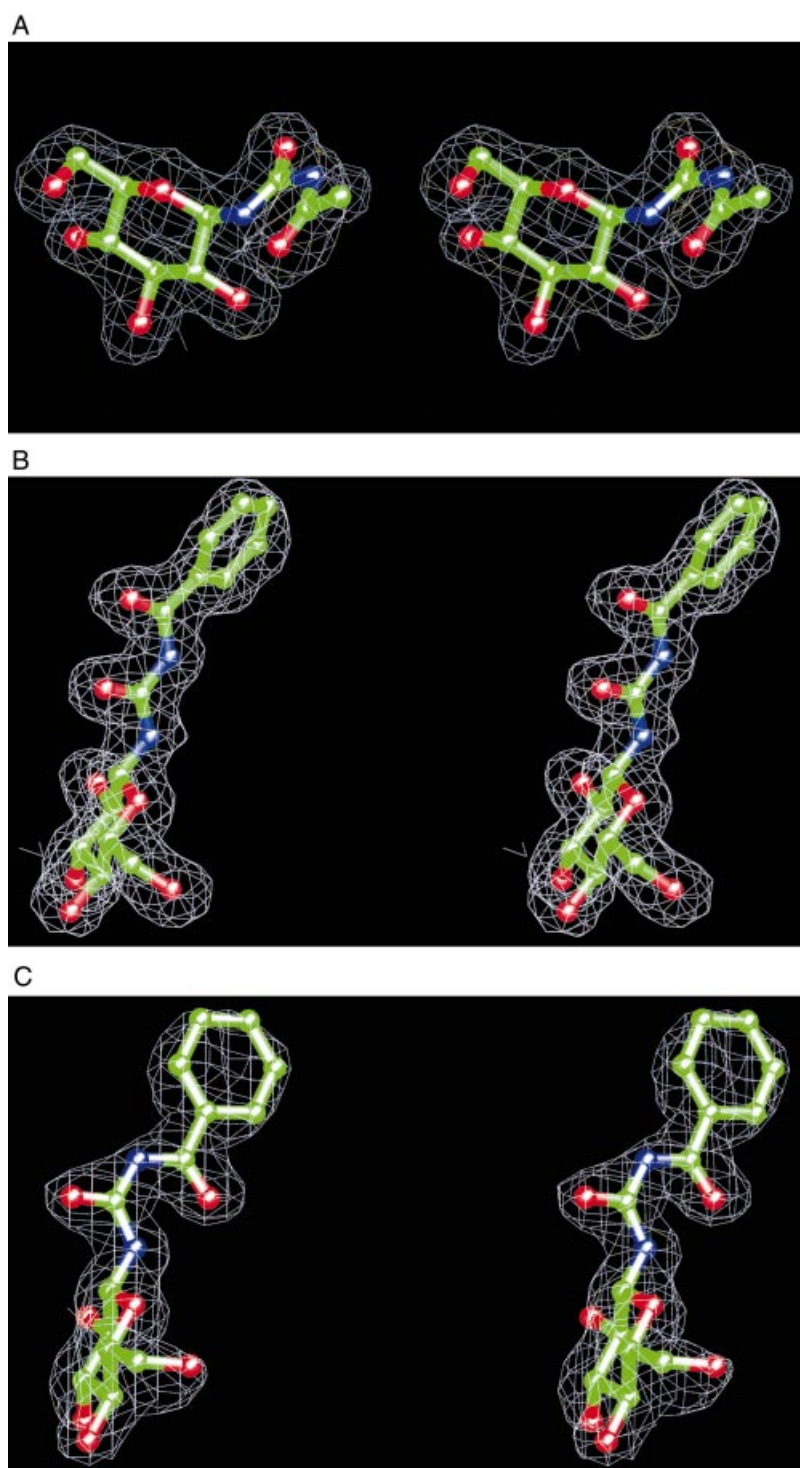


Fig. 2. Stereo diagrams of the final weighted $2F_o - F_c$ electron-density maps contoured at 1σ showing the bound Acurea at the catalytic site (A), the bound Bzurea at the catalytic site (B), and the bound Bzurea at the new allosteric site (C).

structure at the catalytic site. The superimposition of the structures of the native T state GPb and the GPb–Bzurea complex over well-defined residues (18–249, 262–312, 326–829) gave rmsd of 0.253, 0.259 and 0.656 Å for C α , main-chain and side-chain atoms, respectively, indicating that the two structures have very similar conformations. The major shifts between GPb–Bzurea and native GPb for main-chain atoms are for the residues of the 280s loop, Asn282 (1.0–1.3 Å), Asp283 (1.3–1.6 Å), Asn284 (1.3–3.7 Å), Phe285 (2.5–2.9 Å), Phe286 (1.3–1.8 Å), and Glu287 (1.4–4.1 Å) in

order to optimize contacts with the ligand (Figs 3B and 4B). These conformational changes lead to increased contacts between the inhibitor and the protein. Carbonyl O8 forms a hydrogen bond to Asp283 OD1 and contacts Gly134N, Leu136N, Gly137N, and Glu88 OE2 through Wat138, while the benzoyl moiety exploits 24 van der Waals contacts in the β -pocket; these contacts are dominated by polar–polar and polar–nonpolar contacts with Asn282 and Asp283. The phenyl and His341 rings are inclined $\approx 60^\circ$ and there are also two nonpolar–nonpolar contacts between

Table 3. Hydrogen bonds between Acurea and residues of the catalytic site of GPb. Wat245 is hydrogen-bonded to Lys574 NZ and Glu672 OE1 and to Gly135 N, Asp283 OD1 and Arg569 N through two other water molecules (Wat149 and Wat63, respectively); Wat101 is hydrogen-bonded to Thr671 O, Ala673 N and His377 O and to Thr378 OG1 through another water molecule (Wat218); Wat60 is hydrogen-bonded to Thr676 N and OG1; Wat52 is hydrogen-bonded to Asp283 OD1 and to Gly134 N, Gly137 N and Glu88 OE2 through another water molecule (Wat84).

Inhibitor atom	Protein atom	Distance (Å)
O2	Tyr573 OH	3.1
	Glu672 OE1	3.1
	Wat245	3.2
	Wat101	2.8
O3	Glu672 OE1	2.8
	Ser674 N	3.1
	Gly675 N	3.1
O4	Gly675 N	2.7
	Wat60	2.7
O6	His377 ND1	2.7
	Asn484 OD1	2.9
O7	Leu136 N	3.2
	Wat52	3.0
N2	Wat52	3.1
O8	Asn284 ND2	3.3

them (Tables 5 and 6). The strong affinity ($K_i = 4.6 \mu\text{M}$) of Bzurea for GPb can be interpreted in terms of its extensive interactions with the protein.

In the native GPb structure, His571 is hydrogen-bonded to Asp283. In the GPb-Bzurea complex, His571 is rotated ($\chi_1 \approx 20^\circ$) so that ND1 and NE2 atoms are shifted 0.9 and 1.2 Å, respectively, in order to make a hydrogen bond to the

new position of OD2 of Asp283. In the T state GPb, Phe285 is partially shielded by a van der Waals interaction with Tyr613, and the packing of these two aromatic groups gives rise to the nucleoside inhibitor site, a site that binds caffeine and a number of other fused ring compounds [8]. In the GPb-Bzurea complex, Asn284 is now sandwiched between the side chains of Tyr613 and Phe285 (Fig. 5B), resulting in destruction of the inhibitor site, by mimicking the T to R allosteric transition.

In fact, the key transition between inactive T-state and active R-state GP involves movement and disruption of the 280s loop, which allows a crucial arginine, Arg569, to enter the catalytic site in place of Asp283, and which also opens up access for glycogen to the catalytic site. The shift and disruption of the 280s loop is associated with subsequent destruction of the inhibitor site and changes at the intersubunit contacts of the dimer which give rise to allosteric effects [15]. In the R-state GP, the 280s loop is not well ordered and its position has not been established definitively. In contrast, in the MalP the 280s loop is held in an open conformation through interactions with the tower residues [17,18]. This allows access to the catalytic site and creates a constitutively active enzyme. Arg569 is also in the correct position to bind the substrate phosphate. A further significant conformational change in MalP structure on binding oligosaccharide (e.g. maltopentaose) involves movement of the 380 s loop (residues 377–384), resulting in closure of the catalytic site and creation of the recognition site for oligosaccharide [36].

Superimposition of MalP-G5 complex on the GPb-Bzurea complex structure over well-defined residues of the catalytic site [88 (67), 133–136 (112–115), 280–290 (256–266), 292 (268), 338–339 (306–307), 377–387 (345–355), 569 (534), 571–573 (536–538), 608 (573), 613 (578), 674–676 (639–641), 770 (737)] gave an rmsd for C α atoms of 1.224 Å.

Table 4. Van der Waals contacts between Acurea and residues of the catalytic site of GPb.

Inhibitor atom	Protein atom	No of contacts
C1	Wat245; Leu136 N	2
C2	His377 O; Glu672 OE1; Wat245; Wat101	4
O2	His377 O; Asn284 ND2, OD1	3
C3	Glu672 OE1; Gly675 N; Wat60; Wat245	4
O3	Glu672 CG,CD; Ala673 C,CA,CB,N; Ser674 C,CA; Gly675 CA; Wat101	10
C4	Asn484 OD1; Gly675 N; Wat60	3
O4	Asn484 OD1; Ser674 C,CB; Gly675 C,CA,O; Thr676 CG2, N	8
C5	Gly135 CA, C; Leu136 N; Wat60	4
C6	Gly135 C, O; Leu136 N; His377 ND1; Asn484 OD1	5
O6	Leu139 CD2; His377 CG,CE1; Val455 CG1,CG2; Asn484 CG	6
O5	Gly135 C; Leu136 N, CA, CB; His377 CB, ND1	6
N1	Asn284 OD1; His377 O,CB	3
C7	Leu136 CB; Asn284 OD1; Wat52	3
O7	Leu136 CA, CB; Asp283 OD1; Asn284 OD1; Wat84; Wat149	6
N2	Leu136 CB; Asn284 OD1	2
C8	Asn284 ND2, OD1, CG; Asp339 OD1	4
C9	Asp339 OD1; Wat343; Wat277	3
O8	His377 C, O, CB; Asn284 OD1, CG; Thr378 CB, CG2	7
Total		83

