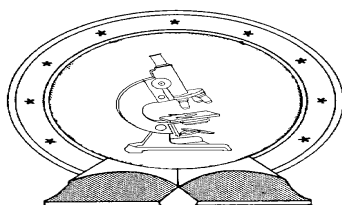


DE TTK



1949

**TERMÉSZETES EREDETŰ ÉS GLÜKÓZ ANALÓG
GLIKOGÉN FOSZFORILÁZ INHIBITOROK SZINTÉZISE**

Doktori (PhD) értekezés

Varga Gergely Tibor

Témavezető: Dr. Juhász László

Debreceni Egyetem
Természettudományi Doktori Tanács
Kémia Doktori Iskola
Debrecen, 2013

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács Kémia Doktori Iskola K/6 programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2013. szeptember 11.

*Varga Gergely Tibor
jelölt*

Tanúsítom, hogy Varga Gergely Tibor doktorjelölt 2008- 2013 között a fent megnevezett Doktori Iskola K/6 programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2013. szeptember 11.

*Dr. Juhász László
témavezető*

Természetes eredetű és glükóz analóg glikogén foszforiláz inhibitorok szintézise

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a kémia tudományágban

Írta: Varga Gergely Tibor
Okleveles vegyész

Készült a Debreceni Egyetem Kémiai doktori iskolája
(K/6 programja) keretében
Témavezető: Dr. Juhász László

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:	Dr.	
tagok:	Dr.	
	Dr.	

A doktori szigorlat időpontja: 2012.április 27.

Az értekezés bírálói:

Dr.	
Dr.	

A bírálóbizottság:

elnök:	Dr.	
tagok:	Dr.	
	Dr.	
	Dr.	
	Dr.	

Az értekezés védésének időpontja: 2013.

Köszönetnyilvánítás

Összinté hálámat szeretném kifejezni témavezetőmnek **Dr. Juhász László** egyetemi adjunktusnak és **Prof. Dr. Somsák László** egyetemi tanárnak, hogy munkámat irányították és útmutatásaikkal segítették. Értékes szakmai tanácsaik mellett köszönöm végtelen türelmüket, megértésüket és biztatásaikat.

Köszönetet mondok **Prof. Dr. Antus Sándor** egyetemi tanárnak és **Prof. Dr. Patonay Tamás** tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tették számomra doktori munkámnak a Szerves Kémiai Tanszéken való elkészítését. Ezúton szeretném megköszönni közvetlen munkatársaimnak, **Dr. Bokor Évának** és **Dr. Kónya Bálintnak** mindennapi segítségüket és baráti támogatásukat, valamint külön köszönöm **Kóder Lászlóné** és **Nagy Károlyné** vegyésztechnikusoknak a laboratóriumi munkában nyújtott segítségüket.

Köszönettel tartozom **Prof. Dr. Gergely Pál** egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette az enzimkinetikai vizsgálatokat, valamint **Dr. Docsa Tibor** tudományos munkatársnak, aki a méréseket végezte.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni **szüleimnek**, és **kedvesemnek** a támogatásukat, a türelmet és a biztató szavakat, amelyek az elmúlt évek során segítségemre voltak.

Tartalom

1. BEVEZETÉS	1
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	3
2.1 A SZÉNHIDRÁT ANYAGCSERE SZABÁLYOZÁSA ÉS ZAVARAI	3
2.2. A CUKORBETEGSÉG KEZELÉSÉNEK LEHETŐSÉGEI: MOLEKULÁRIS CÉLPONTOK ÉS ALKALMAZOTT VEGYÜLETEK	6
2.3. A GLIKOGÉN FOSZFORILÁZ ENZIM SZERKEZETE ÉS SZEREPE.....	9
2.4. A GP ENZIM INHIBITORAI	13
2.4.1. <i>Az aktív centrum inhibitorai</i>	13
2.4.2. <i>Az allosztérikus kötőhelyhez kapcsolódó inhibitorok</i>	17
3. CÉLKITŰZÉS	22
4. SAJÁT VIZSGÁLATOK.....	24
4.1. A CIKÓRIASAV, MINT FR258900 ANALOGON: IZOLÁLÁS, SZINTÉZIS	24
4.2. A TERMÉSZETES EREDETŰ FR258900 ANALOGONJAINAK ELŐÁLLÍTÁSA ⁶⁸	27
4.3. GLÜKÓZ ANALÓG GLIKOGÉN FOSZFORILÁZ INHIBITOROK SZINTÉZISE	35
4.3.1. <i>N-(β-D-glükopiranozil)-amid származékok előállításának lehetőségei</i>	36
4.3.2. <i>Öttagú, két és három heteroatomot tartalmazó heterociklusos vegyületek előállítási lehetőségei</i>	37
4.4. <i>N-(β-D-glükopiranozil-heteroaril)-karboxamidok előállítása</i> ¹⁰¹	41
5. SZERKEZET - HATÁS ÖSSZEFÜGGÉSEK.....	46
5.1. AZ FR258900 ANALOGONOK ENZIMKINETIKAI EREDMÉNYEI ÉS SZERKEZET – HATÁS ÖSSZEFÜGGÉSEI	46
5.2. AZ N-(β-D-GLÜKOPIRANOZIL)-HETEROARIL-KARBOXAMID SZÁRMAZÉKOK ENZIMKINETIKAI EREDMÉNYEI ÉS SZERKEZET – HATÁS ÖSSZEFÜGGÉSEIK	49
6. KÍSÉRLETI RÉSZ.....	52
7. ÖSSZEFOGLALÁS	74

1. Bevezetés

Napjaink fejlett nyugati társadalmában egyre gyakrabban fordul elő a cukorbetegség és annak számtalan szövődménye. Az International Diabetes Federation (IDF) felmérései alapján, a regisztrált betegek száma jelenleg meghaladja a 346 milliót, és az előrejelzések szerint 2030-ra akár az 550 milliót is elérheti.^{1,2}

1. táblázat: A cukorbetegségben szenvedők száma a felnőtt lakosság körében (20 - 79 éves korosztály)²

	Lakosság (millió)	2011 Betegek száma (millió)	Gyakoriság (%)	Lakosság (millió)	2030 Betegek száma (millió)	Gyakoriság (%)	Növekedés %
Afrika	387	14.7	5	658	28	5.9	90.5
Európa	651	52.6	6	671	64	7.1	21.7
MENA*	359	32.8	12.5	542	60	14.3	82.9
NAC**	322	37.7	11.1	386	51.2	12.6	35.8
SAGA***	290	25.1	8.6	376	39.9	10.1	59
SEA****	856	71.4	8.6	1188	120.9	10.5	69.3
WP*****	1544	131.9	10.1	1766	187.9	11.6	42.5
World	4409	366.2	8.3	5587	551.9	9.9	50.7

*Észak-Afrika és Közel- és Közép-kelet országai; **Kanada, USA, Mexikó, *** Argentína, Brazília, Chile, Kolumbia, Kuba, Ekvádor, Guatemala, Peru, Venezuela; **** Banglades, India, Nepál, Sri Lanka, ***** Ausztrália, Kambodzsza, Kína, Indonézia, Malajzia, Mianmar, Fülöp szigetek, Korea, Thaiföld, Vietnám+

Az előrejelzések szerint a legjelentősebb növekedés Afrika, Ázsia és Dél-Amerika fejlődő országaiban várható, míg Európa népessége kevésbé lesz érintett (1.táblázat).³ A kezeléseknek köszönhetően ma már a diabéteszben szenvedő betegek tovább élnek, azonban a betegség következtében mégis számos komplikáció alakulhat ki, még akkor is, ha vércukorszintjüket normál értékek között tartják. A cukorbetegség kialakulásának pontos háttere még napjainkban sem tisztázott, azonban elsősorban genetikai eredetűnek vélik, míg a nagymértékű elterjedésének hátterében az életmóddal kapcsolatos problémák is fontos szerepet játszanak, mint például a rendszertelen étkezések, mozgásszegény életmód, a nagyfokú elhízás illetve a stressz.

A jelenleg alkalmazott eljárások számtalan nem kívánt mellékhatással járnak, ezért új típusú kezelésekre van szükség, mint például a szervezet szénhidrát anyagcseréjét szabályozó enzimek szelektív gátlása. Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén közel

két évtizede folynak kutatások, olyan – elsősorban glükóz analóg - vegyületek szintézisére, melyek a glikogén foszforiláz enzimet gátolva csökkenthetik a máj glükóz termelését, és ez által a vércukor szintet. Ebbe a kutatómunkába bekapcsolódva célul tűztük ki új típusú glikogén foszforiláz inhibitorok szintézisét, valamint a Debreceni Egyetem Orvosi Vegytani Intézetének munkatársaival együttműködve e származékok szerkezet-hatás összefüggéseinek vizsgálatát.

2. Irodalmi áttekintés

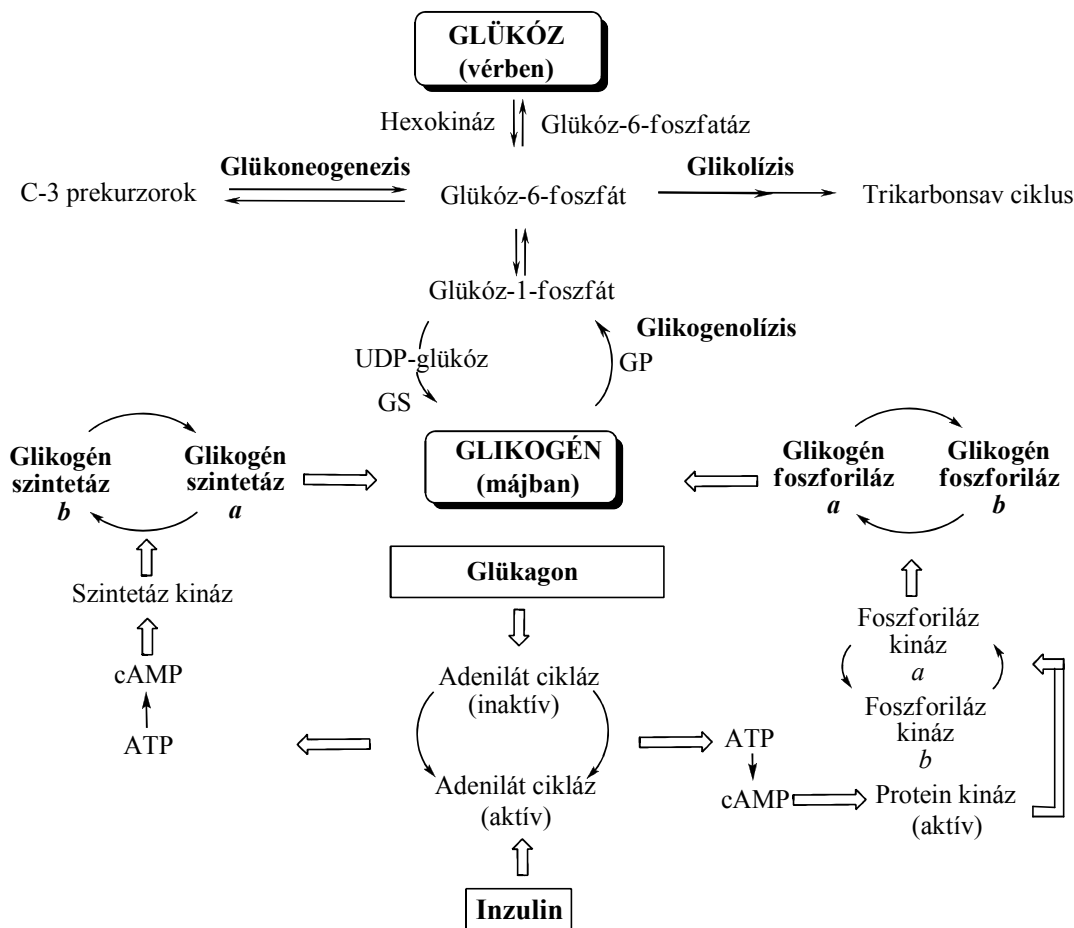
2.1 A szénhidrát anyagcsere szabályozása és zavarai

A szénhidrát anyagcserében négy fő útvonal van, melyek mindegyike glükózzal kezdődik vagy végződik. Ez a tény önmagában is jelzi a glükóz központi szerepét az élő sejtekben.

A szervezetünk vércukor koncentrációját két, egymással szoros kapcsolatban álló folyamat szabályozza (1. ábra). A glikogenolízis (glikogénlebontás), amelynek mintegy 70%-os a becsült hozzájárulása a cukortermeléshez, valamint a glükoneogenezis (glükózsintézis C-3 prekursorokból), amelyből a glükóz másik része származik. Ezen összetett rendszernek az elégtelen működése okozza a krónikusan magas vércukorszintet.

Jóllehet a cukorbetegség számos klinikai tünettel jár együtt, azonban a diagnosztizálása napjainkban is a vércukorszint meghatározásával történik. Egy egészséges szervezetben a glükóz koncentrációja igen szűk határok között változhat (min. 4,5 – 5,0 mmol/l, maximum 9-10 mmol/l), mely értékek fenntartásában a máj központi szerepet tölt be.