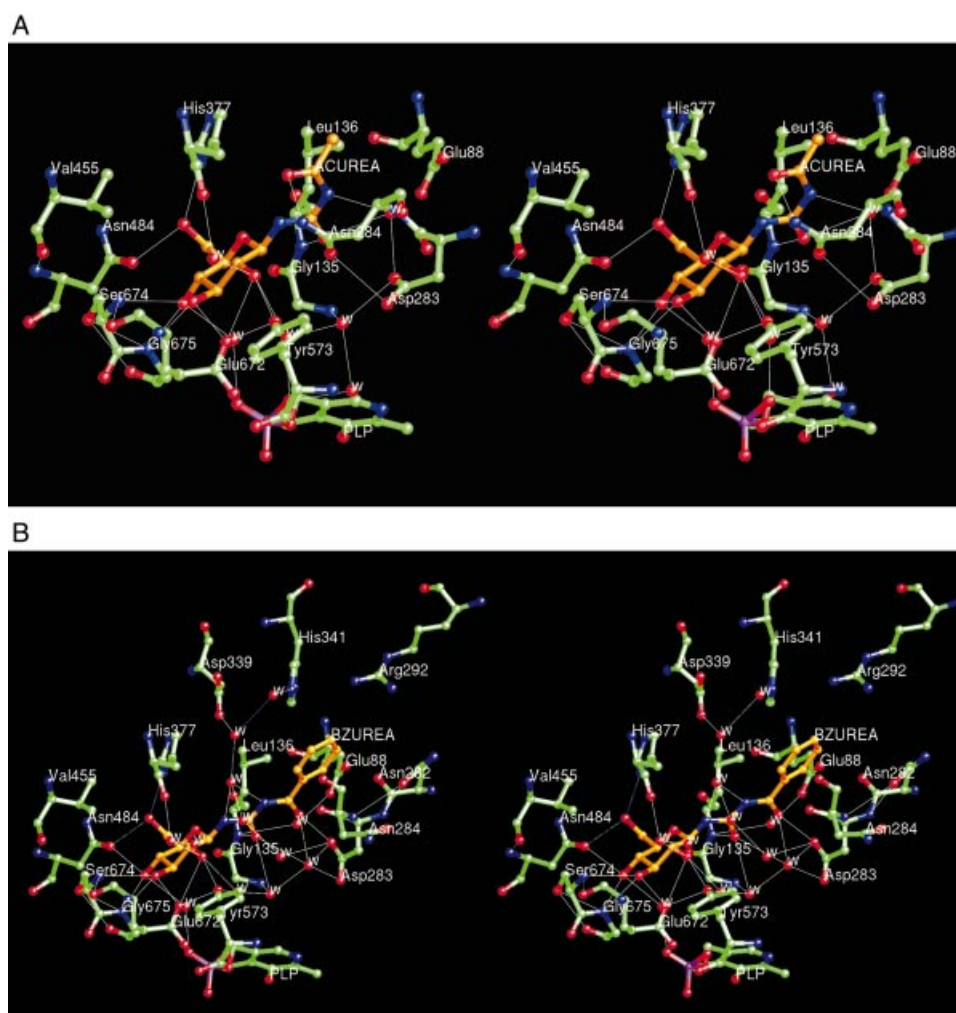


Fig. 3. Interactions between Acurea and GPb (A) and between Bzurea and GPb (B) in the vicinity of the catalytic site.

A structural comparison between GPb–Bzurea and GPb–glucose complexes and GPb–Bzurea and MalP–G5 complexes in the vicinity of the catalytic site is shown in Fig. 5B. It is apparent that the shifts in the 280s loop in the Bzurea complex are not in the direction of the T to R allosteric transition. Bzurea binds at the catalytic site by causing substantial conformational changes to the 280s loop, but the inhibitor still favours the interior position of the 280s loop because it interacts with the 280s loop. Arg569 is still in place, while there are no changes at the subunit–subunit contacts on binding Bzurea to the catalytic site. The tower helices (residues 262–276) and the cap' (residues 36' to 47') α 2 helix (residues 47–78) contacts in the N-terminal region of the molecule (Fig. 1) have the same positions as in the native T-state GPb. These observations indicate that Bzurea should be classified as a T-state inhibitor.

On binding Bzurea to GPb, Wat244 and Wat252 were displaced because of the shift of the 280s loop, and Wat10 and Wat201 were shifted by 1.8 Å. New water molecules, unique to the GPb–Bzurea complex structure were Wat44, Wat200, Wat242, Wat243, Wat250, Wat262 (in the position previously occupied by Asn284 OD1), and Wat268; these water molecules form important links between the ligand and the protein.

In Fig. 6, we compare the binding of 1-GlcNAc, *N*-benzyloxycarbonyl- β -D-glucopyranosylamine, *N*-benzoyl- β -D-glucopyranosylamine, Acurea, and Bzurea within the catalytic site of GPb. The positions of the glucosyl components of each of the structures are similar, indicating that the glucosyl-recognition site does not change substantially. The largest difference in positions is in their N1 positions, a difference that reflects the presence (2.9 Å in 1-GlcNAc, 3.0 Å in *N*-benzyloxycarbonyl- β -D-glucopyranosylamine, 3.2 Å in *N*-benzoyl- β -D-glucopyranosylamine) or absence (3.9 Å in Acurea and 4.2 Å in Bzurea) of a hydrogen bond between N1 and the main-chain O of His377 in these derivatives.

New allosteric inhibitor site. Bzurea, on binding to GPb, also occupies the new allosteric inhibitor site, the site that is almost buried in the central cavity of the enzyme. The new allosteric site, identified recently as a target for drug interactions [7,9], has been shown to bind a number of indole-2-carboxamide inhibitors. The conformation of the bound Bzurea is not identical with that described above for the catalytic site. In the bound Bzurea structure, the torsion angle O7–C7–N2–C8 is -179.3° , so that the conformation about the C7–N2 bond is in *trans* geometry, significantly

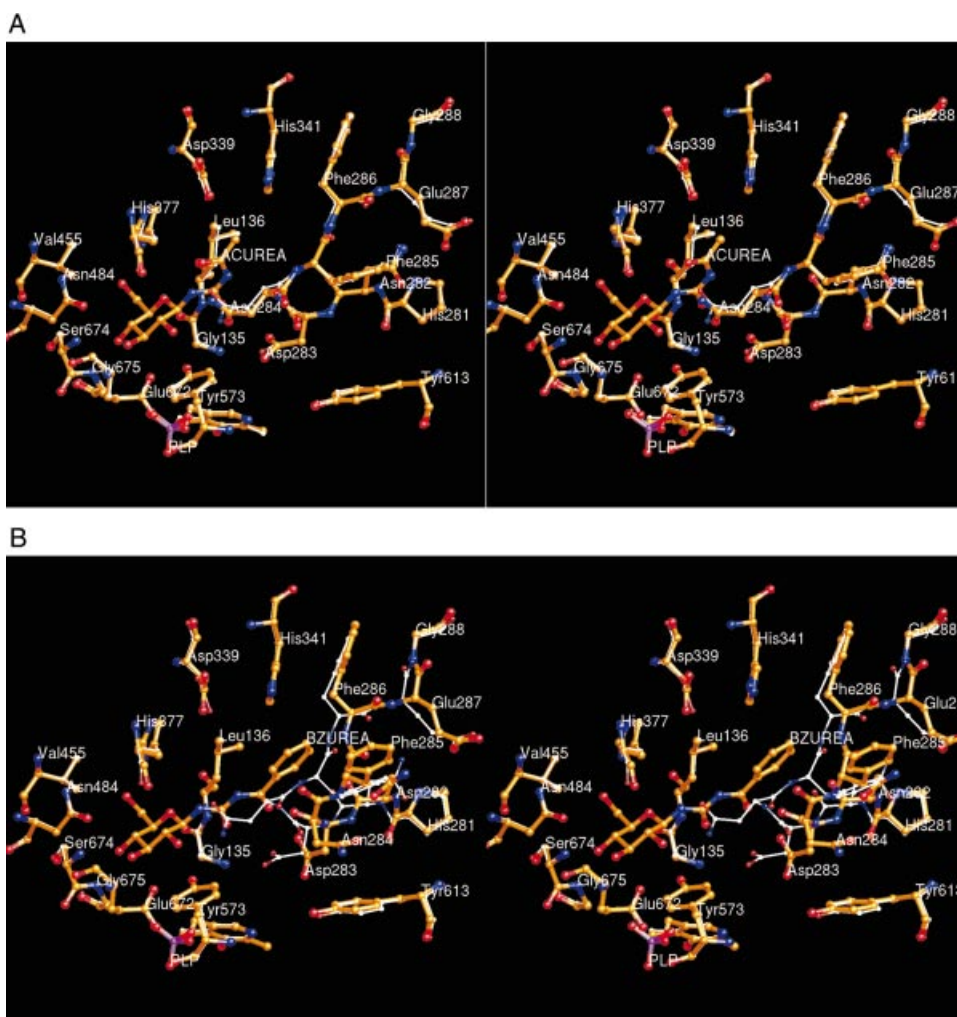


Fig. 4. Stereo diagrams showing (A) a comparison of Acurea bound to GPb (orange) with native GPb (white) in the vicinity of the catalytic site, and (B) a comparison of Bzurea (orange) bound to GPb with native GPb (white) in the vicinity of the catalytic site.

different from that in the catalytic site (0.2°) of Bzurea. In addition, the phenyl ring is coplanar to the urea moiety, whereas, at the catalytic site, the plane of the phenyl ring is inclined $\approx 30^\circ$ to the plane of the urea moiety.

Bzurea on binding at the new allosteric inhibitor site of GPb makes a total of nine hydrogen bonds and exploits 80 van der Waals interactions, 28 of which are interactions between nonpolar groups; in total, there are 21 contacts with the symmetry related subunit (Fig. 7, Tables 7 and 8). The benzoyl moiety exploits 43 van der Waals contacts (25 nonpolar–nonpolar), which are dominated by the substantial contacts (20) made to almost all atoms of Arg60. There is also a hydrogen bond from the carbonyl oxygen O8 to Arg60 NH1. The urea moiety is located between the side chains of Arg60 and Lys191 and exploits 14 van der Waals contacts with residues Arg60, Glu190, Lys191, and Thr38' (where the prime refers to residues from the symmetry-related subunit). There is a hydrogen bond from N2 to the main-chain O of Glu190, and water-mediated hydrogen bonds from carbonyl O7 to residues Asn187, Glu190, and Ala192 (Table 5). The glucopyranose moiety makes 23 van der Waals contacts, 19 of which are with residues from the symmetry-related subunit. The glucopyranose and His57'

rings are inclined $\approx 80^\circ$, and there are extensive contacts between them. There are hydrogen bonds from His57'NE2 to both hydroxy groups O3 and O4 and a rather weak hydrogen bond (3.4 Å) between hydroxyl O6 and Lys191NZ. In addition, hydroxyl groups O2 and O3 hydrogen-bond O3 and O2, respectively, of the glucopyranose from the symmetry-related bound Bzurea molecule. There is, however, only moderate complementarity of van der Waals contacts between nonpolar ligand and protein groups for this part of the molecule and there are no aromatic–aromatic, amino–aromatic and CH– π interactions that are characteristic of the tight binding of the 4-fluorobenzyl moiety of CP320626 [7].

The binding of Bzurea at the new allosteric inhibitor site of GPb does not promote extensive conformational changes except for small shifts in the atoms surrounding the inhibitor, similar to those observed on binding of CP320626 to GPb [7], i.e. of residues 60, 64, and 191, which undergo conformational changes to accommodate the ligand.

The inhibitor, on forming the complex with GPb, becomes almost entirely buried at the new allosteric site. The solvent accessibilities of the free and bound Bzurea are

Table 5. Hydrogen bonds between Bzurea and residues of the catalytic binding site of GPb. Wat81 is hydrogen-bonded to Ala N, His377 O, and Thr671 O and Thr378 OG1 through Wat232; Wat234 is hydrogen-bonded to Lys574 NZ, Tyr573 OH and Wat47; Wat47 is hydrogen-bonded to Gly135 N, Arg569 N and PLP OP3 (through Wat49), and Wat242; Wat242 is hydrogen-bonded to Gly134 N and Asp283 OD1 and OD2; Wat108 is hydrogen-bonded to Thr676 N and OG1, and PLP OP3; Wat200 is hydrogen-bonded to Wat262, and Asp339 OD1 through Wat251; Wat251 is also hydrogen-bonded to His341 NE2 and Ala383 O through Wat245; Wat138 is hydrogen-bonded to Gly134 N, Leu136 N, Gly137 N, and Glu88 OE2.

Inhibitor atom	Protein atom	Distance (Å)
O5	Leu136 N	3.3
O2	Glu672 OE1	3.1
	Tyr573 OH	3.2
	Wat81	2.8
	Wat234	2.8
O3	Gly675 N	3.1
	Ser674 N	3.1
	Glu672 OE1	2.8
O4	Gly675 N	2.7
	Asn484 OD1	3.3
	Wat108	3.0
O6	Asn484 OD1	2.8
	His377 ND1	2.7
N1	Wat200	3.0
O7	Leu136 N	3.0
	Wat47	3.3
	Wat242	3.3
N2	Wat200	2.8
O8	Wat138	2.9
	Wat242	2.8
	Asp283 OD1	3.2

525 Å² and 77 Å², indicating that a surface area of 447 Å² becomes inaccessible to water and that Bzurea becomes 85% buried in the enzyme complex. Binding of the inhibitor is associated with both subunits; surface areas from the two subunits that are buried in the inhibitor are 280 Å² (1st subunit) and 167 Å² (2nd subunit). Both polar and nonpolar groups are buried, but the greatest contribution comes from the nonpolar groups which contribute 306 Å² (84%) of the surface that becomes inaccessible. On the protein surface, a total of 162 Å² solvent-accessible surface area becomes inaccessible on binding Bzurea, of which 81 Å² (50%) is contributed by nonpolar groups. In the CP320626 (*IC*₅₀ = 334 nM) complex [7], in contrast, the corresponding areas buried by ligand and protein are 536 Å² and 283 Å².

A structural comparison between the GPb-CP320626 complex and the GPb-Bzurea complex shows that the two proteins have very similar overall structures and do not differ significantly at the interfaces between monomers. The two structures superimpose quite well; the positions of the Cα, main-chain and side-chain atoms for residues 17–208, 212–249, 261–313, 326–549, and 558–830 deviate from their mean positions by 0.242 Å, 0.248 Å and 0.428 Å, respectively, indicating no significant changes between the complex structures. Figure 8 shows details of the contacts made at the new allosteric inhibitor site for the T-state GPb-Bzurea complex and GPb-glucose-CP320626 complex. The two structures superimpose well and they closely resemble each other in the vicinity of the new allosteric site.

In a crystallographic experiment with 10 mM Bzurea (3.5 h soak) (Table 2), electron-density maps suggested strong binding of Bzurea at the catalytic site, but partial occupancy of the new allosteric inhibitor site by the ligand. Despite the low occupancy of Bzurea, the density was sufficiently well resolved to indicate the conformation of the

Table 6. Van der Waals contacts between Bzurea and residues of the catalytic binding site of GPb.

Inhibitor atom	Protein atom	No of contacts
O5	Gly135 C; Leu136 CA,CB; His377 ND1	4
C1	Leu136 N; Wat234	2
C2	His377 O; Glu672 OE1; Wat81; Wat234	4
O2	His377 O; Wat262	2
C3	Glu672 OE1; Gly675 N; Wat108; Wat234	4
O3	Glu672 CG,CD; Ala673 N,C,CA,CB; Ser674 C,CA; Gly675 CA; Wat81	10
C4	Asn484 OD1; Gly675 N; Wat108	3
O4	Asn484 OD1; Ser674 N,C,CA,CB,OG; Gly675 O,C,CA	9
C5	Gly135 C,CA; Leu136 N; Wat108	4
C6	Gly135 C,O; Leu136 N; Leu139 CD2; His377 ND1; Asn484 OD1	6
O6	Leu139 CD2; His377 CG,CE1; Val455 CG1,CG2; Asn484 CG	6
N1	Leu136 CB; Wat262	2
C7	Leu136 N,CB; Wat200; Wat250	4
O7	Gly135 N,C,CA; Leu136 CA,CB; Wat138; Wat234	7
N2	Leu136 CB,CD1; Wat200; Wat250; Wat262	5
C8	Asp283 OD1; Wat138; Wat242	3
O8	Asn133 CB	1
C10	Asp283 O; Wat200	2
C11	Asn282 O; Asp283 O; Wat166; Wat244; Wat245	5
C12	Asn282 O; His341 CE1,NE2; Wat166; Wat244	5
C13	Glu88 OE1; Asn282 O; His341 CE1; Wat218; Wat240	5
C14	Glu88 OE1; Asn133 ND2; Wat218	3
Total		96

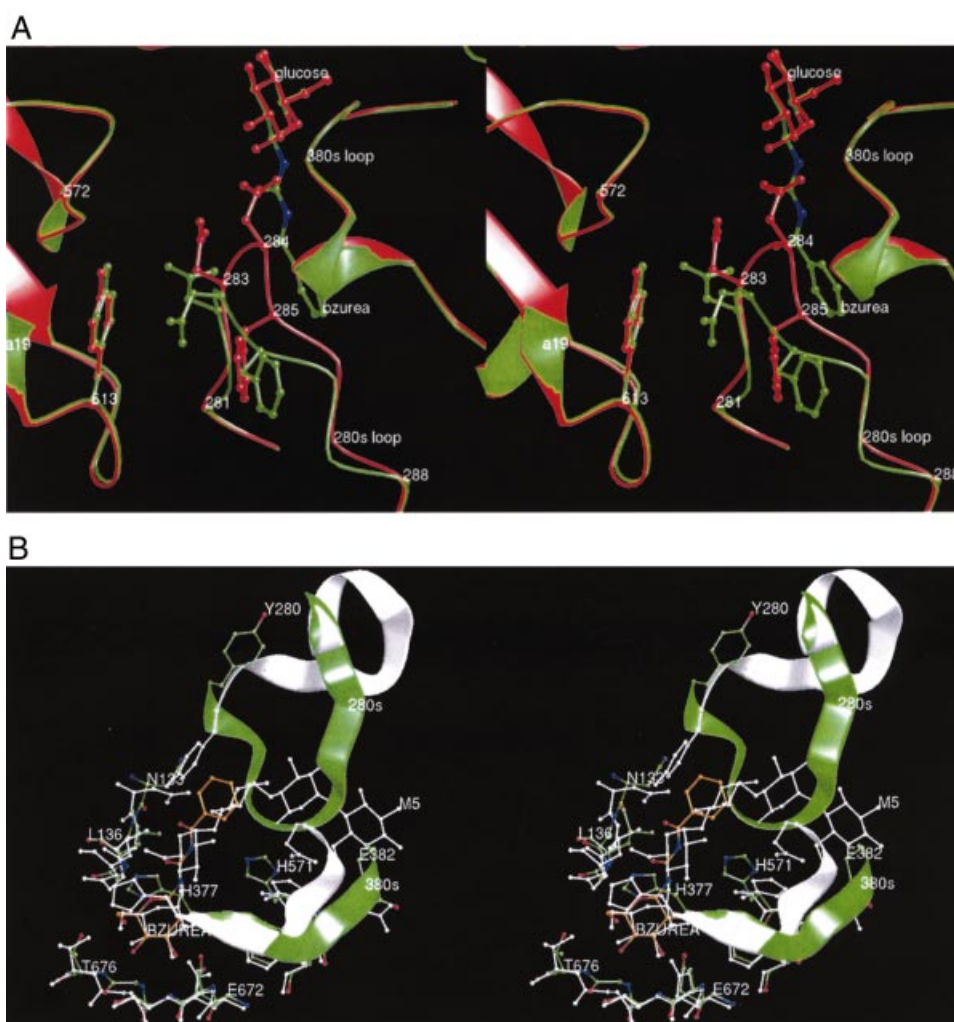


Fig. 5. Comparison between (A) the GPb–glucose complex (red) and the GPb–Bzurea complex (green) in the vicinity of the catalytic and inhibitor sites and (B) the GPb–Bzurea complex (green) and the MalP–G5 complex (white) in the vicinity of the catalytic site. (A) In the GPb–glucose complex, Phe285 from the 280s loop is stacked close to Tyr613, and, together with these two hydrophobic aromatic residues, form the inhibitor site, where caffeine (not shown) binds. (B) In the GPb–Bzurea complex, because of the substantial shift of the 280s loop, Asn284 occupies the space between Phe285 and Tyr613, thus destroying the inhibitor site. MalP and GPb have an overall 46% sequence similarity, and in the region of the catalytic site there is a 98% sequence identity [37]. In MalP the 280s loop is held in an open conformation and this allows access of G5 to the catalytic site. In contrast, in the GPb–Bzurea, the 280s loop is still in an inactive T-state conformation which blocks access to the catalytic site.

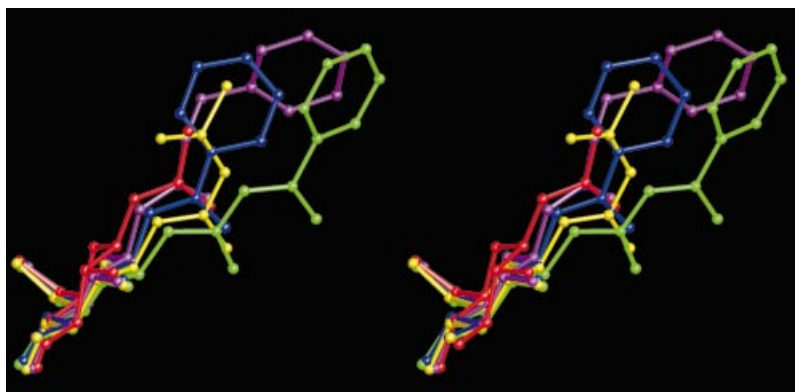


Fig. 6. Comparison of the positions of the inhibitors 1-GlcNAc (red), N-benzoyloxycarbonyl-β-D-glucopyranosylamine (magenta), N-benzylacetyl-β-D-glucopyranosylamine (blue), Acurea (yellow), and Bzurea (green) bound at the catalytic site of GPb.

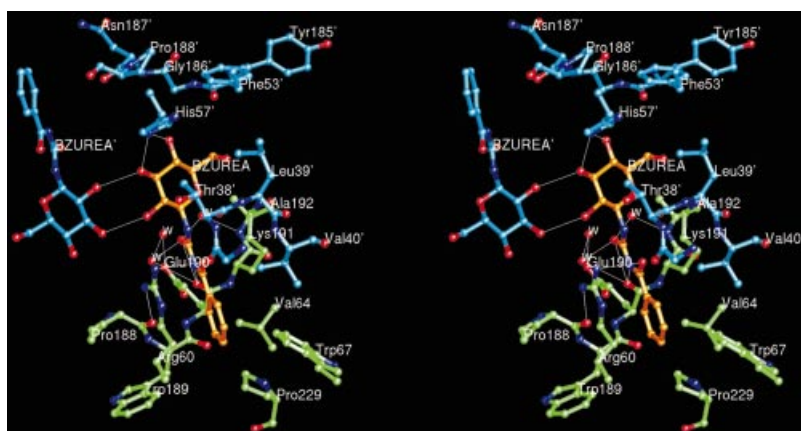


Fig. 7. Interactions between Bzurea, GPb, and water in the vicinity of the new allosteric site. Residues from subunit 1 are shown in green, and their symmetry-related equivalents (from subunit 2) are shown in cyan.

Table 7. Hydrogen bonds between Bzurea and residues of the new allosteric binding site of GPb. Wat141 is hydrogen-bonded to Ala192 N; Wat248 is hydrogen-bonded to Asn187 O, Glu190 O, Glu190 OE1 (through Wat140), and Asn187 N and Glu190 OE1 (through Wat158).

Inhibitor atom	Protein atom	Distance (Å)
O2	BZA1920 O3	3.0
O3	His57'NE2	2.9
	BZA1920 O2	3.0
O4	His57'NE2	3.3
O6	Lys191 NZ	(3.4)
O7	Wat141	2.8
	Wat248	2.8
N2	Glu190 O	2.9
O8	Arg60 NH1	3.2

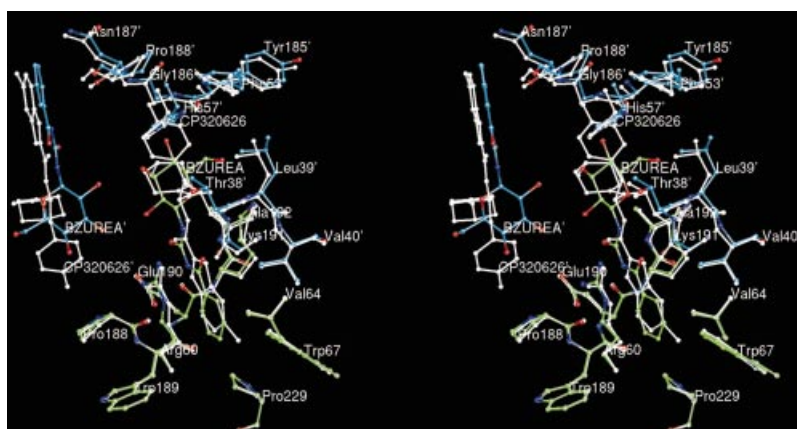
ligand. It seems therefore that the new allosteric site is not the primary binding site for Bzurea.