A máj glükóz termelését számos enzim és hormon szabályozza, melyek közül az egyik legjelentősebb a glikogén foszforiláz (GP) enzim, amely a glikogén lebontását katalizálja. A májban zajló glikogén metabolizmus szabályzásának másik kulcs enzime a glikogén szintetáz (GS), amely a glikogén szintézisét katalizálja. Mindkét enzim működése és aktivitása allosztérikus szabályzás, valamint a foszforiláció által kontrollált.⁴



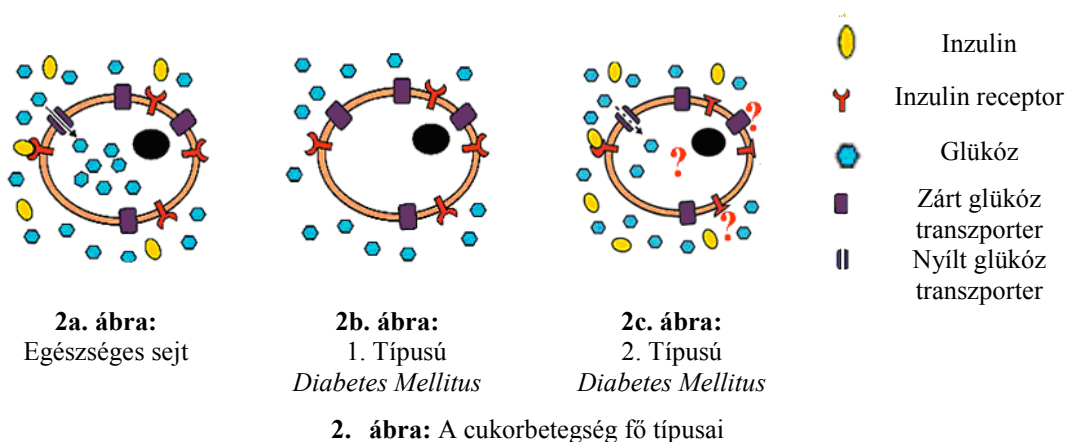
1. ábra: A glikogén metabolizmus

A hasnyálmirigy (pancreas) hormonjai – a Langerhans-szigetek β -sejtjeiben termelődő inzulin, az α -sejtékben termelődő glükagon, valamint a D-sejtékben képződő szomatostatintin – folyamatosan kontrollálják a szervezet szénhidrát anyagcseréjét. Az inzulin és a glükagon a tápanyag raktározásában ellentétes szerepet tölt be: míg az inzulin a glikogén szintézist, addig a glükagon a glikogén lebontást serkenti. A glükagon valójában a cAMP termelését stimulálja, ami aktiválja a protein kinázt, mely a foszforiláz kináz által az inaktív glikogén foszforiláz *b* (PG*b*) foszforilálásával a glikogén foszforiláz *a* (GP*a*) aktív foszforilált formáját eredményezi. Az aktív GP*a* elindítja a májban a glikogenolízist, azaz bekapcsolja a glikogén lebontást szabályozó rendszert, aminek hatására nagy mennyiségű glükóz szabadul fel és jut a véráramba. Ezzel szemben az

inzulin a glikogén szintetáz rendszert aktiválja, és az inaktív foszforilált glikogén szintetáz *b* (GS*b*) defoszforilálásával az aktív glikogén szintetáz *a*-t (GS*a*) szolgáltatja. A GS és GP enzimek aktivitása tehát a foszforiláltságuktól függ, míg a foszforilálás az egyik enzimet (foszforiláz) aktiválja, addig a másik (szintetáz) működését kikapcsolja.

A magas vércukorszinttel járó szénhidrát anyagcsere zavarnak a nemzetközi osztályozás szerint három stádiuma van. Az első az emelkedett „éhom” vércukor érték, amikor az éhomi vércukorszint magasabb az élettani értéknél, de nem éri el a cukorbetegségre jellemző értéket. A második stádiumra, a csökkent glükóz toleranciára, alacsonyabb cukortűrő képesség jellemző, mint az egészségesek esetében. A harmadik stádium pedig a cukorbetegség.

A cukorbetegség megjelenési formáját tekintve két fő csoportra osztható. Egy egészséges szervezetben a magas vércukorszint hatására inzulin termelődik, ami a receptorhoz kapcsolódva megindítja a sejtek cukorfelvételét és a glikogén szintézist (2a. ábra). Az 1. típusú vagy inzulinfüggő *diabetes mellitus* (IDDM, Inzulin depedent diabetes mellitus) esetében a β -sejtek működése, és ez által az inzulin termelése csökken, szélsőséges esetben teljesen hiányzik (2b. ábra), így nincs, ami elindítsa a sejtek glükóz felvételét és a glikogén szintézist.



Kialakulásában a β -sejtek ellen irányuló autoimmun folyamatok játszanak szerepet, amelyre az alábbi tényezők utalnak.⁵

- Szigetsejt ellenes antitestek (*islet cell antibody*: ICA)
- Inzulin autoantitestek (IAA),

- Glutaminsav dekarboxiláz ellenes antitestek (GADA)

Az autoimmun folyamatok elsőként az inzulin elválasztás korai szakaszának kiesését, majd a β -sejtek jelentős részének pusztulását eredményezik.

A 2. típusú vagy nem inzulinfüggő *diabetes mellitus* (NIDDM) (2c. ábra) esetében jóllehet a β -sejtek működnek, viszont a β -sejtek glükóz érzékenysége, és az inzulin felszabadulás mellett a szervek inzulinérzékenysége is romlik, és inzulinrezisztencia lép fel. A szervezet szénhidrátegyensúlya így inzulin adagolásával nem tartható fent, csak diétával, vagy pedig orális antidiabetikumok alkalmazásával érhető el.⁵ A cukorbetegnek több mint 90%-a a 2. típusú cukorbetegségben szenved.^{6, 7}

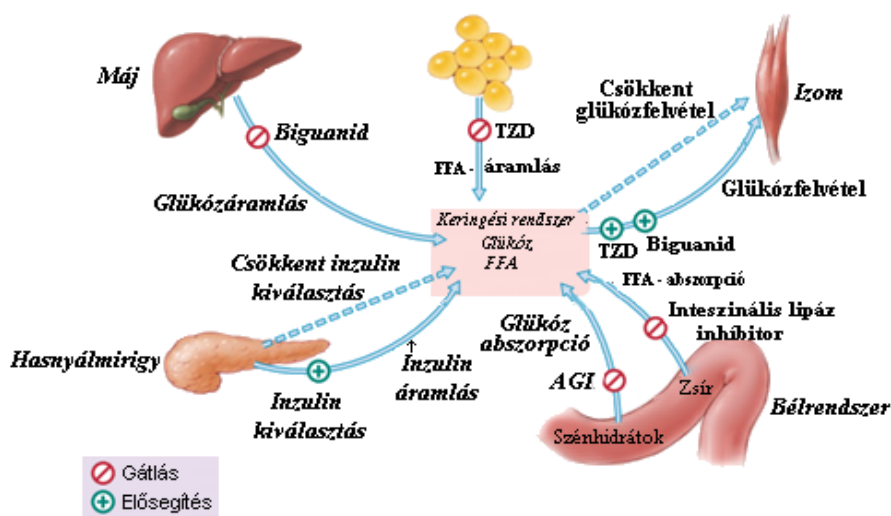
A betegségnek számos hosszú távú szövődménye van,^{5, 8} mint például látászervi, idegrendszeri károsodások, ketoacidózis (amikor a szervezet energianyerés céljából megkezd a zsírok lebontását, és az így keletkező ketontestek koncentrációja a vérben megemelkedik). További súlyos szövődményei a hiperlipidémia (a vér magasabb koleszterin- és triglicerid (zsír-) szintje), és az ebből eredő kardiovaszkuláris megbetegedések, mint a magas vérnyomás, vagy érelmeszesedés (ateroszklerózis), továbbá a szív koszorúereinek betegségei, melyek miatt a *diabetes* az egyik leggyakoribb halálozási okká vált.

2.2. A cukorbetegség kezelésének lehetőségei: molekuláris célpontok és alkalmazott vegyületek

Az 1. típusú, azaz inzulinfüggő cukorbetegségben szenvedő betegek kezelésére különböző inzulin készítményeket alkalmaznak. A legtöbb beteget rekombináns DNS-technológiával előállított humán inzulinnal kezelik, azonban még mindig alkalmaznak sertés vagy marha inzulint is. A készítmény hatását és felszívódását különböző segédanyagok, komplexképzők adagolásával lehet befolyásolni. A készítmények nem megfelelő alkalmazása során azonban könnyen hipoglikémiás állapot alakulhat ki, mely akár a beteg halálát is okozhatja.^{6, 9}

A 2. típusú *diabetes* tüneti kezelésében számos orális hipoglikémiás szert (szulfonil-karbamidok, biguanidin származékok, tiazolidindionok) alkalmaznak. Ezen

készítmények a 3. ábrán látható módon különböző hatásmechanizmussal csökkenthetik a vércukorszintet.

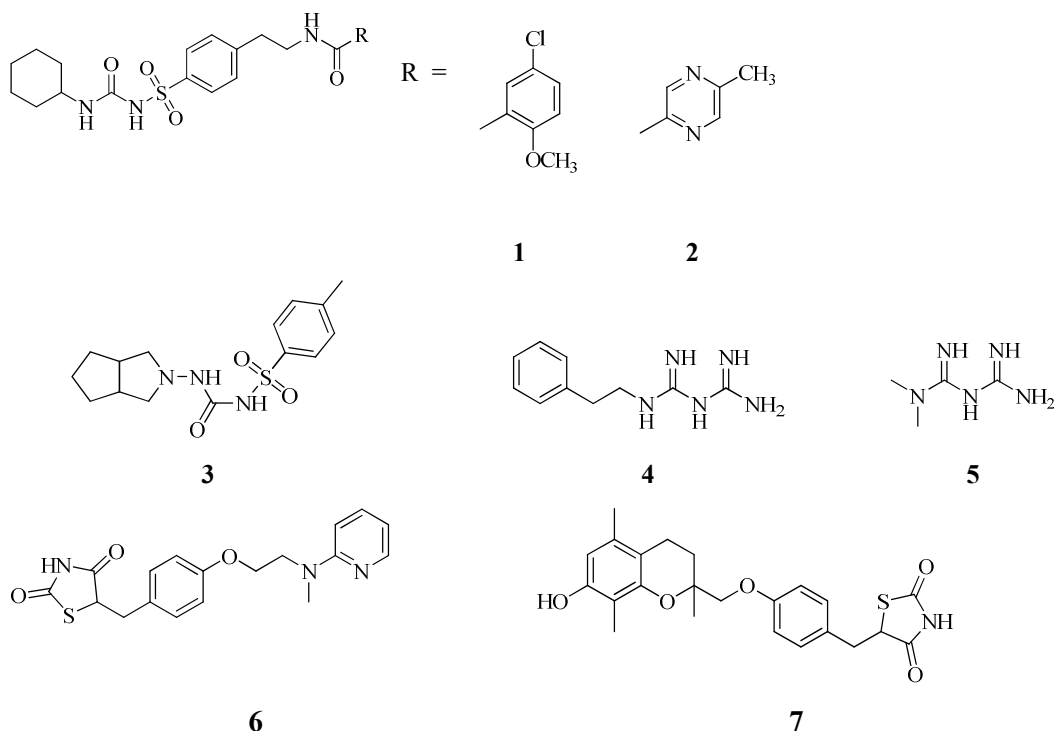


3. ábra: 2. típusú cukorbetegség kezelésére alkalmazott készítmények és a hatásuk helye¹⁰

Janbon és munkatársai 1942-ben ismerték fel a szulfonil-karbamidok vércukorszint csökkentő hatását. A 80-as évektől elkezdték alkalmazni a szulfonil-karbamidok (1 - 3, 4. ábra) egy újabb csoportját (a második generációs készítményeket), melyek már lényegesen kisebb dózisban is hatékonyak bizonyultak.⁹

A szulfonil-karbamidok hatása inzulint termelő β -sejtek jelenlétéhez van kötve, és feltehetően serkentik a hasnyálmirigy inzulin elválasztását azáltal, hogy fokozzák a β -sejtek működését. Fontos szerepük van a glukoneogenesis gátlásában is. A jól reagáló betegek egy részénél „késői rezisztencia” kialakulását észlelték, minek következtében néhány hónapos kezelés után ezek a vegyületek hatástalanná váltak.

1953 után vált ismertté, hogy a biguanid származékok (4 - 5, 4. ábra) is használhatók a 2. típusú cukorbetegség terápiájában.⁶ E vegyületek ismeretlen hatásmechanizmussal fokozzák a perifériás szövetek glükóz felvételét, a sejtek anaerob glikolízisét, ezen felül csökkentik a bélben a glükóz felszívódását. Mivel az inzulin felszabadulást nem növelik, ezért ritkán okoznak hipoglikémiát.



4. ábra: A cukorbetegség terápiájában használt vegyületek

Az orális antidiabetikumok alkalmazása praktikus okokból adódóan sokkal előnyösebb a csak injekció formában alkalmazható inzulinkészítményeknél, azonban közülük csak néhány származék rendelkezik enyhe inzulinrezisztenciát csökkentő hatással, így az orális antidiabetikumok szintézise újult erővel folytatódott.

Az új típusú antidiabetikumok szintézisének egyik újabb fejlesztési területe a peroxiszóma proliferátor aktivált receptor (PPAR) agonista vegyületek szintézisének jelenti.¹¹⁻

¹³ A PPAR a magreceptorok egyik fontos alcsaládját alkotja melyek első képviselőjét, a PPAR α -t 1990-ben azonosították, majd a következő években további izotípusait is felfedezték, úgymint a PPAR γ -t és a PPAR δ -t. A PPAR γ előfordulása legjelentősebb a zsírszövetekben, azonban megtalálható a vastagbélben, az immunrendszerben és a retinában is. A PPAR γ olyan betegségek megelőzésében és kezelésében játszhat szerepet, mint az elhízás, az érelmeszesedés, a 2. típusú diabetesz, valamint egyes ráktípusok, melynek következtében a gyógyszerkutatások elsődleges célpontjává vált.

A tiazolidindionok (TZD) mint nagy affinitású PPAR γ agonista vegyületek azonosítása felgyorsította a területen folyó kutatásokat.¹³ Mielőtt még felismerték volna a tiazolidindionok (TZD) PPAR γ agonista hatását, a 2. típusú diabétesz kapcsán már hatásos inzulin rezisztenciát csökkentő szerként alkalmazták.¹⁴ A klinikai gyakorlatban két, szintetikus úton előállított TZD-t használtak: a roziglitazont (6) és a troglitazont (7) (4. ábra). A PPAR γ agonista ligandumok közül a TZD-k inzulinérzékenyítő és *in vivo* vércukorszint csökkentő hatással rendelkeznek.¹⁵ Egereken végzett kísérletek alapján kimutatták, hogy a PPAR γ hiánya inzulin rezisztencia kialakulásához vezet.^{14, 16} Úgy tűnik, hogy a TZD-k elsődleges célpontja a zsírszövetben található, ahol a legnagyobb mértékben van a PPAR γ receptor. A TZD-k módosítják a zsírsejtek (adipociták) glükóz felvételét és csökkentik más inzulinrezisztenciát elősegítő polipeptidek expresszióját. Ennek következtében a szervezetet általánosan növekedett inzulinérzékenység jellemzi, valamint a vérérum szabad zsírtartalma felhalmozódik a zsírszövetben.¹⁷ E vegyületek közül a troglitazon (7) Rezulid[®] néven az Amerikai Egyesült Államokban és Japánban 1997-ben került forgalomba, azonban számos esetben a betegeknél májkárosodást okozott, így 2000-ben kivonták a forgalomból.¹⁸ Rosiglitazon (6) hatóanyagot tartalmazó készítmények közül az Avandia[®] gyógyszer a mai napig forgalomban van, azonban jelen ismereteink szerint, jelentősen növeli a nem kívánt szív és érrendszeri megbetegedések kockázatát.¹⁹

2.3. A glikogén foszforiláz enzim szerkezete és szerepe

Mivel mind a szervezet által termelt, mind pedig a külső forrásból bevitt glükóz áthalad a glikogenolitikus körön, így a glikogén foszforiláz enzim szabályozásával mind a két forrásból származó glükóz mennyisége befolyásolható,²⁰⁻²² ami lehetőséget teremthet a szervezet vércukorszintjének a szabályozására.