In conclusion, this study provides high-resolution structures of GPb complexed with two substituted ureas of β -D-glucose, Acurea and Bzurea. There is a significant rearrangement of the 280s loop within the catalytic site on binding Bzurea, which is not seen in the interaction with Acurea. An additional significant feature of binding of the two ureas is the absence of a hydrogen bond to the main-chain O of His377, which is present in all substituted β -D-glucopyranosylamines studied so far. The present results indicate that Bzurea can also occupy the new allosteric inhibitor site, which is highly specific for indole-2-carboxamide inhibitors [7,9], that is currently a target for the development of hypoglycaemic drugs [26]. These observations will be of value in the design of further potent and specific inhibitors of the enzyme.

Table 8. Van der Waals contacts between Bzurea and residues of the new allosteric binding site of GPb.

Inhibitor atom	Protein atom	No of contacts
O5	Lys191 CE,NZ; Wat141; Thr38' O	4
C1	Thr38' O	1
C2	Thr38' O,CG2	2
O2	Arg60 NH1; BZA1920 C3,O2	3
C3	His57'NE2; BZA1920 O2	2
O3	Thr38' CG2; His57' CD2,CE1,NE2	4
C4	His57' CE1,NE2	2
O4	His57' CE1,NE2	2
C6	Wat284'	1
O6	Leu39' CD1; Wat284'	2
N1	Lys191 CD; Thr38' O	2
C7	Lys191 CD; Glu190 O; Wat141; Wat248	4
O7	Glu190 O	1
N2	Arg60 CZ,NH2; Glu190 C,O; Lys191 CA,CB,CD	7
C8	Arg60 NE,CZ,NH1,NH2; Glu190 O; Lys191 CD	6
O8	Arg60 NE,CZ; Phe37' O; Thr38' O; Val40' CG2	5
C9	Arg60 CD,NE,CZ	3
C10	Arg60 CG,CD,NE; Val64 CG2; Wat191; Val40' CG2	6
C11	Arg60 CG,CD,O; Val64 CG2; Wat191	5
C12	Arg60 CG,CD; Trp67 CE3, CZ3; Pro229 CG	5
C13	Arg60 CG,CD; Trp67 CZ3; Trp189 C,O; Pro229 CD,CG	7
C14	Arg60 CD; Pro188 O; Trp189 C,O; Glu190 C,O	6
Total		80

Fig. 8. Stereo diagram showing a comparison of Bzurea bound to GPb with CP320626 bound to GPb in the vicinity of the new allosteric site. Green: GPb–Bzurea complex (subunit 1); cyan: GPb–Bzurea complex (subunit 2); white: GPb–glucose–CP320626 complex. All figures were produced using XOBJECTS (M. E. M. Noble, Laboratory of Molecular Biophysics, University of Oxford, UK, unpublished results).



ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Greek GSRT (PENED1999, 99ED237), the Joint Research and Technology project between Greece and Hungary (2000–2002) (to N. G. O. and P. G.), the Hungarian Academy of Sciences and CNRS, France supporting the collaboration of L. S. and J. P. P., the Hungarian Ministry of Education (FKFP 423/2000), the Hungarian Ministry of Health (ETT 01/2000), the Zsigmond Diabetes Foundation (Hungary), the EMBL Hamburg Outstation through the IHPP (HPRI-CT-1999-00017), and the SRS Daresbury Laboratory through the (IHPP HPRI-CT-1999-00012).

REFERENCES

- Martin, J.L., Veluraja, K., Johnson, L.N., Fleet, G.W.J., Ramsden, N.G., Bruce, I., Oikonomakos, N.G., Papageorgiou, A.C., Leonidas, D.D. & Tsitoura, H.S. (1991) Glucose analogue inhibitors of glycogen phosphorylase: the design of potential drugs for diabetes. *Biochemistry* **30**, 10101–10116.
- Watson, K.A., Mitchell, E.P., Johnson, L.N., Son, J.C., Bichard, C.J.F., Orchard, M.G., Fleet, G.W.J., Oikonomakos, N.G., Leonidas, D.D., Kontou, M. & Papageorgiou, A.C. (1994) Design of inhibitors of glycogen phosphorylase: a study of α - and β -C-glucosides and 1-thio- β -D-glucose compounds. *Biochemistry* **33**, 5745–5758.
- Bichard, C.J.F., Mitchell, E.P., Wormald, M.R., Watson, K.A., Johnson, L.N., Zographos, S.E., Koutra, D.D., Oikonomakos, N.G. & Fleet, G.W.J. (1995) Potent inhibition of glycogen phosphorylase by a spirohydantoin of glucopyranose: first pyranose analogues of hydantocidin. *Tetrahedron Letts.* **36**, 2145–2148.
- Oikonomakos, N.G., Kontou, M., Zographos, S.E., Watson, K.A., Johnson, L.N., Bichard, C.J.F., Fleet, G.W.J. & Acharya, K.R. (1995) N-acetyl- α -D-glucopyranosylamine: a potent T state inhibitor of glycogen phosphorylase. A comparison with β -D-glucose. *Protein Sci.* **4**, 2469–2477.
- 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. (1995) Glucose analogue inhibitors of glycogen phosphorylase: from crystallographic analysis to drug prediction using GRID force-field and GOLPE variable selection. *Acta Crystallogr.* **D51**, 458–472.
- Gregoriou, M., Noble, M.E.M., Watson, K.A., Garman, E.F., Krulle, T.M., Fuente, C., Fleet, G.W.J., Oikonomakos, N.G. & Johnson, L.N. (1998) The structure of a glycogen phosphorylase glucopyranose spirohydantoin complex at 1.8 Å resolution and 100 K: the role of the water structure and its contribution to binding. *Protein Sci.* **7**, 915–927.
- Oikonomakos, N.G., Skamnaki, V.T., Tsitsanou, K.E., Gavalas, N.G. & Johnson, L.N. (2000) A new allosteric site in glycogen phosphorylase *b* as a target for drug interactions. *Structure* **8**, 575–584.
- Oikonomakos, N.G., Zographos, S.E., Skamnaki, V.T., Tsitsanou, K.E. & Johnson, L.N. (2000) Flavopiridol inhibits glycogen phosphorylase by binding at the inhibitor site. *J. Biol. Chem.* **275**, 34566–34573.
- Rath, V.L., Ammirati, M., Danley, D.E., Ekstrom, J.L., Gibbs, E.M., Hynes, T.R., Mathiowetz, A.M., McPherson, R.K., Olson, T.V., Treadway, J.L. & Hoover, D.J. (2000) Human liver glycogen phosphorylase inhibitors bind at a new allosteric site. *Chem. Biol.* **7**, 677–682.
- Johnson, L.N., Hajdu, J., Acharya, K.R., Stuart, D.I., McLaughlin, P.J., Oikonomakos, N.G. & Barford, D. (1989) Glycogen phosphorylase *b*. In *Allosteric Enzymes* (Herve, G., ed.), pp. 81–127. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Sprang, S.R., Acharya, K.R., Goldsmith, E.J., Stuart, D.I., Varvill, K., Fletterick, R.J., Madsen, N.B. & Johnson, L.N. (1988) Structural changes in glycogen phosphorylase induced by phosphorylation. *Nature (London)* **336**, 215–221.
- Barford, D. & Johnson, L.N. (1989) The allosteric transition of glycogen phosphorylase. *Nature (London)* **340**, 609–616.
- Barford, D., Hu, S.H. & Johnson, L.N. (1991) Structural mechanism for glycogen phosphorylase control by phosphorylation and AMP. *J. Mol. Biol.* **218**, 233–260.
- Sprang, S.R., Withers, S.G., Goldsmith, E.J., Fletterick, R.J. & Madsen, N.B. (1991) Structural basis for activation of glycogen phosphorylase *b* by adenosine monophosphate. *Science* **254**, 1367–1371.
- Johnson, L.N. (1992) Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors. *FASEB J.* **6**, 2274–2282.
- Oikonomakos, N.G., Acharya, K.R. & Johnson, L.N. (1992) Rabbit muscle glycogen phosphorylase *b*: structural basis of activation and analysis. In *Post-Translational Modification of Proteins* (Harding, J.J. & Crabbe, M.J.C., eds), pp. 81–151. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- O'Reilly, M., Watson, K.A., Schinzel, R., Palm, D. & Johnson, L.N. (1997) Oligosaccharide substrate binding in *Escherichia coli* maltodextrin phosphorylase. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 405–412.
- Watson, K.A., Schinzel, R., Palm, D. & Johnson, L.N. (1997) The crystal structure of *Escherichia coli* maltodextrin phosphorylase provides an explanation for the activity without control in this basic archetype of a phosphorylase. *EMBO J.* **16**, 1–14.
- Board, M., Hadwen, M. & Johnson, L.N. (1995) Effects of novel analogues of D-glucose on glycogen phosphorylase activities in crude extracts of liver and skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.* **228**, 753–761.

20. Board, M., Bollen, M., Stalmans, W., Kim, Y., Fleet, G.W.J. & Johnson, L.N. (1995) Effects on a C1 substituted glucose analogue on the activation states of glycogen synthase and glycogen phosphorylase in rat hepatocytes. *Biochem. J.* **311**, 845–852.
21. Ösz, E., Somsák, L., Szilágyi, L., Kovács, L., Docsa, T., Tóth, B. & Gergely, P. (1999) Efficient inhibition of muscle and liver glycogen phosphorylases by a new glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**, 1385–1390.
22. Somsák, L., Nagy, V., Docsa, T., Tóth, B. & Gergely, P. (2000) Gram-scale synthesis of a glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin and its effect on hepatic glycogen metabolism studied *in vitro* and *in vivo*. *Tetrahedron: Asym.* **11**, 409–412.
23. Oikonomakos, N.G., Skamnaki, V.T., Ösz, E., Szilágyi, L., Somsák, L., Docsa, T., Tóth, B. & Gergely, P. (2001) Kinetic and crystallographic studies of glucopyranosylidene spiro-thiohydantoin binding to glycogen phosphorylase *b*. *Bioorg. Med. Chem.* **10**, 261–268.
24. Ainston, S., Hampson, L., Gomez-Foix, A.M., Guinovart, J.J. & Agius, L. (2001) Hepatic glycogen synthesis is highly sensitive to phosphorylase activity: evidence from metabolic control analysis. *J. Biol. Chem.* **276**, 23858–23866.
25. Somsák, L., Kovács, L., Tóth, M., Ösz, E., Szilágyi, L., Györgydeák, Z., Dinya, Z., Docsa, T., Tóth, B. & Gergely, P. (2001) Synthesis of and a comparative study on the inhibition of muscle and liver glycogen phosphorylases by epimeric pairs of D-glucopyranosylidene-spiro-(thio)hydantoins and N-(D-glucopyranosyl) amides. *J. Med. Chem.* **44**, 2843–2848.
26. Treadway, J.L., Mendys, P. & Hoover, D.J. (2001) Glycogen phosphorylase inhibitors for treatment of type 2 diabetes mellitus. *Exp. Opin. Invest. Drugs* **10**, 439–454.
27. Helmreich, E.J.M. & Cori, C.F. (1964) The role of adenylic acid in the activity of phosphorylase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **51**, 131–138.
28. Oikonomakos, N.G., Melpidou, A.E. & Johnson, L.N. (1985) Crystallisation of pig skeletal phosphorylase *b*. Purification, physical and catalytic characterization. *Biochim. Biophys. Acta* **832**, 248–256.
29. Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997) Processing of x-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **276**, 307–326.
30. Brunger, A.T. (1992) X-PLOR, Version 3.1. *A System for X-Ray Crystallography and NMR*. Yale University Press, New Haven, CT, USA.
31. Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T. & Warren, G.L. (1998) Crystallography and NMR system; A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr.* **D54**, 905–921.
32. Luzatti, V. (1952) Traitement statistique des erreurs dans la détermination des structure cristallines. *Acta Crystallogr.* **5**, 802–810.
33. Hubbard, S.J. & Thornton, J.M. (1993) *NACCESS, Computer Program*. Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College London, London, UK.
34. McDonald, I.K. & Thornton, J.M. (1994) Satisfying hydrogen bonding potential in proteins. *J. Mol. Biol.* **238**, 777–793.
35. Barford, D., Schwabe, J.W.R., Oikonomakos, N.G., Acharya, K.R., Hajdu, J., Papageorgiou, A.C., Martin, J.L., Knott, J.C.A., Vasella, A. & Johnson, L.N. (1988) Channels at the catalytic site of glycogen phosphorylase *b*: binding and kinetic studies with the β -glycosidase inhibitor D-gluconohydroxymo-1,5-lactone *N*-phenylurethane. *Biochemistry* **27**, 6733–6741.
36. Watson, K.A., McCleverty, C., Geremia, S., Cottaz, S., Driguez, H. & Johnson, L.N. (1999) Phosphorylase recognition and phosphorylation of its oligosaccharide substrate: answers to a long outstanding question. *EMBO J.* **17**, 4619–4632.
37. Palm, D., Goerl, R. & Burger, K.J. (1985) Evolution of catalytic and regulatory sites in phosphorylase. *Nature (London)* **313**, 500–502.

Effect of glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin on the enzymes of hepatic glycogen metabolism in rats

T. Docsa, B. Tóth, L. Somsák* and P. Gergely

*Department of Medical Chemistry, Medical and Health Science Center, *Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, University of Debrecen
H-4026 Debrecen, Bem tér 18/B, Hungary*

In muscle and liver, the accumulation and breakdown of glycogen are regulated by the reciprocal activities of glycogen phosphorylase and glycogen synthase. The control of these enzymes can occur by reversible phosphorylation, by hormonal and neuronal stimulation and by allosteric effectors. The major role of liver glycogen is to supply glucose to the circulation maintaining the normal blood glucose level. Glycogen phosphorylase catalyses the key step of glycogen degradation and its activity can be inhibited by glucose and its analogues. Obviously, any readily accessible inhibitor of glycogen phosphorylase can be used as a potential therapy of non-insulin-dependent or type 2 diabetes. Enzyme assays with *a* and *b* forms of muscle and liver glycogen phosphorylases showed spiro-hydantoin and spiro-thiohydantoin derivatives of glucose to be the best and equipotent inhibitors with K_i values in the low micromolar range. The study of epimeric pairs of D-glucose and D-xylo configured spiro-hydantoins corroborated the role of specific hydrogen bridges in binding the inhibitors to the enzyme.

1. INTRODUCTION

Type 2 diabetes (non-insulin-dependent diabetes mellitus) is a prevalent disease, afflicting about 140 million people world-wide [1]. The disease is characterized by chronic hyperglycaemia and insulin resistance. Type 2 diabetes can be treated with lifestyle changes (diet and exercise, for example), with drugs that promote insulin release and with insulin. Tight control of blood glucose level prevents and delays the onset of diabetic complications but such a control is rarely achieved with oral antidiabetic agents. Safer and more effective therapy is urgently needed [2]. Glycogen phosphorylase (GP; EC 2.4.1.1) appears as a potential target for such efforts because of its essential roles in glycogen metabolism and control of hepatic glucose output [3].

The liver is the predominant source of blood glucose in fasting type 2 diabetes. Hepatic glucose output is regulated by a complex system of enzymes. The main regulatory enzyme of this system is glycogen phosphorylase and only the phosphorylated enzyme (GP_a) has significant activity. GP_a releases glucose-1-phosphate from glycogen as shown in Fig. 1 suggesting an important role for glycogenolysis in hepatic glucose production. Gluconeogenesis from lactate and other precursor molecules can also contribute to the elevated blood glucose levels, however, it was clearly demonstrated that glucose arising

from gluconeogenesis has cycled through glycogen. Therefore the inhibition of hepatic GP could suppress glucose production arising from both glycogenolysis and gluconeogenesis [4].

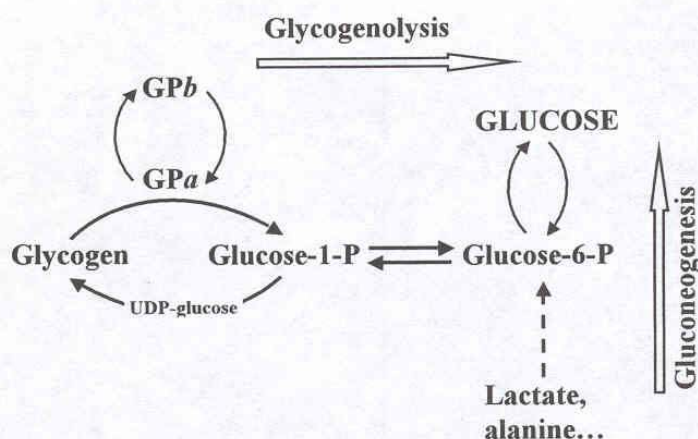


Figure 1. Some details of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis. GPa and GPb represent the phosphorylated, active form and nonphosphorylated, inactive form of the enzyme, respectively.

The above enzyme system is under hormonal, neuronal, and metabolic control [5]. Positive effectors promote degradation of glycogen (e.g. glucagon, AMP), while negative effectors (e.g. glucose, glucose-6-phosphate, ATP) retard degradation. The catalytic activity of GP can be inhibited by glucose and other glucose-based compounds, which bind at the active site [3,6-8], and by caffeine and analogous heteroaromatic derivatives which bind at the purine inhibitory site, also called the I-site. Very recently an indole carboxamide derivative (CP-91149) has been shown to be an efficient inhibitor of recombinant human liver glycogen phosphorylase and it also lowers blood glucose level *in vivo* [9].

2. RESULTS AND DISCUSSION

In order to find potent glucose analogue inhibitors of GP extensive synthetic [5,10-12], crystallographic [6,13-16], molecular modelling [5,7,8,13,17], and enzymological [5-8,10,11] studies have been carried out. As a result of these investigations a glucopyranosylidene-spiro-hydantoin emerged as the strongest glucose analogue inhibitor of muscle glycogen phosphorylase *b* known to date [10]. However, the published synthetic routes to the effective glucopyranosylidene-spiro-hydantoin were rather lengthy (10 or more steps from an easily available precursor or the free sugar) and the inhibitor was not accessible in larger quantities in order to carry out more elaborate biological investigations.

We have disclosed full experimental details of a simple, short, highly chemo-, regio-, and stereoselective procedure for the preparation of D-glucopyranosylidene-spiro-(thio)hydantoins [18,21], which was also, applied for the synthesis of their D-xylo configured analogues [21]. The synthetic sequence used for the preparation of the spiro-thiohydantoin derivative is outlined in Fig. 2 which also shows its improved version facilitating accumulation of this compound in gram quantities [19,20].

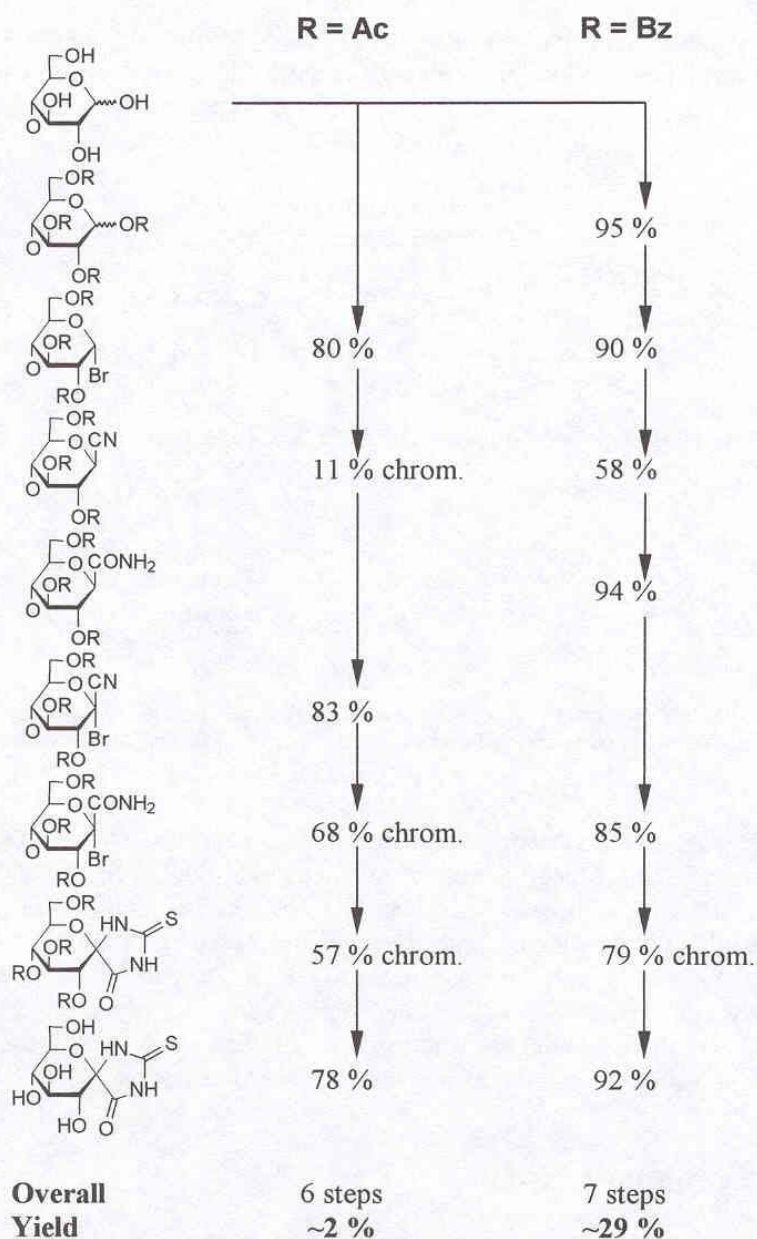


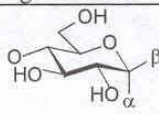
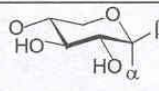
Figure 2. Syntheses of the glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin (Ac = CH₃CO, Bz = C₆H₅CO; chrom. indicates the necessity of column chromatographic purification)

Kinetic data obtained with muscle and liver glycogen phosphorylases for glucose analogue inhibitors demonstrate that such compounds may possess hypoglycemic activity. Furthermore, investigation of D-xylo configured compounds shed light on the importance of a particular H-bond between the enzyme and the inhibitor.

The kinetic studies with glycogen phosphorylases were performed as described previously with the exception, that higher D-glucose-1-phosphate concentrations (between 12.5 and 100 mM) were used for the assay of liver phosphorylases [18]. Kinetic data for the inhibition of phosphorylases by monosaccharide compounds at varying concentrations of

D-glucose-1-phosphate and constant concentration of glycogen were presented in the form of double-reciprocal plot (Lineweaver-Burk). The plots were analysed by a non-linear data-analysis program. The inhibitor constants (K_i) were determined by Dixon plots, replotting the slopes from the Lineweaver-Burk plot against the effector concentrations. The means of standard errors for all calculated kinetic parameters averaged to less than 10% [18,19].