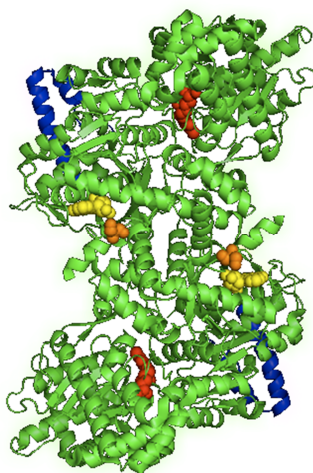
Az emlősök szervezetében a glikogén foszforiláz (GP) enzim három formája található (izoenzimek), melyeket az izolálásuk helyéből adódóan „izom”, „agy” és „máj” glikogén foszforiláz enzimnek nevezzük.²² Mindhárom enzim a szövetekben a felhalmozott glikogénből a glükóz-1-foszfát felszabadítását végzi az α -1,4-típusú glikozidos kötések foszforolitikus hasítása révén.

Az izomban bármilyen fizikai terhelés vagy stressz esetén a GP enzim hatására keletkező glükóz-1-foszfát energiatermelésre hasznosul. A folyamat alloszterikus szabályozás alatt áll, melynek alloszterikus regulátora az AMP (adenozin-monofoszfát) és az ATP (adenozin-trifoszfát).

A májban lévő enzim a vérben lévő glükóz koncentrációjának csökkenésekor az elraktározott glikogén lebontásával igyekszik helyreállítani a vércukorszintet.

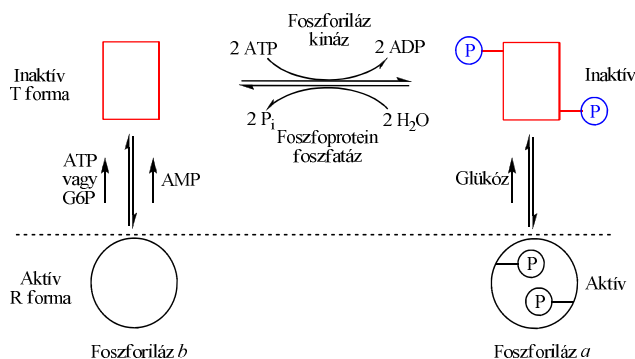
Míg a máj, és az izom glikogén foszforilázok aminosav szekvenciája és térszerkezete részletesen ismert, az agyban található enzimről viszonylag kevés információ áll rendelkezésünkre.²¹

Mindhárom enzim szerkezetére jellemző, hogy két azonos alegységből épülnek fel, melyek molekulatömege 97500 Da, továbbá alegységenként tartalmaznak egy prosztetikus csoportot és egy foszforilálható helyet (Ser-14) (5. ábra).²³



5. ábra RMGPb dimer szerkezete

Az enzim működése különféle effektorok allosztérikus kötődése, továbbá a foszforiláció útján szabályozható, amelyek a GP aktív és inaktív konformációinak egymásba alakulását eredményezik (6. ábra).



6. ábra: A glikogén foszforiláz enzim aktív és inaktív formáinak áttekintése

A GP-nak foszforilálással és defoszforilálással három, egymásba alakítható formája létezik. A foszforiláz $GP_a \rightarrow GP_{ab} \rightarrow GP_b$ átalakulás növekvő Ca^{2+} -koncentráció vagy hormon hatásra játszódik le. A foszforiláz *b* AMP (adenozin-monofoszfát), IMP (inozin-monofoszfát) aktivátorok jelenlétében rendelkezik katalitikus aktivitással, míg a foszforilált *a* forma nukleotidok nélkül is aktív, és gátló hatású ligandumok iránt kevésbé érzékeny. A foszforiláz *ab* (hibrid foszforiláz) átmenetet mutat az *a* és a *b* formák között, mert önmagában is aktív, de a ligandumok iránt is érzékeny.²⁴

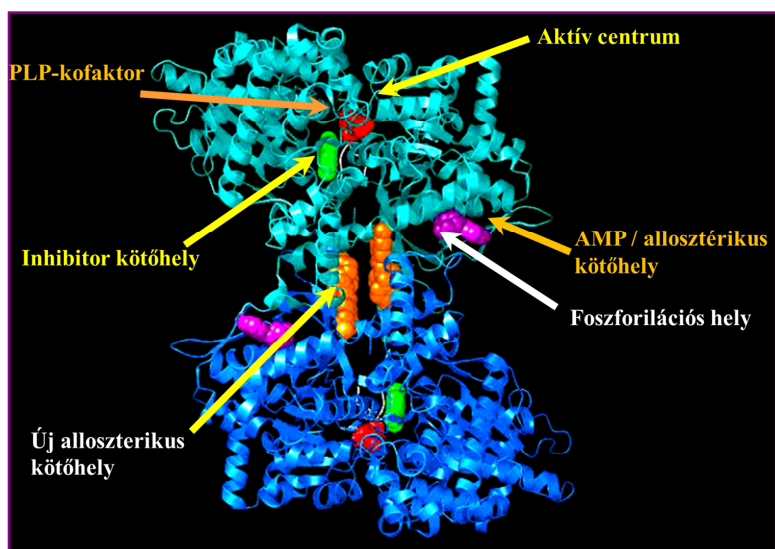
A foszforiláció és defoszforiláció a GP aktív és inaktív konformációinak kialakulását eredményezi (6. ábra). A Monod – Wyman - Changeux-féle modell alapján különbséget kell tennünk R illetve T konformációs forma között: míg az R nagy szubsztrát aktivitással jellemezhető, a T forma kis szubsztrát aktivitással rendelkezik. Az alacsony aktivitású és kis szubsztrát affinitású glikogén foszforiláz *b* túlnyomóan T állapotban fordul elő, míg az aktív és nagy szubsztrát affinitású glikogén foszforiláz *a* elsősorban R állapotú forma. A kevésbé aktív T-forma és a sokkal aktívabb R-forma közti egyensúlyt allosztérikus aktivátorok, illetve allosztérikus inhibitorok képesek befolyásolni. Az inhibitorok az $R \rightleftharpoons T$ egyensúlyt a T forma irányába, az aktivátorok az R forma irányába tolják el. A glikogén foszforiláz két egymásba átalakítható formája tehát nem más, mint a glikogén foszforiláz *b*, melyet túlnyomóan T állapot jellemez, illetve az elsősorban R állapotú glikogén foszforiláz *a* forma (6. ábra).

A kristályos glikogén foszforiláz enzim vizsgálatakor megállapították, hogy az enzim natív T állapotában a katalitikus helyet az úgynevezett 280-as hurok elzárja az enzim felületétől. Az enzim T állapotából az R állapotba történő konformációs átmenet

során azonban a fehérje negyedleges szerkezete megváltozik, az alegységek elfordulnak egymáshoz képest, ami a katalitikus hely elemeinek elmozdulását eredményezi. Ilyenkor a 280-as hurok is elmozdul és ez által egy csatornát nyit az aktív hely irányába, létrehozva a foszfátfelismerő helyet, valamint lehetővé téve, hogy a szubsztrát glikogén elérje a katalitikus centrumot. Egy adott effektor – inhibitor vagy aktivátor molekula – az enzim T vagy R állapotának valamelyikét stabilizálja; hogy melyiket, az a molekula enzimaktivásra gyakorolt hatásából érzékelhető.

A nyúl vázizmából (rabbit muscle GP, RMGP), ill. az emberi májból (human liver GP, HLGP) származó enzimek közel 80%-os azonosságot mutatnak, katalitikus helyük szerkezete pedig azonos.²¹ Ezen eredmények fényében érthető, hogy az enzimes vizsgálatokat az esetek nagy százalékban a könnyebben hozzáférhető nyúl vázizmából izolált enzimmal végzik. A biológiai vizsgálatokhoz leginkább alkalmazott RMGPb enzim szerkezetét és kötőhelyeit mutatja be a 7. ábra, melyek a következők:

- 1.: Katalitikus hely (vagy más néven aktív centrum), melyhez elsősorban a szubsztrát molekulák, azaz a glükóz-1-foszfát és a glikogén kapcsolódik, illetve ide kapcsolódnak a glükóz analóg inhibitorok is.
- 2.: AMP vagy allosztérikus kötőhely, ami az AMP-t, mint aktivátort, a glükóz-6-foszfátot pedig mint inhibitorot köti, ezen kívül acilkarbamid, ftálsav származékok is erre a helyre kötődnek.
- 3.: Glikogén kötőhely, ahová az aktív hely mellett kapcsolódhatnak a glikogén szemcsék, továbbá képes befogadni a maltopentaózt, maltoheptaózt és a ciklodextrineket is.
- 4.: A purin vagy más néven inhibitor kötőhely, amelyhez purin származékok, mint például a koffein, illetve egyéb nukleozidok, nukleotidok képesek kapcsolódni.
- 5.: Az új allosztérikus vagy indol kötőhely, mely a két alegység összekapcsolódási pontjánál lévő üregben helyezkedik el. Nem kapcsolódik hozzá fiziológiás ligandum, de képes kisebb méretű molekulák pl.: indol-karboxamid származékok befogadására, ezzel elősegíti az enzim inaktív állapotának stabilizációját.
- 6.: A benzimidazol kötőhely, melyen eddig csupán a 2-(β -D-glükopiranozil)-benzimidazol kötődését figyelték meg.²⁵



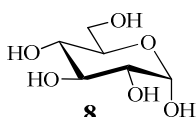
7. ábra: A glikogén foszforiláz enzim és kötőhelyei

2.4. A GP enzim inhibitorai

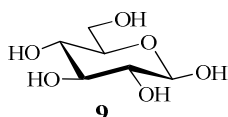
Az elmúlt 20 évben nemzetközi és hazai kutatók nagy számban szintetizáltak olyan vegyületeket, melyek a GP enzim hatásos inhibitorainak bizonyultak. Ezen vegyületeken elvégzett enzimkinetikai mérések, és fehérje röntgenkristallográfiás vizsgálatok segítségével részletes szerkezet-hatás összefüggéseket állítottak fel.^{20-22, 26-30} Mivel a vizsgált inhibitorok irodalma igen széleskörű, ezért ebben a fejezetben csak a dolgozatom témájához szorosan kapcsolódó, az aktív centrumhoz kötődő glükóz analóg és az alloszterikus kötőhely inhibitorait tekintem át.

2.4.1. Az aktív centrum inhibitorai

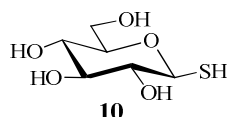
A GP enzim fiziológiás inhibitora maga a glükóz (8, 9) (8. ábra), mely a 280-as hurok zárt helyzetének rögzítése révén az enzim inaktív T formájának stabilizálását segíti elő, és így megakadályozza a glikogén bejutását a katalitikus helyre.



8
 $K_i = 1.7 \text{ mM (RMGPb)}$



9
 $K_i = 7.4 \text{ mM (RMGPb)}$



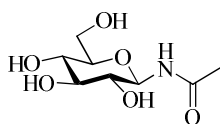
10
 $K_i = 1 \text{ mM (RMGPb)}$

8. ábra: α/β -D-Glükopiranoz és az 1-tio- β -D-glükopiranoz mint GP inhibitor

Az enzim - glükóz komplex röntgenkristallográfiás vizsgálata során megállapították, hogy a D-glükóz esetén a kötődésében fontos szerepe van a cukorgyűrű hidroxil csoportjai és a GP enzim aktív centrumában található aminosavak (asp283, asn284) között kialakuló hidrogénkötéseknek.³¹⁻³³

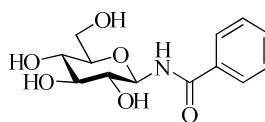
Az α térállású anomer hidroxil csoport egy vízmolekulán keresztül H-kötést létesít az enzim oldalláncával (Asp283), míg a 2-OH közvetlen H-kötéssel kapcsolódik az Asn284 aminosavhoz. A vizsgálatok során azt is megállapították, hogy a katalitikus hely közvetlen közelében a β térállású szubsztituens irányában található az ún. β -csatorna, melyben a β térállású szubsztituensek van der Waals kölcsönhatást alakíthatnak ki az enzimmel. A könnyen polarizálható tiol csoportot tartalmazó **10** 1-tio- β -D-glükopiranoz (8. ábra) ez utóbbi kölcsönhatás miatt jobb inhibitornak bizonyult, mint az α - és β -D-glükopiranoz.³⁴

Az első, alacsony mikromolos tartományban gátló glükóz analóg inhibitor az *N*-(β -D-glükopiranozil)-acetamid (**11**) volt.³⁵



11

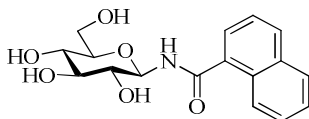
$K_i = 32 \text{ } \mu\text{M}$



12

$K_i = 81 \text{ } \mu\text{M}^{35}$

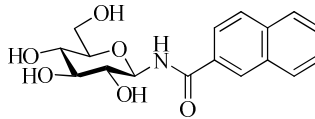
$K_i = 144 \text{ } \mu\text{M}^{36}$



13

$K_i = 191 \text{ } \mu\text{M}^{37}$

$K_i = 444 \text{ } \mu\text{M}^{38}$



14

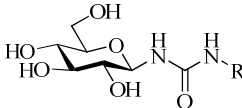
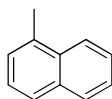
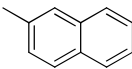
$K_i = 10 \text{ } \mu\text{M}^{38}$

$K_i = 13 \text{ } \mu\text{M}^{37}$

9. ábra: *N*-(β -D-Glükopiranozil)-amidok szerkezete és gátlási állandói (RMGPb)

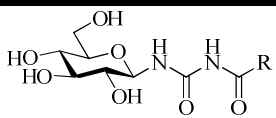
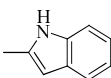
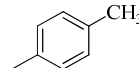
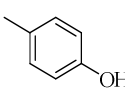
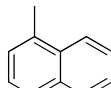
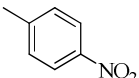
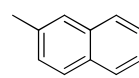
Az *N*-(β -D-glükopiranozil)-amid származékok (**11–14**) (9. ábra) szerkezet-hatás összefüggés vizsgálatai azt mutatták, hogy a gátlást az aromás szubsztituens mérete és orientációja is döntően befolyásolja. Röntgendiffrakciós vizsgálatokkal bizonyították, hogy az *N*-(β -D-glükopiranozil)-amid származékok kiemelkedő gátlási állandói az amid csoport és a His377 főlánc karbonil oxigén atomja között kialakuló erős hidrogénkötésből, valamint az amid aglikon egység és az enzim között létrejövő van der Waals kölcsönhatásokból származnak.^{21, 27} Az *N*-aril-*N'*-(β -D-glükopiranozil)-karbamid származékok (**15–18**)³⁹ vizsgálata során számos, jó gátló hatással rendelkező vegyületet találtak (2. táblázat).

2. táblázat: *N*-Aril-*N'*-(β -D-glükopiranozil)-karbamid származékok szerkezete és gátlási állandói (RMGPb)

		
	R	K_i/IC_{50}^* [μ M]
15	H	140
16		18
17		350
18		5.2

Az *N*-aril-*N'*-(β -D-glükopiranozil)-karbamid (2. táblázat) származékokhoz (**15–18**) viszonyítva az *N*-acil-*N'*-(β -D-glükopiranozil)-karbamidok származékok (**19–26**) között (3. táblázat) hatásosabb inhibitorokat találhatunk, melyek közül a **26** *N*-2-naftoil-*N'*-(β -D-glükopiranozil)-karbamid a napjainkban ismert egyik legjobb glükóz analóg GP inhibitor.⁴⁰

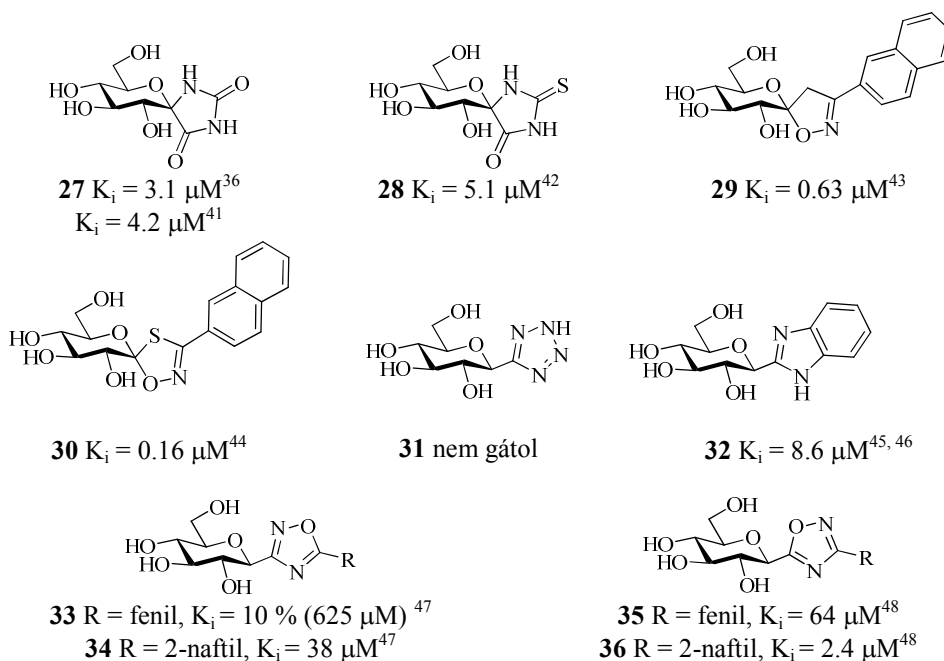
3. táblázat: *N*-Acil-*N'*-(β-D-glükopiranozil)-karbamid származékok és gátlási állandóik (RMGPb)

					
	R	K _i [μM]		R	K _i [μM]
19	-CH ₃	305	23		4.0
20		4.6	24		2.3
21		6.3	25		15
22		3.3	26		0.35

A hatás-szerkezet összefüggés vizsgálatok alapján elmondható, hogy az erős gátlásért az aromás, hidrofób jellegű aglikon egység a felelős (**19-26**). A részletes vizsgálatok során változtatták a glükopiranozil és aril egységek közötti lánc elemeit, azok, hosszúságát, illetve az acil részt. A kísérleti eredmények alapján megállapították, hogy az optimális gátlás szempontjából a β-D-Glc_p-NHCONHCO-Ar szerkezet a legkedvezőbb.³⁰

A röntgenkristallográfiás vizsgálatok kimutatták, hogy az *N*-(β-D-glükopiranozil)-amidokkal ellentétben az acil-karbamidoknál nem alakul ki a His377 oxigénje és az amid NH között hidrogénkötés. Az erősebb gátlás az aglikon β-csatornába történő szorosabb illeszkedése révén, és az aromás rész megfelelő orientációjakor kialakuló kedvező kölcsönhatások miatt jön létre. A 3. táblázat adataiból kitűnik, hogy az aromás szubsztituens méretét növelve (**20**, **24**, **26**) a gátlás is erősödik.³⁹ Az aromás egység jobb elhelyezkedésének köszönhetően a 2-naftoil származék (**26**) jobb gátlószernek bizonyult az 1-naftoil vegyületnél (**25**). Az aromás gyűrű heterociklusokkal való helyettesítése (**23**) nem eredményezett erősebb gátlást.

A glükopiranozilidén-spiro-heterociklusok közül számos vegyület jó inhibitora az enzimnek. A korai gátlószerek közül a glükopiranozilidén-spiro-hidantoin (**27**) volt a legjobb ismert glükóz analóg inhibitor.^{36, 41}



10. ábra: Glikopiranozilidén-spiro-heterociklusok és C-(β-D-glükopiranozil)-heterociklusok szerkezete és gátlási állandóik (RMGPb)

A 2-naftil szubsztituenszt tartalmazó spiro-izoxazolin⁴³ (**29**) és spiro-oxatiazolin (**30**)⁴⁴ származékok felülmúlták a spiro-hidantoin származékok hatását is, melyek közül a **30** származék a ma ismert legjobb glükóz analóg inhibitor. Számos C-glükozil-heterociklusos származékot is előállítottak (**31** - **36**) melyek között alacsony mikromólos gátlási állandóval rendelkező származékok is voltak (10. ábra).

2.4.2. Az alloszterikus kötőhelyhez kapcsolódó inhibitorok

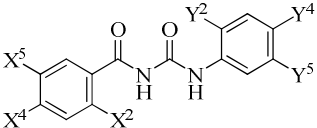
Az alloszterikus, vagy más néven AMP kötőhelyhez változatos szerkezetű molekulák képesek kapcsolódni, és befolyásolni az enzim működését.

A nem glükóz analóg acil-karbamid (**37a** - **h**) típusú vegyületek tanulmányozása során (4. táblázat) megvizsgálták a két fenil gyűrű szubsztituenseinek (X, Y) a biológiai aktivitásra gyakorolt hatását,^{49, 50} valamint az előállított vegyületek esetén meghatározták az IC_{50} értékeket humán máj (HLGPa) és patkány májsejtek esetében is.

Megállapítható, hogy míg orto helyzetben (X^2) a klórt tartalmazó származék, addig a para (X^4) helyzetben a fluort tartalmazó vegyületek rendelkeztek jobb gátlással. A fenil gyűrűn elvégzett változtatások alapján az Y^2 helyzetben Cl, OMe, OCF_3 , Y^4 helyzetben pedig COOH csoportot tartalmazó vegyületek rendelkeztek a legjobb gátlással.

Összehasonlítva a karbonsav (**37a - d**; $Y^4 = COOH$) és a fenol (**37f - h**; $Y^5 = OH$) származékokat egyértelműen kitűnik, hogy a HLGPa enzim esetében a fenol származékok (**37f - h**), a patkány májsejteken végzett vizsgálatok esetén a fluor tartalmú karbonsav származékok mutattak jobb gátlási eredményeket (**37c - d**).

4. táblázat: Nem glükóz analóg acil - karbamid származékok szerkezete és gátlási állandói

 37a - h								
37	X^2	X^4	X^5	Y^2	Y^4	Y^5	IC_{50} [μM]enzim	IC_{50} [μM]májsejt
a	Cl	Cl	H	Cl	COOH	H	420	9
b	Cl	F	H	OMe	COOH	H	210	2
c	Cl	F	H	Cl	COOH	H	160	1.3
d	Cl	F	H	OCF_3	COOH	H	150	1.8
e	Cl	F	H	H	COOH	OH	510	8
f	Cl	F	H	H	OH	OH	120	12
g	Cl	F	H	OMe	H	OH	23	6.2
h	Cl	H	H	OMe	H	OH	65	8

Az allosztérikus inhibitorok másik fontos csoportját alkotják a máj glikogén foszforiláz enzimet szelektíven gátló ftálsav származékok is, melyek a McArdle kórban szenvedő betegek esetében jelenthetnek egy új gyógymódot is. Ezen dikarbonsav-származékok nemcsak jó gátlószerek, de *in vitro* körülmények között tízszeres szelektivitást mutatnak a máj GP enzimre nézve a izom GP enzimmel szemben (5. táblázat).⁵¹

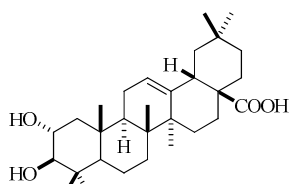
A McArdle betegség az izom glikogén foszforiláz enzim genetikai hibájára vezethető vissza. Az enzim hiányának következménye, hogy terhelés hatására nem bomlik le a glikogén, mely az energia fontos forrását képezi. Ennek következtében az izomban glikogén halmozódik fel, miközben az izom a károsodott energiatermelés következtében egyre gyengébb lesz.

5. táblázat: Ftálsav származékok gátlási állandói és szelektivitás értékei

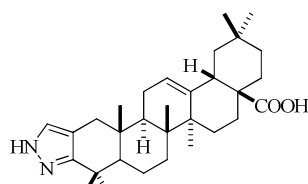
 38						 39				
38	R	X	HLGP (nM)	HMGP (nM)	HL/ HM	39	R	HLGP (nM)	HMGP (nM)	HL/ HM
a		H	20	200	10	a		2	12	6
b		F	1	9	9	b		1	3	3
c		F	10	60	6	c		2	12	6

Az újonnan előállított származékok HLGP (humán máj glikogén foszforiláz) és HMGP (humán izom glikogén foszforiláz) enzimeken elvégzett enzim kinetikai vizsgálataiból kiderült, hogy a legjobb gátlás a nitro származékok (**38b**, **39b**) esetén tapasztalható. A szerkezet-hatás vizsgálatok alapján megállapítható, hogy míg a naftil származékok esetében jobb gátlás figyelhető meg, addig a **38b** fenil származék esetében észlelhető a legnagyobb mértékű szelektivitás az izom és a máj glikogén foszforiláz enzim között.

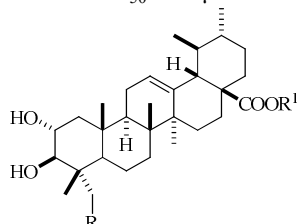
Az allosztérikus inhibitorok egy új csoportját képviselik a pentaciklusos triterpenoidok (**40 - 46**),⁵² melyeknek a GP enzimhez való kötődését röntgendiffrakciós vizsgálatokkal egyértelműen bizonyították.



40 $IC_{50} = 28 \mu M$



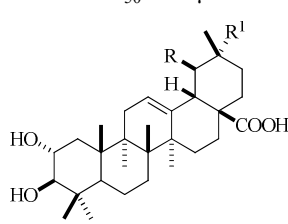
41 $IC_{50} = 28 \mu M$



42 $R=R^1=H$, $IC_{50} = 17 \mu M$

43 $R=OH$, $R^1=H$, $IC_{50} = 20 \mu M$

44 $R=OH$, $R^1=Bn$, $IC_{50} = 3.8 \mu M$

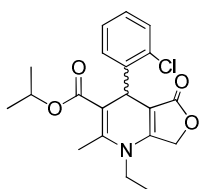


45 $R=H$, $R^1=CH_3$, $IC_{50} = 6.25 \mu M$

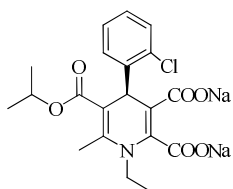
46 $R=CH_3$, $R^1=H$, $IC_{50} = 1.1 \mu M$

11. ábra: Pentaciklusos triterpenoidok, mint alloszterikus inhibitorok⁵² és gátló hatásai az RMGPb enzimre

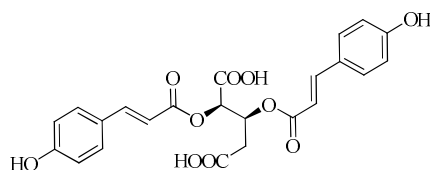
A Bayer Gyógyszergyár kutatói azonosították a BAY-R3401 (12. ábra) kódjelű vegyületet (**47**), mely metabolitikus átalakulás során a BAY-W1807 származékká (**48**) alakulva *in vivo* gátolja a májban végbemenő glikogén lebontást és az enzimet T konformációs állapotban stabilizálja,⁵³⁻⁵⁵ ezzel egyidejűleg aktiválja a glikogén szintetázt. Ez az enzim allosztérikus kötőhelyéhez kapcsolódó molekula (**48**) 1.6 nM gátlási állandóval jellemezhető, így egyike a napjainkban ismert leghatékonyabb glikogén foszforiláz inhibitoroknak.