Table 1. Inhibitor constants (K_i) of monosaccharide derivatives for muscle glycogen phosphorylase *b*

Entry	Sugar skeleton	Anomeric substituent		K_i [μ M]	Ref
		α	β		
1.			CONH-CONH	3.1	[10]
				4.2	[18,21]
2.			CONH-CSNH	5.1	[18,21]
3.			NHCO-NHCO	320	[11]
				105	[18,21]
4.		OH	CONH ₂	3100	[20]
5.		H	OH	7400	[5]
6.		OH	H	1700	[5]
7.		H	CONH ₂	440	[6]
8.		CONH ₂	H	370	[6]
9.			CONH-CONH	11500	[21]
10.			CONH-CSNH	>10000*	[21]
11.			NHCO-NHCO	>10000*	[21]

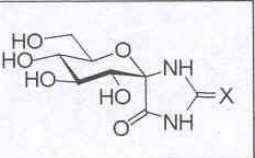
*Because of insufficient sample quantity no precise value could be obtained.

Inhibitor constants (K_i) determined with muscle GP*b* for compounds with D-glucose or D-xylose skeletons are summarized in Table 1. The glucopyranosylidene-spiro-hydantoin and its 8-thio analogue have been identified as the highest affinity inhibitors of muscle GP*b* [10,18] and α [18] (Table 1, Entries 1, 2). These findings are supported by X-ray studies underlying the significance of a H-bond between N-7-H of the hydantoin ring and the peptide backbone oxygen of His377 [14]. This important H-bridge has been shown to be present in the muscle GP*b*-thiohydantoin complex as well [22]. The epimeric hydantoin is obviously devoid of this interaction with the enzyme and, in agreement with published data [11], it proved less efficient inhibitor (Entry 3). Hydroxy amide (Entry 4) proved to be a weak inhibitor. This seems to be surprising when compared to α -D-glucose and β -carboxamide, which show stronger inhibition and have the hydroxyl and the carboxamido groups in the same position (Entries 6 and 7, respectively). The joint presence of these moieties at the anomeric centre is clearly highly detrimental for the binding. Changing the configuration of the sugar ring from D-gluco to D-xylo, that is removal of the hydroxymethyl side chain, brought about a decrease of four orders of magnitude in the

inhibition (Entries 9-11). This is in keeping with earlier data obtained with 6-deoxy-D-glucose [23] and clearly indicates the importance in binding of an optimal hydrogen bond between the side chain of His377 in the enzyme and the oxygen of the hydroxymethyl side chain in the inhibitor revealed by X-ray studies [14,22].

Potential antidiabetic compounds should exert their inhibitory action on the active α form of glycogen phosphorylase, and especially important is their effect on the hepatic enzymes. Therefore, inhibitor constants for spiro-hydantoin (**H**) and spiro-thiohydantoin (**TH**) which had the highest inhibitory activity against muscle GPb were also determined for muscle GP α and liver phosphorylases *b* and *a* (Table 2).

Table 2. Inhibitor constants (K_i) of spiro-(thio)hydantoins for muscle and liver glycogen phosphorylases

	K_i , [μ M]			
	liver GPb	liver GP α	muscle GPb	muscle GP α
O (hydantoin, H)	12.8 $\pm$ 1.1	16.5 $\pm$ 1.3	4.2 $\pm$ 0.4	26.0 $\pm$ 2.4
S (thiohydantoin, TH)	7.0 $\pm$ 0.6	29.8 $\pm$ 2.9	5.1 $\pm$ 0.5	10.9 $\pm$ 1.0

The inhibitor constant of **H** for muscle GPb was already known [10] but no data were available for the physiologically active α forms of muscle and liver phosphorylases. The newly synthesized spiro-thiohydantoin derivative of D-glucose (**TH**) was found to be a very potent inhibitor of muscle and liver GPb and α . The muscle GP α was somewhat less inhibited by **H** than the *b* form. The hepatic GPb and α forms were efficiently inhibited by both **H** and **TH**, however, the thio-analogue **TH** was less inhibitory for the active α form.

It is known that glucose and glucose analogues cause a sequential inactivation (dephosphorylation) of liver GP α and activation (dephosphorylation) of glycogen synthase *b* (GSb), for references see [24]. We also tested the coordinated regulation of GP and GS in gel-filtered rat liver extract. Fig. 3A illustrates the effect of 20 mM D-glucose and 50 μ M **TH** on the dephosphorylation of GP α in gel-filtered rat liver extract catalysed by phosphorylase phosphatase [19]. Both ligands can enhance the dephosphorylation (inactivation) of hepatic GP α , however, **TH**, applied in a much lower concentration, seems to be more effective. Fig. 3B demonstrates the effect of either glucose or **TH** on the dephosphorylation (activation) of GS in gel-filtered rat liver extract. It can be seen that **TH** significantly increases the active form of GS in liver by significantly decreasing the latency in the dephosphorylation of GS.

The results presented here show that **TH** promotes the dephosphorylation of hepatic GP α in cell extracts. The effects of **TH** on GP and GS confirm the sequential mechanism as originally suggested for liver extracts [25]. The mechanism by which **TH** inactivates GP α and activates GS may be complex and requires further experiments. However, the observed effects of **TH** clearly indicate that this compound and its analogues can be of potential use in controlling hyperglycaemia.

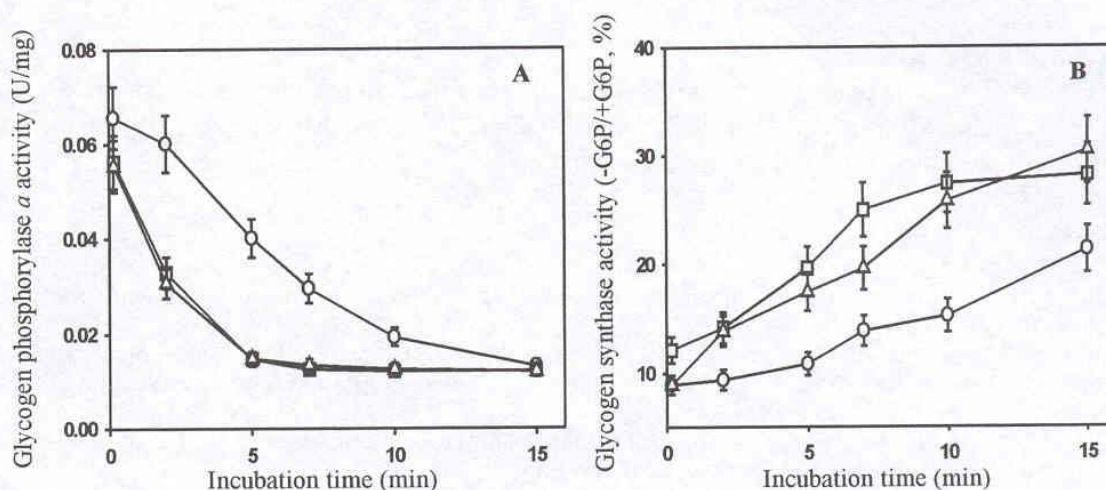


Fig 3. Effect of TH on the dephosphorylation of glycogen phosphorylase *a* (A) and glycogen synthase *b* (B) in gel-filtered liver extract. Post-mitochondrial supernatants were prepared and filtered through Sephadex G-25 as described. The filtrates were supplemented with 5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and 1 mM magnesium acetate (○) in the presence of 20 mM D-glucose (□) or 50 μM TH (△). The filtrates were incubated at 30 °C and samples were withdrawn at the indicated times for the assay of GP α or GS [26]. The results are mean values $\pm$ S.D. of four independent experiments.

3. CONCLUSION

Type 2 diabetes is a prevalent disease that is characterized by chronic elevated blood glucose level and resistance to the action of insulin and/or a deficiency in the secretion of insulin. Maintaining control of blood glucose levels is critical in minimizing the debilitating effects of diabetes. There is a search for compounds that can improve therapy. Liver GP has been identified as a new target for drugs that control blood glucose concentration. Several compounds with different chemical structures have been probed for the inhibition of hepatic GP. Glucose and its analogues were shown to be potent inhibitors of the enzyme. Glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin (TH) was found as one of the most potent glucose derivate which inhibits the catalytic activity of both muscle and liver GP enzymes [18,19]. The synthetic procedure allows the stereoselective preparation to produce gram quantities of TH in six-seven steps starting from D-glucose [21]. The structure of GP β -TH complex as revealed by X-ray studies demonstrates that the inhibitor can be accumulated in the catalytic site of T-state GP β with very little change of the tertiary structure, and provides a basis for understanding potency and specificity of the TH [22].

A new binding site in human liver GP for a class of promising antidiabetic agents was identified crystallographically [27,28]. The site is novel and functions allosterically by stabilizing the inactive conformation of GP inspiring the design of a new class of inhibitors, which bind with nanomolar affinity [27], and should accelerate efforts to develop therapeutically relevant molecules for the treatment of diabetes.

Acknowledgements

This work was supported by the Hungarian Scientific Research Fund (Grant: OTKA T26541), the Ministry of Education (Grant: 423/2000), the Ministry of Health (Grant: 01/2000), and the Zsigmond Diabetes Foundation.

4. REFERENCES

- [1] R. A. DeFronzo, Pharmacologic Therapy for Type 2 Diabetes Mellitus. *Ann. Intern. Med.* 131 (1999) 281-303.
- [2] C. Abaira et al., Veterans Affairs Cooperative Study on Glycemic Control and Complications in Type II Diabetes (VA CSDM). Results of Feasibility Trial. Veterans Affairs Cooperative Study in Type II Diabetes. *Diabetes Care* 18 (1995) 1113-1123.
- [3] J. L. Martin et al., Glucose Analogue Inhibitors of Glycogen Phosphorylase: The Design of Potential Drugs for Diabetes. *Biochemistry* 30 (1991) 10101-10116.
- [4] D. J. Hoover et al., Indole-2-carboxamide Inhibitors of Human Liver Glycogen Phosphorylase. *J. Med. Chem.* 41 (1998) 2934-2938.
- [5] M. Bollen et al., Specific Features of Glycogen Metabolism in the Liver. *Biochem. J.* 336 (1998) 19-31.
- [6] K. A. Watson et al., Design of Inhibitors of Glycogen Phosphorylase: A Study of α - and β -C-Glucosides and 1-Thio- β -D-glucose Compounds. *Biochemistry* 33 (1994) 5745-5758.
- [7] Y. S. Agasimundin et al., Inhibitors of Glycogen Phosphorylase b: Synthesis, Biochemical Screening, and Molecular Modeling Studies of Novel Analogues of Hydantocidin. *Bioorg. Med. Chem.* 6 (1998) 911-923.
- [8] N. G. Oikonomakos et al., The Design of Potential Antidiabetic Drugs: Experimental Investigation of a Number of β -D-Glucose Analogue Inhibitors of Glycogen Phosphorylase. *Eur. J. Drug Metabol. Pharmacokinet* (1994) 185-192.
- [9] W. H. Martin et al., Discovery of a Human Liver Glycogen Phosphorylase Inhibitor that Lowers Blood Glucose in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 1776-1781.
- [10] C. J. F. Bichard et al., Potent Inhibition of Glycogen Phosphorylase by a Spirohydantoin of Glucopyranose: First Pyranose Analogues of Hydantocidin. *Tetrahedron Lett.* 36 (1995) 2145-2148.
- [11] T. M. Krülle et al., Stereospecific Synthesis of Spirohydantoins of β Glucopyranose: Inhibitors of Glycogen Phosphorylase. *Synlett* (1997) 211-213.
- [12] C. Fuente et al., Glucopyranose Spirohydantoins: Specific Inhibitors of Glycogen Phosphorylase. *Synlett* (1997) 485-487.
- [13] K. A. Watson et al., Glucose Analogue Inhibitors of Glycogen Phosphorylase: from Crystallographic Analysis to Drug Prediction using GRID Force-Field and GOLPE Variable Selection. *Acta Cryst. D* 51 (1995) 458-472.
- [14] M. Gregoriou et al., The Structure of a Glycogen Phosphorylase Glucopyranose Spirohydantoin Complex at 1.8 Å Resolution and 100 K: The Role of the Water Structure and its Contribution to Binding. *Protein Sci.* 7 (1998) 915-927.
- [15] N. G. Oikonomakos et al., N-Acetyl- β -D-glucopyranosylamine: A Potent T State Inhibitor of Glycogen Phosphorylase. A Comparison with α -D-Glucose. *Protein Sci.* 4 (1995) 2469-2477.
- [16] L. N. Johnson et al., Refined Crystal Structure of the Phosphorylase-Heptulose 2-Phosphate-Oligosaccharide-AMP Complex. *J. Mol. Biol.* 211 (1990) 645-661.
- [17] M. Pastor et al., Smart Region Definition: A New Way to Improve the Predictive Ability and Interpretability of Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationships. *J. Med. Chem.* 40 (1997) 1455-1464.
- [18] E. Ősz et al., Efficient Inhibition of Muscle and Liver Glycogen Phosphorylases by a New Glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9 (1999) 1385-1390.
- [19] L. Somsák et al., Gram-Scale Synthesis of a Glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin and its Effect on Hepatic Glycogen Metabolism Studied in vitro and in vivo. *Tetrahedron: Asymmetry* 11 (2000) 405-408.
- [20] L. Somsák and V. Nagy, A New, Scalable Preparation of a Glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin: One of the Best Inhibitors of Glycogen Phosphorylases. *Tetrahedron: Asymmetry* 11 (2000) 1719-1727.
- [21] L. Somsák et al., Synthesis of and a Comparative Study on the Inhibition of Muscle and Liver Glycogen Phosphorylases by Epimeric Pairs of D-Gluco- and D-Xylopyranosylidene-spiro-(thio)hydantoins and N-(D-Glucopyranosyl) Amides (submitted for publication).