47 BAY-R3401
(‘prodrug’)



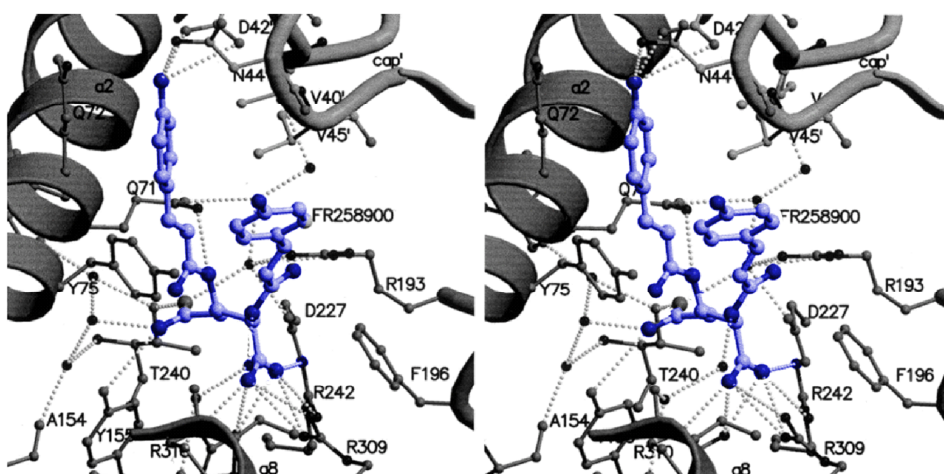
48 BAY-W1807
 $K_i = 1.6 \text{ nM}$ (RMGPb)
 $K_i = 10.8 \text{ nM}$ (RMGPa)



49 FR258900
 $IC_{50} = 2.5 \mu M$ (HLGPa)
 $K_i = 0.46 \mu M$ (RMGPb)

12. ábra: A BAY-W1807 és FR258900 vegyületek és gátlási állandók a GP enzimmel szemben

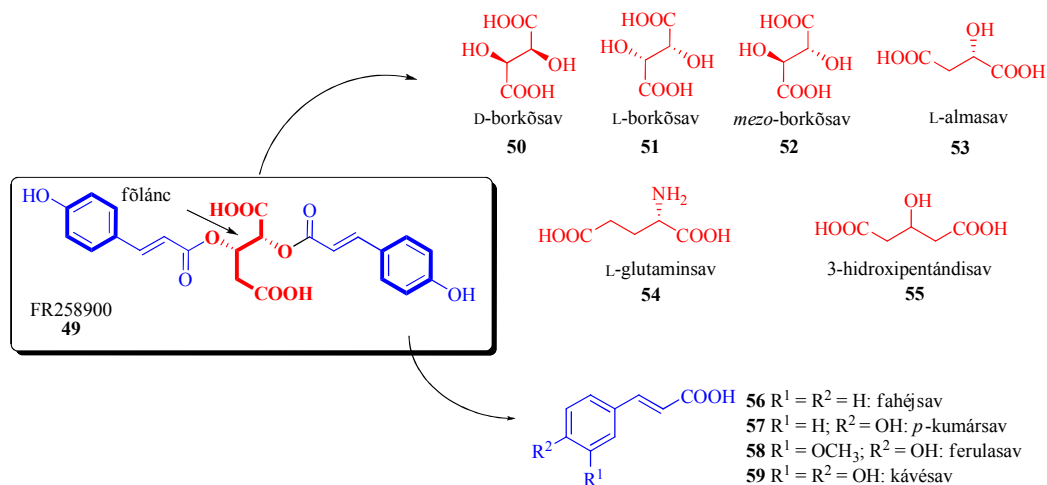
Furukawa és munkatársai 2005-ben számoltak be az No. 138354 jelű gombatörzs által termelt FR258900 kódjelű vegyületről (**49**), amely *in vitro* és *in vivo* körülmények között is a glikogén foszforiláz enzim inhibitora ($IC_{50} = 2.5 \mu M$; HLGPa⁵⁶ $K_i = 0.46 \mu M$; RMGPb⁵⁷). A GP enzimmel képzett komplex röntgendiffrakciós vizsgálata azt mutatta, hogy a vegyület az enzim allosztérikus kötőhelyéhez kapcsolódik,⁵⁸ 17 hidrogénkötést, (Arg310, Ser313, stb.) valamint 71 van der Waals típusú kölcsönhatást létesít az enzimmel (13. ábra). Az FR258900 molekula enzimhez való kötődése szempontjából fontos szerepe van az inhibitor karboxil csoportjainak, melyek az enzim allosztérikus kötőhelyén lévő arginin aminosav egységekkel ionos kölcsönhatásokat létesítenek.



13. ábra: Az FR258900 molekula kötődése a GP enzim allosztérikus kötőhelyéhez

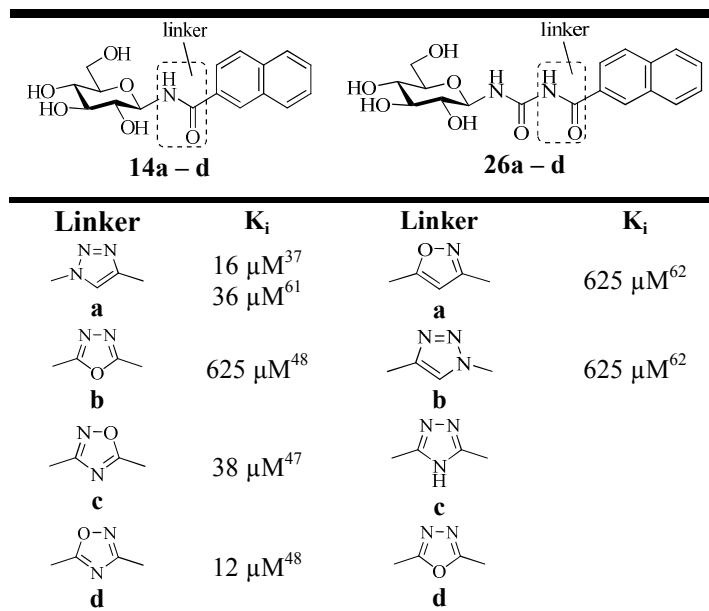
3. Célkitűzés

- Az FR258900 (**49**) kódjelű vegyület hozzáférése korlátozott (szintézise nem ismert, csak természetes forrásból izolálható), és részletes szerkezet-hatás vizsgálatokat sem végeztek, melyben tisztázták az aromás gyűrű szubsztitúciójának, a dikarbonsav egység hosszának és a kiralitáscentrumok konfigurációjának a szerepét az enzim-inhibitor kölcsönhatásban, és ez által az enzim gátlásában. Ennek megfelelően egyik célunk volt e vegyület analogonjainak az előállítása, és a szerkezet-hatás összefüggések feltárása a vegyületek enzimkinetikai vizsgálatával. Egy olyan általános szintézis módszerre volt szükségünk, mely alkalmas az FR258900 molekula alapvázának és oldalláncának módosítására is (14. ábra).



14. ábra: Az FR258900 tervezett analogonjai

- Az *N*-acil-*N'*-(β-D-glükopiranozil)-karbamid típusú vegyületek (**19** – **26**) közül az *N*-2-naftoil-*N'*-(β-D-glükopiranozil)-karbamid (**26**) a napjainkban ismert egyik legjobb glükóz analóg GP inhibitor, mely nanomolos tartományban gátolja az enzimet (3. táblázat). Kutatócsoportunkban e vegyületcsalád részletes szerkezet-hatás összefüggés vizsgálatai során olyan származékok előállítását tűztük ki célul, melyekben a karbamid egység NHCO csoportjait helyettesítjük úgynevezett nem klasszikus bioizoszter heterociklusokkal,^{59, 60} és tanulmányozzuk az így előállított származékok GP inhibitor aktivitását.



15. ábra: Amid egységek nem klasszikus bioizoszter heterociklusokkal való helyettesítése

Kutatócsoportunk korábban már beszámolt *N*-(β-D-glükopiranzil)-amid és *N*-acil-*N'*-(β-D-glükoporanozil)-karbamid típusú vegyületek olyan analogonjainak a szintéziséről és biológiai hatásáról, melyekben e vegyületek 15. ábrán jelzett NHCO egységeit 1,2,3-triazol (**14a**, **26b**), 1,3,4- (**14b**), 1,2,4-oxadiazol (**14c**, **14d**) és 1,2-oxazol (**26a**) heterociklusokkal helyettesítették. Ezt a munkát folytatva a célunk volt olyan származékok előállítása, ahol az *N*-acil-*N'*-(β-D-glükoporanozil)-karbamid vezérmolekula „harmadik” NHCO egységét 1,2,4-triazol (**26c**) és 1,3,4-oxadiazol (**26d**) heterociklusokkal helyettesítjük és tanulmányozzuk e módosítások hatását a vegyületek GP gátló tulajdonságára.

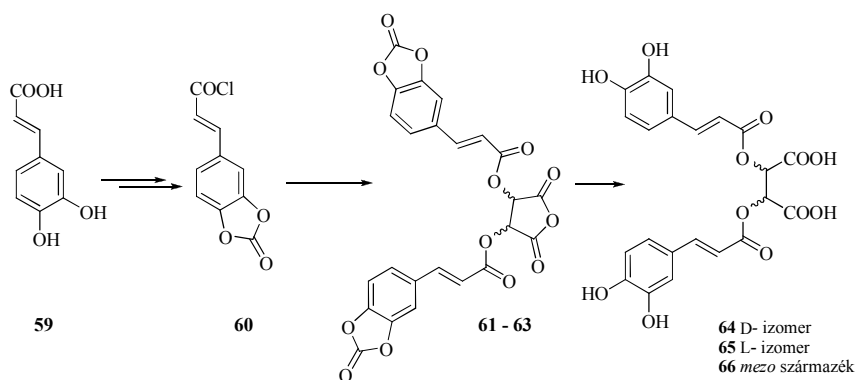
Tekintettel arra, hogy a doktori munkám során az előállítani és vizsgálni kívánt vegyületek kémiai lényegesen eltérőek, ezért a szintetikus előzményeket külön-külön az adott vizsgálatokat ismertető fejezetek előtt foglalom össze.

4. Saját vizsgálatok

4.1. A cikóriasav, mint FR258900 analagon: izolálás, szintézis

A szakirodalomban a mai napig nem ismert az FR258900 kódjelű vegyület (49) totál szintézise, azonban az analagonok előállítására alkalmas szintézismódszer kiválasztása jó lehetőséget teremtett a cikóriasav (64 - 66) irodalmának részletes áttekintésére, összehasonlítására.

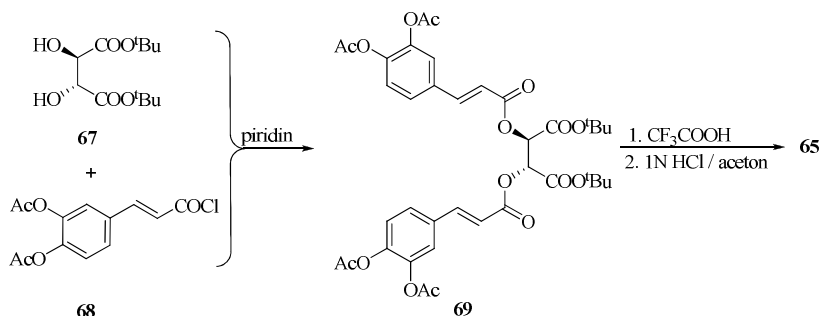
1958-ban Scarpati és munkatársai a cikória növény leveléből készített vizes főzetből egy új, optikailag aktív vegyületet izoláltak, melyet cikóriasavnak (65) neveztek el.⁶³ A vegyület szerkezetének felderítés során megállapították, hogy ez a vegyület valójában az optikailag aktív D-borkősav molekula kávéssavval (59) képzett diészter származéka. A természetben leggyakrabban az L-borkősav és származékai fordulnak elő, ezzel szemben a cikóriasavban a D izomer található meg, amely az első ilyen, természetes forrásból izolált származék volt abban az időben. Scarpati és munkatársai egy szintézis utat is közöltek, mely segítségével sikeresen előállították a cikóriasav összes lehetséges sztereoizomerjét (16. ábra).



16. ábra: Scarpati féle cikóriasav szintézis

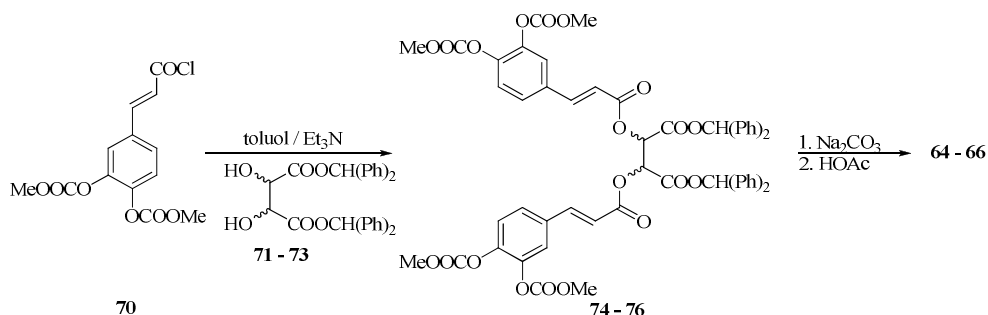
1996-ban Robinson és kutatócsoportja a cikóriasav HIV vírus ellenes hatásáról számoltak be.⁶⁴ Két évvel később Zhao és munkatársai⁶⁵ egy új szintézis utat alkalmazva (17. ábra) sikeresen előállították a cikóriasavat, a kereskedelmi forgalomban kapható L-

borkősav di(*tert*-butil) észteréből (**67**) és acetilezett kávéssav-kloridból (**68**) kiindulva. Az acilezést követően (**67** + **68** → **69**) a védőcsoportokat két lépésben eltávolítva (*tert*-butil-észter hasítása trifluoecetsavval, melyet az acetil csoportok hasítása követett 3N-os sósavoldattal) jó hozammal kapták meg a (2*R*,3*R*)-cikóriasavat (**65**).



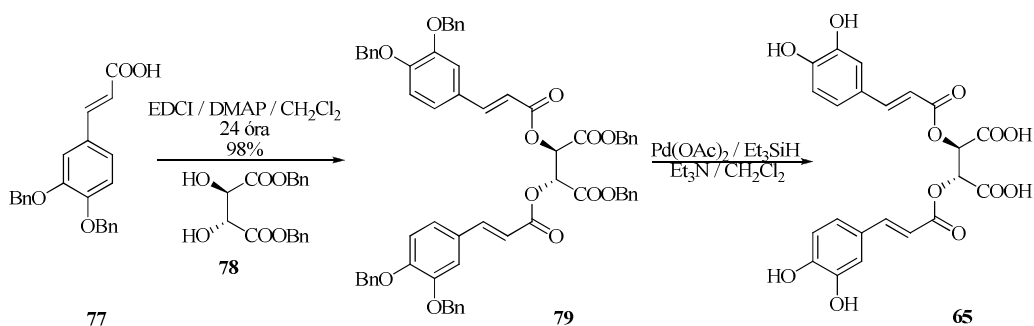
17. ábra: Zhao-féle cikóriasav szintézis

1999-ben az előző közleményből kiindulva King (18. ábra) és munkatársai⁶⁶ L-, D- és *mezo*-borkősavból (**50** - **52**) kiindulva egy újabb úton valósították meg a cikóriasav és származékainak a szintézisét. Az egyik fő szempontjuk volt, hogy az alkalmazott védőcsoportok szelektíven eltávolíthatók legyenek, mivel szerettek volna fényt deríteni arra, hogy a borkősav szabad karboxil csoportjai vagy a kávéssav fenolos hidroxil csoportjai felelősek-e a származékok HIV ellenes hatásáért. Kiindulási vegyületeként a borkősav izomerek bisz(difenilmetil) észter származékait (**71** - **73**) és a metoxikarbonil csoporttal védett kávéssav-kloridot (**70**) alkalmazták, így a védőcsoportok szelektív eltávolítását is sikerült megoldaniuk.



18. ábra: A cikóriasav és származékainak King-féle szintézise

Lamidey és munkatársai⁶⁷ 2002-ben ismertették az első olyan szintézist (19. ábra), melynek során nem a meglehetősen érzékeny sav-kloridokat alkalmazták acilező szerként, hanem a karbonsavakat DCC vagy EDCI reagensek segítségével *in situ* aktiválták a cikóriasav szintézise során. E módszer további előnye, hogy az eddigi eljárásokkal szemben a fenolos hidroxil és a karboxil csoportok védését benzil csoporttal oldották meg, így azok egy lépésben eltávolíthatóak voltak a szintézis utolsó lépésében. A 6. táblázatban összefoglaltuk a cikóriasav szintézise során az irodalomban alkalmazott eljárásokat.



19. ábra: Lamidey-féle cikóriasav szintézis

6. táblázat: A cikóriasav szintézisére alkalmazott reakciókörülmények összefoglalása

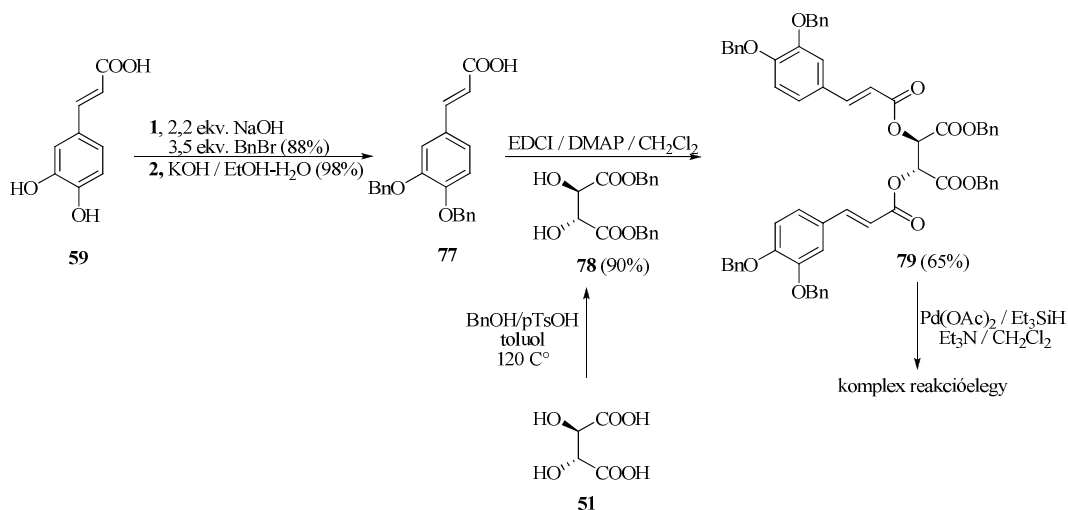
	Funkciós csoport	Védőcsoportok	Acilezési körülmények	Védőcsoport hasítása
I.	COOH OH	- =(C=O)	110 -135 °C vákuum	- 80% AcOH melegítés
II.	COOH OH	t-Bu acetil	SOCl ₂ piridin	CF ₃ COOH HCl
III.	COOH OH	difenilmetil (DPM) metoxikarbonil (MC)	SOCl ₂ EtN ₃ / toluol	Na ₂ CO ₃ AcOH
IV.	COOH OH	benzil benzil	EDCI / DMAP / CH ₂ Cl ₂	Pd(OAc) ₂ / Et ₃ SiH Et ₃ N / CH ₂ Cl ₂

4.2. A természetes eredetű FR258900 analogonjainak előállítása⁶⁸

A szerkezet-hatás összefüggés vizsgálatok elvégzéséhez az FR258900 természetes vegyület olyan származékait kívántuk előállítani, melyekben a vegyület dikarbonsav egységét D-, L- és *mezo*-borkősavakra, valamint L-almasavra, 3-hidroxipentándisavra és az L-glutaminsavra cseréljük ki, míg az aromás szubsztituensek hatásának a tanulmányozására a fahéjsavra, a *p*-kumársavra és a ferulasavra esett a választásunk. Mivel a 3-hidroxipentándisav és L-glutaminsav származékok előállítását kutatócsoportunk más hallgatói végezték a szakdolgozatuk készítése során, ezért ezeknek szintézisét nem részletezem, csak az általuk előállított vegyületek biológiai eredményeit használom fel a szerkezet-hatás összefüggések feltárására.

Mint az az előző irodalmi áttekintésben is látható (4.1. fejezet), számos lehetőség kínálkozott a célvegyületek előállítására, azonban e közleményeket áttekintve a Lamidey-féle szintézis módszer⁶⁷ alkalmazása mellett döntöttünk, mivel azonos védőcsoportot alkalmazott mind a karboxil-, mind pedig a fenolos hidroxilcsoportok védésére és ez által ez a szintézis tűnt a legegyszerűbben kivitelezhetőnek. Az L-borkősavat (**51**) vízmentes toluolban katalitikus mennyiségű pTsOH-at alkalmazva benzilalkohollal reagáltattuk, így kiváló hozammal (90%) kaptuk a **78** származékot (20. ábra). A fenolos hidroxil csoportok védelme során a Lamidey-féle szintézistől eltérően első lépésben a kávéssav tribenzilezett származékát állítottuk elő, melyből lúgos hidrolizissal szabadítottuk fel a szabad karbonsavat (**77**). Ezt követően a karbonsav aktiválását többféle módszerrel is

megkíséreltük (SOCl_2 , DCC / DMAP), de csak a Lamidey által is alkalmazott EDCI / DMAP alkalmazása esetén sikerült a kívánt terméket izolálnunk (**79**). A sikeres acilezési reakciót követően a védőcsoportok eltávolítását védőcsoportonkénti ekvimoláris mennyiségű $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ alkalmazásával kívántuk megvalósítani Et_3SiH jelenlétében. Az irodalmi⁶⁷ adatokkal ellentétben, esetünkben a reakció során egy komplex reakcióelegy képződött, melyből nem tudtuk a kívánt terméket izolálni, ezért e módszert a továbbiakban rutinszerűen nem tudtuk alkalmazni.



20. ábra: A Lamidey-féle cikóriasav szintézis reprodukciója

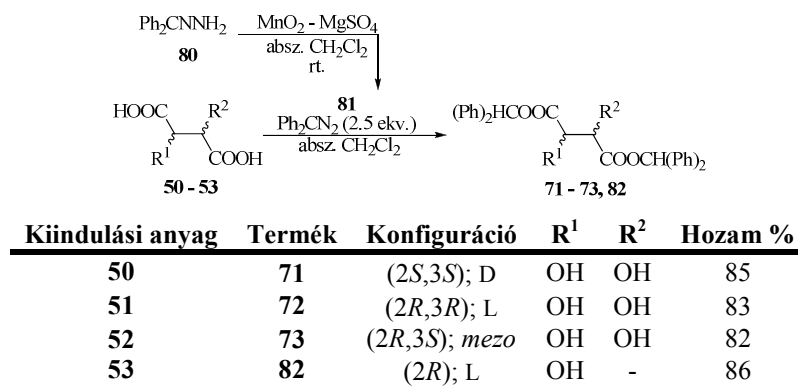
Mivel a benzil védőcsoportok alkalmazásával nem sikerült reprodukálnunk a cikóriasav szintézisét, ezért a célvegyületek előállítását a továbbiakban ortogonális védőcsoport technika alkalmazásával kívántuk megvalósítani. Ehhez a King és munkatársai által már sikeresen bevezetett difenilmetil (DPM) és metoxikarbonil csoportokra esett a választásunk, mivel ezek a védőcsoportok nemcsak egymás mellett, hanem egyéb észter funkciók mellett is szelektíven hasíthatóak.⁶⁶

A difenilmetil észter kialakítását difenildiazometánnal (**81**, DPDAM) végzik az irodalomban, melyet benzofenon-hidrazonból (**80**) oxidatív körülmények között állítanak elő.⁶⁹ A King és munkatársai által közölt szintézisben azonban a pontos oxidatív körülmények nem kerültek leírásra így többféle, az irodalomban használt oxidálószerrel is megpróbáltuk a difenildiazometánt előállítani (7. táblázat).

7. táblázat: A difenildiazometán (**81**) előállításához vizsgált körülmények

Reakciókörülmények	
PIDA /CH ₂ Cl ₂ ⁶⁹	-
MCPBA/Et ₃ N/0 °C ⁶⁹	-
MCPBA/Piridin/0 °C ⁶⁹	-
akt. MnO ₂ /MgSO ₄ /CH ₂ Cl ₂ ⁷⁰	<i>in situ</i>

Mint az a 7. táblázat adataiból is látható, csak a Thoraval és munkatársai által alkalmazott aktivált MnO₂/MgSO₄/CH₂Cl₂ reagens - oldószer kombináció esetén észleltük a DPDAM képződését.⁷⁰ A benzofenonhidrazon (**80**) vízmentes CH₂Cl₂-ban készült oldatát szárított MgSO₄ jelenlétében 0°C-on kb. 3-4 órán át kevertettük aktivált MnO₂-dal, majd a lila színű oldatot szűrtük, és az így kapott reagens oldattal végeztük a karboxil csoportok védését. A D-, L-, *mezo*-borkősav (**50 - 52**) és L-almasav (**53**) származékok diklórmétános oldatát az elkészült reagens oldatához (2.5 ekvivalens) adtuk és az elegy színének eltűnéséig szobahőmérsékleten kevertettük a reakcióelegyet. Ezt követően a reakcióelegyet bepároltuk és oszlopkromatográfiás tisztítást után jó hozammal (82 - 86%) nyertük a **71 - 73, 82** észter származékokat (21. ábra). Meg kell említenem, hogy King és munkatársai metanol - kloroform elegyben végezték a borkősav származékok védését, azonban mi ilyen reakciókörülmények között jelentős mennyiségű difenilmetil-metil-éter képződését tapasztaltuk.

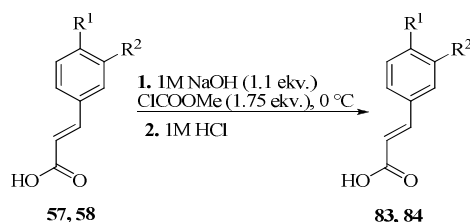


21. ábra: Védett dikarbonsav származékok szintézise

Az így előállított védett észter származékokat (**71 - 73, 82**) a megfelelő acilezőszerekkel reagáltatva lehetőségünk nyílt a célvegyületeink előállítására. Mivel

előzetes kísérleteink során a difenilmetil csoporttal védett borkösavak acilezését a fahéjsavak *in situ* aktiválásával (DCC; EDCI) nem sikerült megvalósítani, ezért továbbra is a King és munkatársai által leírt reakció utat követve a megfelelő sav-kloridok előállítását követően, vízmentes toluolban ekvivalens mennyiségű bázist alkalmazva terveztük az acilezett származékok előállítását.

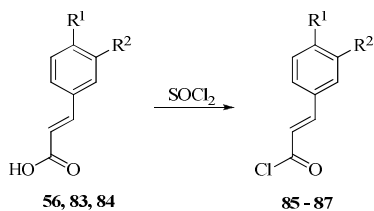
A savkloridok előállítása előtt a *p*-kumársav (**57**) és ferulasav (**58**) szabad fenolos hidroxil csoportjait metoxikarbonil csoporttal védtük (22. ábra).



Kiindulási anyag	R ¹	R ²	Termék	R ¹	R ²	Hozam %
57	OH	H	83	OCOOMe	H	84
58	OH	OMe	84	OCOOMe	OMe	87

22. ábra: Védett *p*-kumársav és ferulasav előállítása

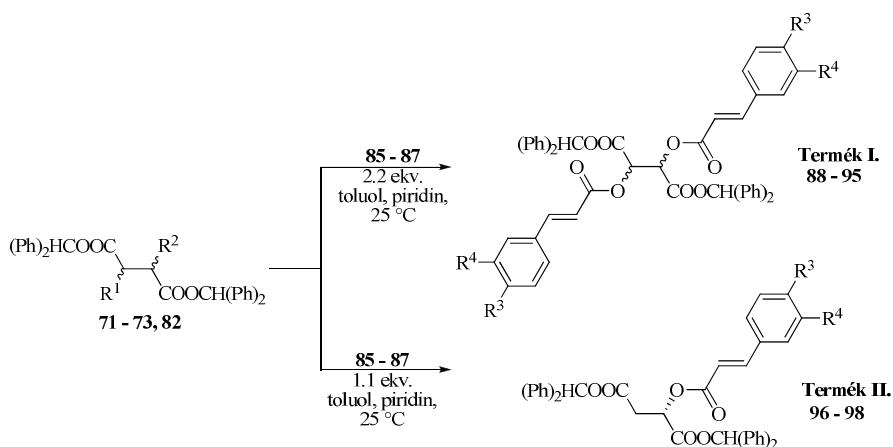
Az **57** és **58** fahéjsav származékokat 1 M NaOH oldatban oldottuk, és 1.75 ekvivalens metil-klórformiátot adtunk az oldatokhoz 0 °C-on. A reakcióelegyeket ezen a hőmérsékleten kevertetve a védett származékok (**83**, **84**) nátriumsói kristályos formában kiváltak az oldatból. A reakcióelegyet megsavanyítottuk, etil-acetáttal extraháltuk és szárítás után szűrtük, majd vákuumban oldószermentesre pároltuk. A **83**, **84** termékeket kiváló hozammal izoláltuk (84%, 87%) és tisztítás nélkül reagáltattuk tovább (22. ábra).



Kiindulási anyag	Termék	R ¹	R ²	Hozam
56	85	H	H	kvantitatív
83	86	OCOOMe	H	kvantitatív
84	87	OCOOMe	OMe	kvantitatív

23. ábra: Sav-klorid származékok előállítása

Az **56**, **83**, **84** fahéjsav származékokat tionil-kloridban forraltuk 6 órán keresztül, majd a reagens feleslegét vákuumban eltávolítottuk (23. ábra). Tapasztalataink azt mutatták, hogy a képződő sav-klorid származékok (**85 - 87**) meglehetősen bomlékonyak, ezért a **85 - 87** vegyületeket további tisztítás nélkül alkalmaztuk a DPM védett savszármazékok (**71 - 73**, **82**) acilezésére (24. ábra).



R ³	R ⁴	Kiindulási anyag R ¹ =R ² =OH		Termék I.	Hozam %	Kiindulási anyag R ¹ =OH;R ² =H	Termék II.	Hozam %
H	H	71	D	88	63	82	96	79
H	H	72	L	89	52			
OCOOMe	H	71	D	90	54	82	97	66
OCOOMe	H	72	L	91	48			
OCOOMe	H	73	<i>mezo</i>	92	83			
OCOOMe	OMe	71	D	93	48	82	98	66
OCOOMe	OMe	72	L	94	50			
OCOOMe	OMe	73	<i>mezo</i>	95	43			

24. ábra: Acilezési reakciók

King és munkatársai oldószerként vízmentes benzolt⁶⁶ alkalmaztak az acilezési reakciókban, azonban ennek egészségkárosító hatása miatt a kevésbé toxikus vízmentes toluol alkalmazása mellett döntöttünk. Bázisként először vízmentes Et₃N-t alkalmaztunk, azonban ebben az esetben komplex reakcióelegyet kaptunk, melyből nem sikerült izolálni a kívánt terméket (**91**). Ugyanerre az eredményre jutottunk a DMAP alkalmazása esetén is. Abban az esetben, ha oldószerként vízmentes toluolt, míg bázisként vízmentes piridint használtunk, a kívánt acilezési reakciók megvalósíthatóak voltak. A védett karbonsavak vízmentes toluollal készült oldatához szabad hidroxil csoportonként 1.1 ekvivalens savkloridot és vízmentes piridint adtunk, majd a reakcióelegyeket szobahőmérsékleten kevertettük. A reakciók lefutását minden esetben vékonyréteg-kromatográfiásan követtük, és a kiindulási anyag teljes átalakulását követően a reakcióelegyet feldolgoztuk, majd a nyers termék oszlopkromatográfiás tisztítását követően az acilezett származékokat (**88 - 98**) (24. ábra) közepes – jó hozammal (48 – 79 %) izoláltuk.