- [22] N. G. Oikonomakos et al., Kinetic and Crystallographic Studies of Glucopyranosylidene Spirothiohydantoin Binding to Glycogen Phosphorylase b (submitted for publication).
- [23] I. P. Street et al., Hydrogen Bonding and Specificity. Fluorodeoxy Sugars as Probes of Hydrogen Bonding in the Glycogen Phosphorylase-Glucose Complex. *Biochemistry* 25 (1986) 6021-6027.
- [24] W. Stalmans et al., Control of Glycogen Synthesis in Health and Disease. *Diabetes Metab. Rev.* 1 (1987) 127-161.
- [25] W. Stalmans et al., The Sequential Inactivation of Glycogen Phosphorylase and Activation of Glycogen Synthetase in Liver After the Administration of Glucose to Mice and Rats. The Mechanism of the Hepatic Threshold to Glucose. *Eur. J. Biochem.* 41 (1974) 117-134.
- [26] B. Tóth et al., Comparative Characterization of Liver Glycogen Metabolism in Rat and Guinea-pig. *Comp. Biochem. Physiol.* 103 (1992) 547-552.
- [27] V. L. Rath et al., Human Liver Glycogen Phosphorylase Inhibitors Bind at a New Allosteric Site. *Chem. Biol.* 9 (2000) 677-682.
- [28] N. G. Oikonomakos et al., A New Allosteric Site in Glycogen Phosphorylase b as a Target for Drug Interactions. *Structure Fold. Des.* 6 (2000) 575-584.

EFFICIENT INHIBITION OF MUSCLE AND LIVER GLYCOGEN PHOSPHORYLASES BY A NEW GLUCOPYRANOSYLIDENE-SPIRO- THIOHYDANTOIN

Erzsébet Ósz^a, László Somsák^{a*}, László Szilágyi^a, László Kovács^a, Tibor Docsa^b, Béla Tóth^b,
Pál Gergely^b

^aDepartment of Organic Chemistry, Lajos Kossuth University, P.O.B. 20., H-4010, Debrecen, Hungary,

^bDepartment of Medical Chemistry, University Medical School of Debrecen, H-4026, Debrecen, Hungary

Received 8 March 1999; accepted 2 April 1999

Abstract: Reaction of C-(1-bromo-1-deoxy- β -D-glucopyranosyl)formamide **2** with thiocyanate ions was the key step of a short synthesis of D-glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin **7** which proved to be a potent inhibitor of muscle and liver glycogen phosphorylases. © 1999 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Non-insulin dependent *diabetes mellitus* (NIDDM or Type II diabetes) can be controlled mainly by dietary regulation and with the use of hypoglycaemic agents.¹ Blood glucose concentration, however, cannot be regulated very efficiently by these methods. Therefore, considerable efforts have been made to understand the action and elicit inhibition, using glucose derivatives, of glycogen phosphorylase (GP) the main regulatory enzyme of blood sugar level.^{2,6} The most potent inhibitor, known to date, of muscle GPb is a glucopyranosylidene-spiro-hydantoin derivative⁷ **5** ($K_i = 3.1 \pm 0.2 \mu\text{M}$), for which several multistep syntheses have been published.^{2,3,7} Apart from the lengthiness of these synthetic sequences, unfavourable stereoselectivity as well as anomerizations in the intermediates strongly decrease the stereochemical efficiency of this compound's production. It is therefore unlikely that these syntheses will be useful for the preparation of the large amounts of this inhibitor³ required for more elaborate biological investigations. Obviously, any readily available potent inhibitor could facilitate deeper understanding of the mechanism of action of GP and validate the concept of its inhibition as potential therapy of diabetes.

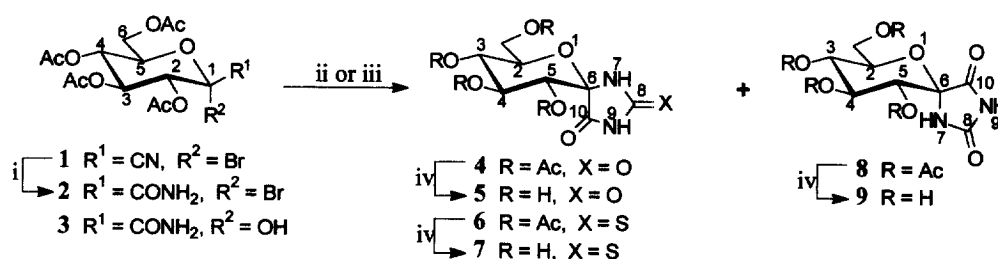
Herein we report the synthesis of a glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin (**7**) based on a six step, simple, highly chemo-, regio-, and stereoselective procedure starting from D-glucose and the kinetic data demonstrating efficient

* Authors to whom correspondence should be addressed – e-mail: somsak@tigris.klte.hu; lszilagyi@tigris.klte.hu;
tel: (+36)52-512-900; fax: (+36)52-453-836.

inhibition of muscle and liver glycogen phosphorylases by this compound.

Chemistry

1-Bromo-1-deoxy- β -D-glucopyranosyl cyanide **1**,⁸ readily available by radical-mediated bromination⁹ of the corresponding acetylated β -D-glucopyranosyl cyanide,¹⁰ was transformed into the C-(1-bromo-1-deoxy- β -D-glucopyranosyl)formamide **2**¹¹ by TiCl_4 mediated partial hydrolysis.^{12,13} Ring closure of **2** was effected by AgOCN in dry nitromethane whereby formation of a mixture of spiro-hydantoins **4**¹¹ and **8**¹¹ (ratio 1 : 10 by ^1H NMR) was observed. Transformation of **2** with AgSCN or KSCN in dry nitromethane gave **6**¹¹ as a single anomer. In each reaction a small amount of **3**¹¹ could be isolated as an unavoidable by-product. Deprotection of **4**, **6**, and **8** under Zemplén-conditions afforded **5**,^{7,11} and **9**,⁷ respectively.



Scheme: i TiCl_4 , H_2O , AcOH , 0°C –r. t.; ii AgOCN (4 eq) dry CH_3NO_2 , 80°C ; iii AgSCN (4 eq) or KSCN (2 eq), dry CH_3NO_2 , 80°C ; iv NaOMe , MeOH , r.t.

Constitution of the spiro-hydantoins was established using NMR methods.^{11,14} Compounds **4**–**9** showed characteristic ^1H and ^{13}C resonances expected for the (thio)hydantoin rings^{14–16} and corresponding long-range $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ correlations were identified in the HMBC spectra. The pyranose ring conformations were deduced from $^3J_{\text{HH}}$ values as $^4\text{C}_1$ for each derivative and the C-6 configurations determined as *S* for **6** and **7** and *R* for **8** on the basis of $^3J_{\text{H-5,C-10}}$ values.¹¹ The ^1H and ^{13}C NMR spectra for **5** and **9** were identical with the reported ones.⁷ The configurational assignments were supported by ^1H chemical shift rules recently established¹³ for spiro-hydantoins.

Kinetic Studies

Glycogen phosphorylase *b* was isolated from rabbit skeletal muscle according to the method of Fischer and Krebs²¹ with the difference of using 2-mercaptoethanol instead of L-cysteine. Phosphorylase kinase was prepared from rabbit skeletal muscle²² for converting muscle phosphorylase *b* into phosphorylase *a* as described in.²³ Hepatic phosphorylase

b and *a* were prepared from rat livers according to the reported method.²⁴ For the preparation of liver phosphorylase *a* glucagon (100 µg/kg) was injected intravenously 30 sec before cutting the jugular veins and 50 mM NaF was added to the buffers to keep the enzyme in the phosphorylated form in all subsequent steps. Liver phosphorylase *b* was prepared from non-glucagonized rats without NaF addition to the buffers. Phosphorylase activities were assayed in the direction of glycogen synthesis at 30°C with 10 µg/ml enzyme, 1% glycogen, in the absence of AMP (muscle or liver phosphorylase *a*) or in the presence of AMP (1 mM AMP for muscle and 2 mM AMP for liver phosphorylase *b*) with or without hydantoins 5, 7, and 9 in 50 mM triethanolamine/HCl (pH 6.8) buffer, 100 mM KCl, 1 mM dithiothreitol and 1 mM EDTA. The kinetic studies were performed as described previously²⁵ with the exception that higher D-glucose 1-phosphate concentrations were used for the assay of liver phosphorylases as suggested by Stalmans and Hers.²⁶ Inhibition of liver phosphorylase *b* by compound 7 according to Lineweaver-Burk is shown in Fig. 1. The inhibitor constant for 7 calculated from a Dixon plot (Fig. 2) is $K_i = 7 \mu\text{M}$.