Az acilezés sikeres kivitelezése után a következő feladat a védőcsoportok eltávolítása volt. A szintézisünk alapjául szolgáló közlemény⁶⁶ legnagyobb hiányossága az volt, hogy sem a védőcsoportok eltávolításának sorrendje, sem pedig a pontos körülményeik nem voltak részletezve, így e lépések kidolgozása és optimalizálása kritikus lépése volt a szintézisünknek.

A King-féle szintézis alapján bázikus körülmények között először a metoxikarbonil védőcsoportokat szerettük volna eltávolítani. Mint az a 8. táblázatban

feltüntetett adatokból is látható, különböző koncentrációjú (1 - 4 m/m%) Na₂CO₃ oldatokat alkalmazva THF- ban, illetve THF – metanol elegyében sem sikerült a kívánt termékeket izolálni, a **91**, **94** molekulák teljes bomlását tapasztaltuk. Más bázikus körülményeket is kipróbáltunk a védőcsoportok eltávolítására, azonban minden esetben a vegyületek teljes hidrolízisét tapasztaltuk (8. táblázat).

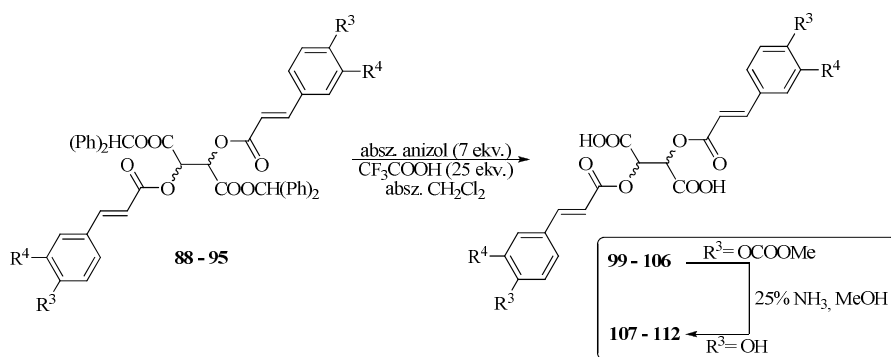
8. táblázat: Kísérletek a **89**, **91**, **94** vegyületek metoxikarbonil és difenilmetil védőcsoportjainak eltávolítására

Metoxikarbonil védőcsoport	Difenilmetil védőcsoport
Reakciókörülmények	Reakciókörülmények
5 ml THF, 2 ml 1 – 4 m/m % Na ₂ CO ₃ , 5 ml MeOH	10 % HCl
5 ml THF, 2 ml 1 – 4 m/m % Na ₂ CO ₃ , kat. MeOH	5 % HCl
1N NaOMe	1 % HCl
piridin, CH ₂ Cl ₂	99 %-os CH ₃ COOH
piperidin, CH ₂ Cl ₂	80 %-os CH ₃ COOH
NH ₃ gáz, absz. THF, absz. MeOH	70 %-os CH ₃ COOH
1N NaOMe	60 %-os CH ₃ COOH
piridin, CH ₂ Cl ₂	

A sikertelen próbálkozások után változtattunk elképzeléseinken és megkíséreltük először a difenilmetil védőcsoportok eltávolítását. Az irodalmi⁶⁶ adatok alapján a difenilmetil csoportot savas hidrolízissel szeretnénk volna eltávolítani (8. táblázat), de az általunk használt különböző töménységű ecetsav és sósav oldatok esetében mind reflux, mind pedig szobahőmérsékleten a vegyületek bomlását észleltük.

A sikertelen reprodukciós kísérletek után az irodalmat tanulmányozva újabb reakciókörülményeket találtunk a difenilmetil észterek hasítására. Chen és munkatársai 2007-ben hidrolitikusan érzékeny β-laktám vegyületeken végzett kísérleteik során alkalmaztak difenilmetil védőcsoportokat, melyek hasítását trifluorecetsav – vízmentes anizol reagensek alkalmazásával végezték.⁷¹ Mivel eddigi kísérleteink azt mutatták, hogy a **89**, **91** vegyületek hidrolitikus stabilitása csekély, ezért úgy gondoltuk, hogy a Chen által alkalmazott reakciókörülmények a **89**, **91** vegyületek esetében is eredményre vezethetnek. Az aromás gyűrűn szubsztituátlan **89** származékkal elvégezve a védőcsoport eltávolítását (7 ekv. vízmentes anizol + 25 ekv. TFA/ vízmentes CH₂Cl₂) a **100** szabad karbonsavat kiváló hozammal izoláltuk (83 %). A DPM csoport hasítását a további borkősav (**88**, **90** -

95) (25. ábra) és almasav (**96 - 98**) (26. ábra) származékok esetén is jó hozammal (79 – 92 %) végeztük el.

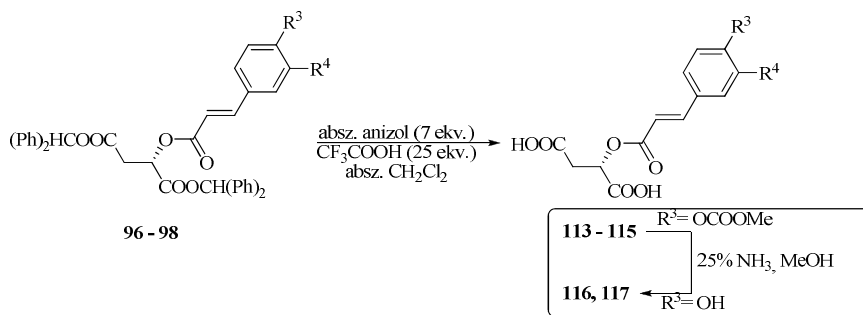


Kiindulási anyag	Termék			Hozam %	Termék			Hozam %
		R^3	R^4			R^3	R^4	
88	99	H	H	86	107	OH	H	89
89	100	H	H	83				
90	101	OCO_2Me	H	82				
91	102	OCO_2Me	H	88				
92	103	OCO_2Me	H	82				
93	104	OCO_2Me	OMe	79	110	OH	OMe	81
94	105	OCO_2Me	OMe	85	111	OH	OMe	69
95	106	OCO_2Me	OMe	92	112	OH	OMe	88

25. ábra: Védőcsoportok eltávolítása borkősav származékok esetén

Mivel a metoxikarbonil csoport hasítását sem tudtuk megvalósítani a cikóriasav szintézise során megadott körülmények között,⁶⁶ ezért az irodalom áttekintése során újabb lehetőségeket kerestünk. Yu és munkatársai számoltak be arról, hogy a metoxikarbonil csoport más észter funkció mellett szelektíven eltávolítható vizes NH_3 oldattal THF-ban.⁷²

Ezen új reakciókörülmények között elvégezve a metoxikarbonil csoportok hasítását, a **107 – 112**, **116**, **117** védetlen származékokat közepes - kiváló hozammal tudtuk izolálni. A védőcsoportok eltávolítását fordított sorrendben elvégezve a metoxikarbonil csoportok sikeres eltávolítását követően a difenilmetil észterek hasítása során egy sokfoltos reakcióelegyet kaptunk, melyből a kívánt terméket nem tudtuk izolálni.



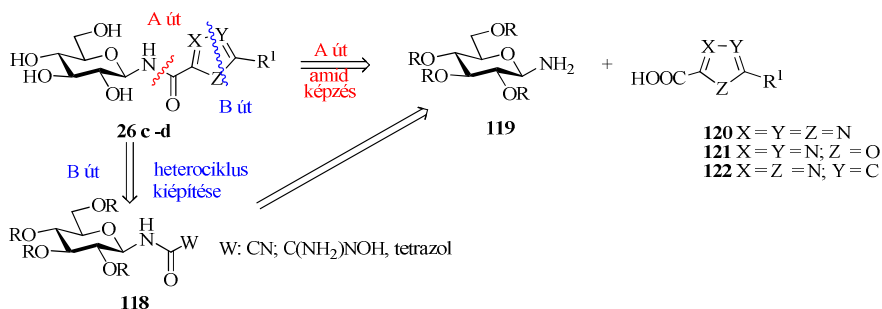
Kiindulás anyag	Termék			Hozam %	Termék			Hozam %
	R ³	R ⁴			R ³	R ⁴		
96	113	H	H	85				
97	114	OCO ₂ Me	H	90	116	OH	H	85
98	115	OCO ₂ Me	OMe	87	117	OH	OMe	88

26. ábra: Védőcsoportok eltávolítása almasav származékok esetén

A védetlen származékok (**99**, **100**, **107 - 113**, **116**, **117**) glikogén foszforiláz gátló hatását a nyúl vázizmából izolált enzimmel szemben vizsgáltuk, melynek eredményeiről és az eredmények értelmezéséről a dolgozat utolsó fejezetében részletesen beszámolok.

4.3. Glükóz analóg glikogén foszforiláz inhibitorok szintézise

Az *N*-acil-*N'*-(β-D-glükopiranozil)-karbamid típusú vegyületek (**19 - 26**) (3. táblázat) a napjainkban ismert glükóz analóg inhibitorok egyik legaktívabb csoportját alkotják. A kutatócsoportunkban számos vizsgálat folyt e vegyületek NHCO egységeinek nem klasszikus bioizoszter heterociklusokkal helyettesített származékainak előállítására és a szerkezet-hatás összefüggések feltárására. Ebben a kutatásban célunk volt olyan származékok előállítása, melyekben a **26** vegyület „harmadik” NHCO egységét helyettesítjük 1,3,4-oxadiazol és 1,2,4-triazol heterociklusokkal. E származékok előállításának lehetőségeit a 27. ábrán foglaltuk össze.



27. ábra: *N*-(β-D-Glükopiranozil)-heteroaril-karboxamid származékok előállítási lehetőségei és annak retroszintetikus analízise

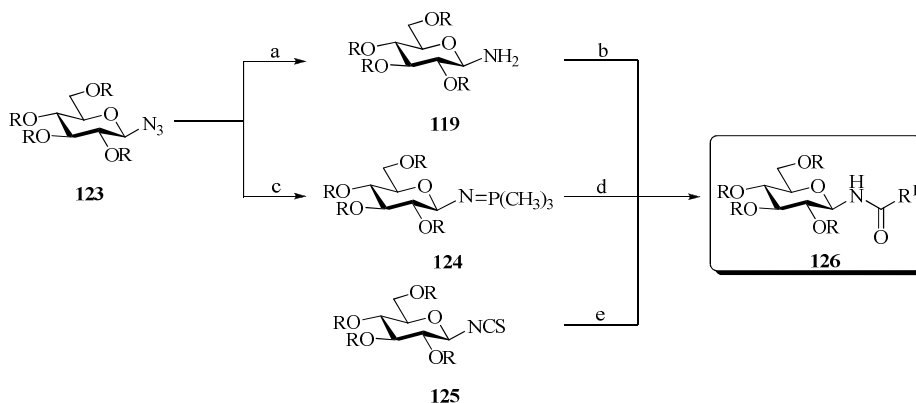
A célvegyületek előállítására két lehetséges szintézis utat vázoltunk fel:

- az amid kötés kiépítése a heterociklusos karbonsav vagy származékai és a glükopiranozil-amin (esetleg azid) közötti reakcióban („A” út),
- a heterociklus kiépítése az amid funkció jelenlétében („B” út).

A következőkben ezen lehetőségek irodalmi előzményeit tekintjük át.

4.3.1. *N*-(β-D-glükopiranozil)-amid származékok előállításának lehetőségei

Az *N*-(β-D-glükopiranozil)-amidok (**126**) előállításának egyik legismertebb módja a védett glükopiranozil-amin (**119**) acilezése *in situ* aktivált karbonsavakkal (pl: DCC, HOBT), vagy karbonsav származékokkal (savhalogenidek, karbonsavanhidridek (28. ábra, b)).^{73, 74} E módszer hátránya, hogy a glükopiranozil-aminok semleges vagy savas közegben könnyen anomerizálódnak, így általában α- és β-amidok keveréke keletkezik.⁷⁵



a: H_2 / Pd; **b:** R^1COOH vagy R^1COCl vagy $(\text{R}^1\text{CO})_2\text{O}$; **c:** $(\text{CH}_3)_3\text{P}$; **d:** R^1COCl / bázis; $(\text{R}^1\text{CO})_2\text{O}$ / bázis; R^1COOH / HOBt; DCC **e:** R^1COOH / Et_3N

28. ábra: *N*-(β-D-glükopiranozil)-amid származékok előállításának általános módszerei

Gyakran alkalmazott módszer a Staudinger reakció. A **123** glükopiranozil-azidból első lépésében trialkil- vagy triaril-foszfinnal foszfinimin (**124**)^{76, 77} intermediert képeznek (28. ábra, **c**)^{78, 79} mely savakkal, savkloridokkal vagy savanhidridekkel³⁸ a megfelelő **126** amiddá alakítható (28. ábra, **d**).^{80, 81} A β-D-glükopiranozil-azidokkal végzett reakciókban a kiindulási azid anomer konfigurációjától függetlenül a legtöbb esetben 1,2-*transz* amidok képződése tapasztalható. Az *N*-(β-D-glükopiranozil)-amidok előállításának egy kevésbé használt módszere a 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-D-glükopiranozil-izotiocianát (**125**) reakciója karbonsavakkal.^{82, 83}

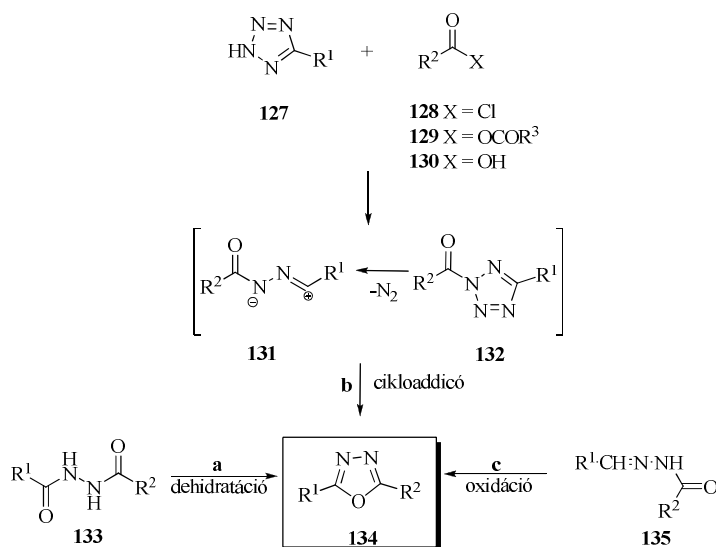
4.3.2. Öttagú, két és három heteroatomot tartalmazó heterociklusos vegyületek előállítási lehetőségei

Az irodalomban igen nagy számban ismertek három heteroatomot tartalmazó 5 tagú heterociklusos szénhidrát származékok,^{30, 84} melyek közül ebben a fejezetben csak a doktori munkámhoz szorosan kapcsolódó 1,3,4-oxadiazol és 1,2,4-triazol származékok előállításának irodalmi előzményeit tekintem át.