Figure 1

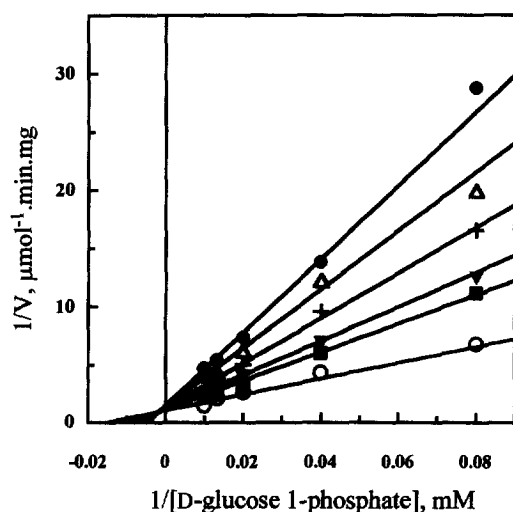


Figure 2

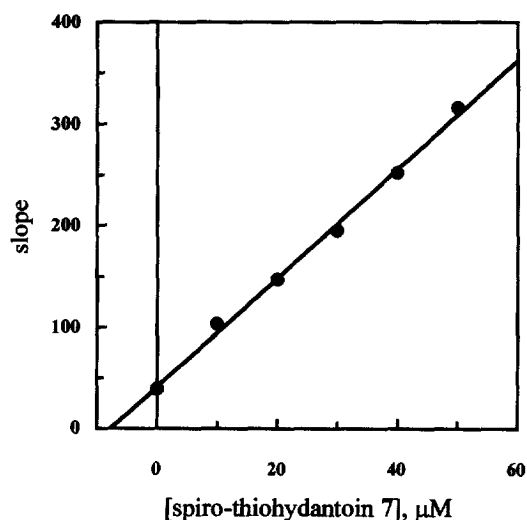


Figure 1. Double-reciprocal plot for liver phosphorylase *b* at constant concentrations of AMP (1 mM) and glycogen (1%), and varying concentrations of D-glucose 1-phosphate. Concentrations of 7 were as follows: 0 (○), 10 (■), 20 (▼), 30 (+), 40 (Δ) and 50 µM (●). The plots were analysed by a non-linear data-analysis program.²⁷

Figure 2. Determination of K_i value by reploting the slopes in Figure 1 against the inhibitor concentrations.²⁸ The means of standard errors for all calculated kinetic parameters averaged to less than 10%.

Inhibitor constants (K_i) of thiohydantoin **7** for muscle and liver phosphorylases are summarized in Table 1. For comparison, inhibitor constants of hydantions **5** and **9** determined with muscle and liver phosphorylases are also presented together with those published previously^{2,7} for muscle phosphorylase *b*. Compound **5** proved to be a potent inhibitor as described before,⁷ the epimeric **9** was, however, found to be more effective than reported.² Liver phosphorylase *a* was only slightly inhibited by **9**. It can be concluded that phosphorylase *a* activities (assays in the absence of AMP) are less sensitive to the inhibitory action of compounds **5** or **7**.

Table 1.
Inhibitor constants (K_i [μ M]) of spiro-(thio)hydantions **5**, **7**, and **9** for muscle and liver phosphorylases

Type of phosphorylase	5	7	9
Liver phosphorylase <i>b</i>	12.8 $\pm$ 1.1	7.0 $\pm$ 1.0	n. d.*
Liver phosphorylase <i>a</i>	16.5 $\pm$ 1.3	29.8 $\pm$ 2.9	2050 $\pm$ 180
Muscle phosphorylase <i>b</i>	4.2 $\pm$ 0.4 (3.1 $\pm$ 0.2 ⁷)	5.1 $\pm$ 0.5	105 $\pm$ 9 (320 ²)
Muscle phosphorylase <i>a</i>	26.0 $\pm$ 2.4	10.9 $\pm$ 1.0	n. d.*

*not determined

Conclusion

The newly synthesized spiro-thiohydantoin derivative of D-glucose (**7**) was found to be a very potent inhibitor of muscle and liver glycogen phosphorylases *b* and *a*. The inhibitory efficiency of **7** is comparable to that of the best substance (**5**) known for this purpose to date. Due to the minor difference in the structures of **5** and **7** the important hydrogen bond between N7-H and His377, detected by X-ray crystallography for muscle GP*b*–**5** complex,²⁹ may also exist in the enzyme–**7** complexes resulting in similar inhibitions. Purified liver phosphorylases were used for the first time in our experiments implying a potential role of inhibitors in the hepatic glycogen metabolism.

Acknowledgements

This work was supported by the Hungarian National Science Foundation (OTKA T 19339, T 23814, T26541), the Ministry of Education (FKFP 500/1997, FKFP 784/1997), the Ministry of Health (ETT T-02/150/98), the Zsigmond Diabetes Foundation of the Hungarian Academy of Sciences, and in part by OMF (F-7/96) in Hungary and Le Ministère des Affaires Étrangères (France). We thank dr. Z. Dinya for the FAB-MS measurements.

References and Notes

- Hengesh, E. J. *Drugs Affecting Sugar Metabolism*. In: *Principles of Medicinal Chemistry*; Foye, W. O.; Lemke, T. L.; Williams, D. A. Eds.; Williams and Wilkins: Baltimore, 1995; pp 581–600.
- Krülle, T. M.; de la Fuente, C.; Watson, K. A.; Gregoriou, M.; Johnson, L. N.; Tsitsanou, K. E.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G.; Fleet, G. W. J. *Synlett* **1997**, 211–213.
- de la Fuente, C.; Krülle, T. M.; Watson, K. A.; Gregoriou, M.; Johnson, L. N.; Tsitsanou, K. E.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G.; Fleet, G. W. J. *Synlett* **1997**, 485–487.
- Krülle, T. M.; de la Fuente, C.; Pickering, L.; Aplin, R. T.; Tsitsanou, K. E.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G.; Nash, R. J.; Griffiths, R. C.; Fleet, G. W. J. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, 8, 3807–3820.
- Heightman, T. D.; Vasella, A.; Tsitsanou, K. E.; Zographos, S. E.; Skamniaki, V. T.; Oikonomakos, N. G.; *Helv. Chim. Acta* **1998**, 81, 853–864.
- Agasimundin, Y. S.; Mumper, M. W.; Hosmane, R. S. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, 6, 911–923.
- Bichard, C. J. F.; Mitchell, E. P.; Wormald, M. R.; Watson, K. A.; Johnson, L. N.; Zographos, S. E.; Koutra, D. D.; Oikonomakos, N. G.; Fleet, G. W. J. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 2145–2148.
- Lichtenthaler, F. W.; Jarglis, P. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1982**, 21, 625–626.
- Somsák, L.; Ferrier, R. J. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1991**, 49, 37–92.
- Myers, R. W.; Lee, Y. C. *Carbohydr. Res.* **1986**, 154, 145–163.
- Characterization of the new compounds (isolated yields are given):
 2 yield: 68 %; mp: 119–121°C; $[\alpha]_D +124$ (c 1.09, CHCl₃); ¹H-NMR (CDCl₃) δ 6.50 (1H, s, NH₂), 6.02 (1H, s, NH₂), 5.44 (1H, t, *J* = 9.4 Hz, H-3), 5.20 (1H, d, *J* = 9.4 Hz, H-2), 5.16 (1H, t, *J* = 9.4 Hz, H-4), 4.33–4.22 (3H, m, H-5,6,6'); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 166.9 (CONH₂, ³*J*_{H-2,CO(NH2)} = 1.5 Hz), 92.7 (C-1), 74.3, 71.6, 69.6, 66.7 (C-2 to C-5), 60.7 (C-6); Anal.: calcd. for C₁₅H₂₀NO₁₀Br (454.24): C 39.6, H 4.43, N 3.08, Br 17.59; found: C 38.74, H 4.74, N 3.21, Br 17.17.
 3 yield: 19 %; mp: 175–177°C; $[\alpha]_D +35$ (c 1.35, acetone); ¹H-NMR (CD₃OD) δ 5.48 (1H, dd, *J* = 9.9, 9.5 Hz, H-3), 5.29 (1H, d, *J* = 9.9 Hz, H-2), 5.15 (1H, dd, *J* = 10.1, 9.5 Hz, H-4), 4.32 (1H, dd, *J* = 12.2, 5.2 Hz, H-6), 4.25 (1H, ddd, *J* = 10.1, 5.2, 2.3 Hz, H-5), 4.16 (1H, dd, *J* = 12.2, 2.3 Hz, H-6'); ¹³C-NMR (CD₃OD) δ 172.5 (CONH₂, ³*J*_{H-2,CO(NH2)} ~ 1 Hz), 95.6 (C-1), 72.7, 72.5, 70.6, 70.1 (C-2 to C-5), 63.7 (C-6); High resolution MS: calcd. for C₁₅H₂₂NO₁₁ [M+H]⁺ 392.11926, found 392.11933, Δ (mmu) 0.06.
 4 yield: 4 %; oil; $[\alpha]_D +18$ (c 1.01, CHCl₃); ¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.14 (1H, s, H-9), 6.23 (1H, s, H-7), 5.92 (1H, quasi t, *J* = 10.1, 9.8 Hz, H-4), 5.32 (1H, d, *J* = 10.1 Hz, H-5), 5.2 (1H, quasi t, *J* = 10.2, 9.8 Hz, H-3), 4.7 (1H, ddd, *J* = 10.2, 4.1, 2.1 Hz, H-2), 4.29 (1H, dd, *J* = 12.7, 4.1 Hz, CH₂), 4.13 (1H, dd, *J* = 12.7, 2.1 Hz, CH₂); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 168.9 (C-10), 154.6 (C-8), 86.4 (C-6), 71.5, 70.6, 70.1, 67.8 (C-2 to C-5), 61.8 (CH₂); High resolution MS: calcd. for C₁₆H₂₁N₂O₁₁ [M+H]⁺ 417.1139, found 417.1143.
 6 yield 57 %; mp 223–224°C; $[\alpha]_D +2$ (c 2.12, CHCl₃); ¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.38 (1H, s, H-9), 7.21 (1H, s, H-7), 5.92 (1H, dd, *J* = 10.1, 9.8 Hz, H-4), 5.34 (1H, d, *J* = 10.1 Hz, H-5), 5.21 (1H, quasi t, *J* = 9.9, 9.8 Hz, H-3), 4.74 (1H, ddd, *J* = 9.9, 4.2, 2.0 Hz, H-2), 4.29 (1H, dd, *J* = 12.7, 4.2 Hz, CH₂), 4.14 (1H, dd, *J* = 12.7, 2.0 Hz, CH₂); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 182.1 (C-8), 171.0 (C-10, ³*J*_{H-5,C-10} = 6.1 Hz), 86.8 (C-6), 70.7, 69.8, 69.7, 67.5 (C-2 to C-5), 61.6 (CH₂); ¹⁵N-NMR (CDCl₃, referenced to NH₄Cl as external standard) δ 130.9 (N-7), 160.5 (N-9); High resolution MS: calcd. for C₁₆H₂₁N₂O₁₀S [M+H]⁺ 433.09167, found 433.09172, Δ (mmu) 0.11.
 7 yield: 78 %; amorphous product; $[\alpha]_D +19$ (c 2.34, CH₃OH); ¹H-NMR (CD₃OD) δ 4.23 (1H, ddd, *J* = 10.0, 5.4, 2.2 Hz, H-2), 4.13 (1H, t, *J* = 9.6 Hz, H-4), 3.83 (1H, dd, *J* = 12.2, 2.2 Hz, CH₂), 3.68 (1H, dd, *J* = 12.2, 5.4 Hz, CH₂) 3.54 (1H, d, *J* = 9.6 Hz, H-5), 3.37 (1H, dd, *J* = 10.0, 9.6 Hz, H-3); ¹³C-NMR (CD₃OD) δ 185.9 (C-8), 174.6 (C-10, ³*J*_{H-5,C-10} = 6.3 Hz), 90.7 (C-6), 76.8, 74.4, 74.1, 70.9 (C-2 to C-5), 62.7 (CH₂); High resolution MS: calcd. for C₈H₁₃N₂O₆S [M+H]⁺ 265.04941, found 265.04953, Δ (mmu) 0.16.
 8 yield: 25 %, amorphous product; $[\alpha]_D +29$ (c 2.54, CHCl₃); ¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.98 (1H, s, H-9), 8.3 (1H, s, H-7), 5.6 (1H, d, *J* = 10.2 Hz, H-5), 5.56 (1H, dd, *J* = 10.2, 9.0 Hz, H-4), 5.26 (1H, dd, *J* = 10.2,