4.3.2.1. 1,3,4-Oxadiazolok előállításának általános módszerei

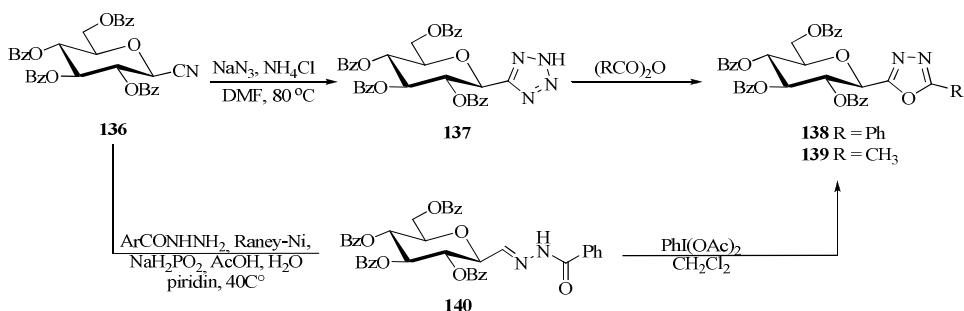
A 2,5-diszubsztituált 1,3,4-oxadiazol (**134**) származékok előállítására az irodalomban három fő reakcióút⁸⁵ ismert:

- diacil-hidrazinok (**133**) gyűrűzárása vízelvonószert jelenlétében (29. ábra, **a**)
- 5-szubsztituált-tetrazolok (**127**) reakciója acilező szerekkel *N*-acil-nitrilimin (**131**) intermediereken keresztül (29. ábra, **b**)
- *N*-acil-hidrazonok (**135**) gyűrűzárása oxidatív körülmények között (29. ábra, **c**)



29. ábra: 1,3,4-Oxadiazolok szintézisének lehetőségei

A 29. ábrán ismertetett általános módszerek sikeresen alkalmazhatók szénhidrát származékok esetében is. Hadady Zsuzsa doktori munkája során sikeresen állította elő a **139** oxadiazol származékot a **137** 5-β-D-glükopiranozil-tetrazol és ecetsavanhidrid reakciójában.⁴⁶

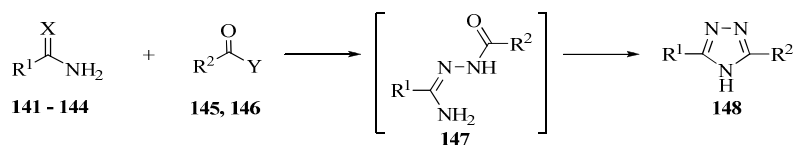


30. ábra: 5-(β -D-Glükopiranozil)-1,3,4-oxadiazolok szintézise

Kutatócsoportunkban a **136** per-*O*-benzoilezett β -D-glükopiranozil-cianidból kiindulva sikeresen előállították a **140** hidrazon származékot, mely vegyület oxidatív gyűrűzárásával szintetizálták a **138** 1,3,4-oxadiazol származékot⁴⁸ (30. ábra).

4.3.2.2. 3,5-diszubsztituált-1,2,4-triazolok előállításának általános módszerei

A 3,5-diszubsztituált-1,2,4-triazolok (**148**) előállítására az egyik leggyakrabban használt eljárás az acil-amidrazonok termikus gyűrűzárása.⁸⁶⁻⁸⁸ Az acil-amidrazonok amidok, tioamidok, nitrilek, imidátok, amidinek savhidrazidokkal, illetve savkloridok amidrazonokkal végbemenő reakcióiban állíthatók elő.



Sorszám	X	Sorszám	Y	Hivatkozás
141	S	145	NH-NH ₂	89, 90, 91
142	O	145	NH-NH ₂	86, 87, 88
143	NH	145	NH-NH ₂	92
144	N-NH ₂	146	Cl	93

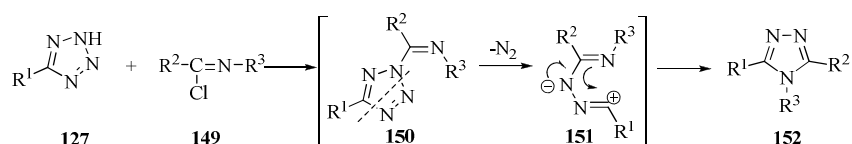
31. ábra: 1,2,4-Triazolok előállítása kondenzációs reakciókban

A **142** amid és a **145** savhidrazid közötti reakció (Pellizari reakció) az amid kis reaktivitása miatt magas hőmérsékletet igényel, ilyen körülmények között azonban a

mellékreakciók (transzaminálás, tetrazin képződés, 1,3,4-oxadiazol képződés) miatt a hozam meglehetősen alacsony (31. ábra).^{86, 88}

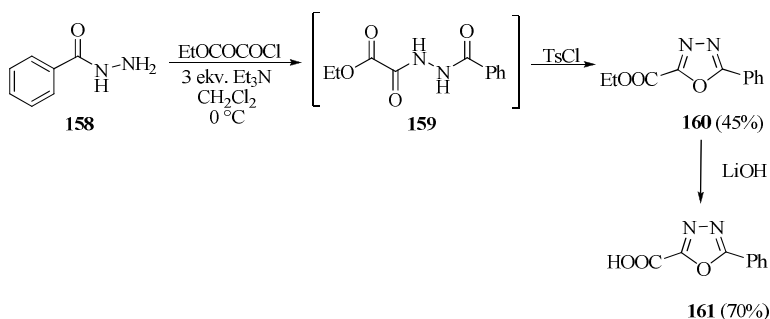
A nitrilekből könnyen előállítható tioamidok (**141**) reakciója savhidrazidokkal (**145**) (magas hőmérsékleten, gyakran oldószer alkalmazása nélkül) szintén acil-amidrazon intermediereken keresztül szolgáltatja a megfelelő triazol származékokat (**148**).⁸⁹⁻⁹¹

A 3,5-diszubsztituált-triazolok előállításának másik lehetséges módja a C-5 szubsztituált-tetrazolok (**127**) és imidoil-kloridok (**149**) közötti reakció (32. ábra).^{94, 95} A reakció első lépésében keletkező imidoilezett tetrazol (**150**) származék N₂ veszteség következtében egy nitril-imin (**151**) típusú intermedierré alakul, melynek intramolekuláris gyűrűzárásával képződik a triazol gyűrű.



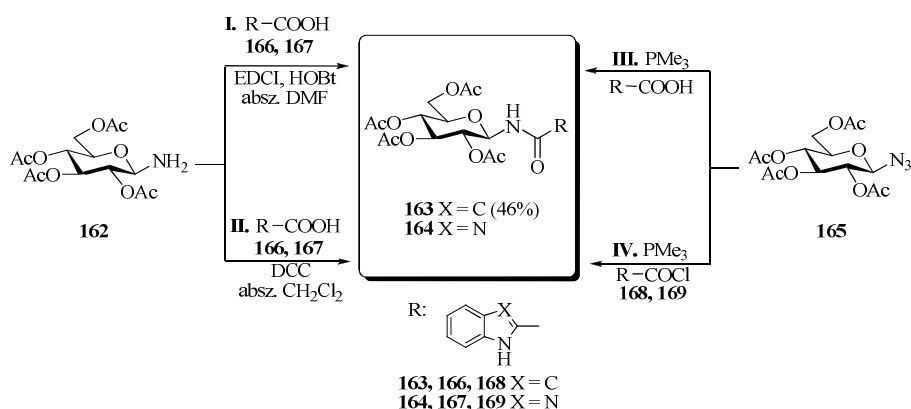
32. ábra: 1,2,4-Triazolok előállítása 1,3-dipoláris cikloaddíciós reakciókban 5-szubsztituált tetrazol származékokból

Egy másik lehetőség az 1,2,4-triazolok előállítására a nitril-iminek (**155**) vagy nitriliminium (**156**) kationok cianidokkal történő cikloaddíciós reakciója (33. ábra). A nitril-iminek (**155**) *in situ* képezhetők 2,5-diszubsztituált-tetrazolok (**152**) termolízisével^{96, 97} hidrazonokból (**153**) vagy hidrazonoil-kloridokból (**154**) bázis jelenlétében (pl.: Et₃N,⁹⁷ Ag₂CO₃⁹⁸). A nitriliminium kationok generálása hidrazonoil-kloridokból (**154**) Lewis savval (AlCl₃⁹⁹, Yb(OTf)₃), vagy arilhidrazonokból (**153**) gyök kationok alkalmazásával (tiantrenil-perklorát Th⁺ClO₄⁻, trisz(2,4-dibrómfenil)aminium-hexakloroantimonát Ar₃N⁺SbCl₆⁻¹⁰⁰ történhet.



35. ábra: 5-Fenil-1,3,4-oxadiazol-2-karbonsav szintézise

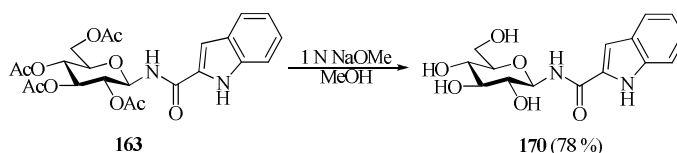
Mivel a **161** 1,3,4-oxadiazolból történő amidképzési reakciónál problémák adódtak, ezért a kereskedelmi forgalomban kapható benzimidazol-2-karbonsavat (**167**) és az 1H-indol-2-karbonsavat (**166**) használva modellvegyületként megkíséreltük optimalni ezt a lépést. E savszármazékokat *in situ* aktiválva (EDCI, DCC, HOBt) reagáltattuk a **162** glükopiranozil-aminnal, a várt **163**, **164** származékok azonban nem képződtek (36. ábra I., II.).



36. ábra: Kísérletek *N*-(β-D-glükopiranozil)-heteroaril-2-karboxamid származékok szintézisére

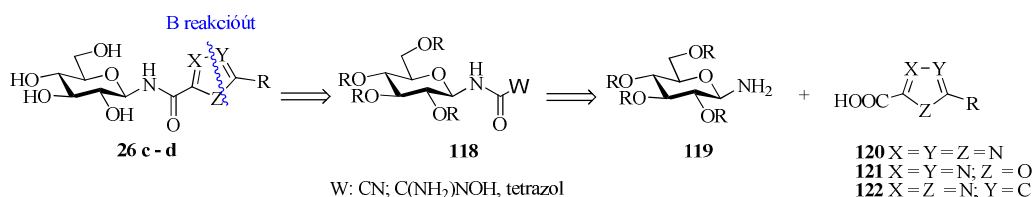
Az amid képzést a karbonsavakból (**166**, **167**) Staudinger körülmények között sem tudtuk megvalósítani (36. ábra III., IV.). Ha az indol-2-karbonsavat (**166**) azonban tionil-kloriddal savkloridokká (**168**) alakítottuk, és így végeztük el a Staudinger reakciót (36. ábra, IV), a várt **163** terméket a reakció feldolgozását és oszlopkromatográfiás tisztítását követően közepes hozammal nyertük (46%). Azonos reakciókörülmények alkalmazásával

a benzimidazol-2-karbonsavkloridból (**169**) a megfelelő **164** amid származékot nem tudtuk izolálni. A **170** védetlen indol származék előállítását a **163** vegyületből kiindulva Zemplén körülmények között végeztük el (37. ábra).



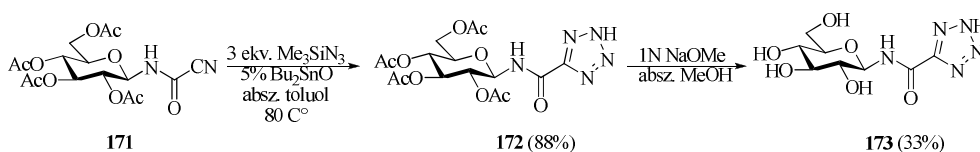
37. ábra: Zemplén körülmények alkalmazása acetil védőcsoport eltávolítására

Mivel úgy véltük, hogy az amid képzés sikertelensége az 1,3,4-oxadiazol származékok esetén nem kísérleti hiba volt, ezért a tervezet vegyületeink előállítását a továbbiakban a „B” reakcióúton valósítottuk meg (38. ábra).



38. ábra: *N*-(β-D-Glükopiranozil)-heteroaril-karboxamid származékon retroszintetikus analízise

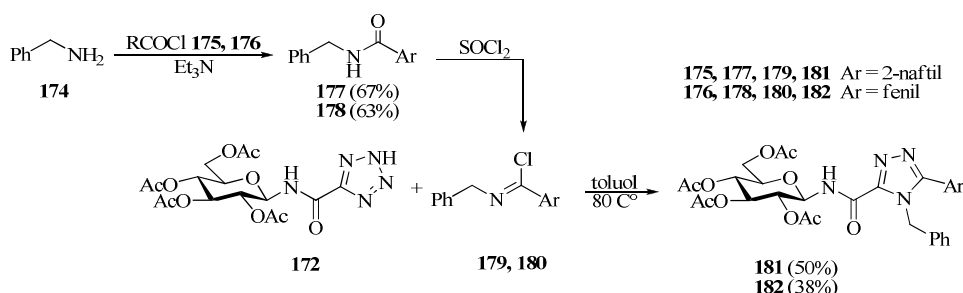
A kutatócsoportunk által szintetizált **171** *N*-cianokarbonil vegyületből Me₃SiN₃, Bu₂SnO reagensekkel^{84, 102} kiváló hozammal állítottuk elő a **172** védett tetrazolt, mely nem csak az 1,2,4-triazol, hanem az 1,3,4-oxadiazol származékok előállítására is lehetőséget nyújtott.



39. ábra: Tetrazol származék szintézise

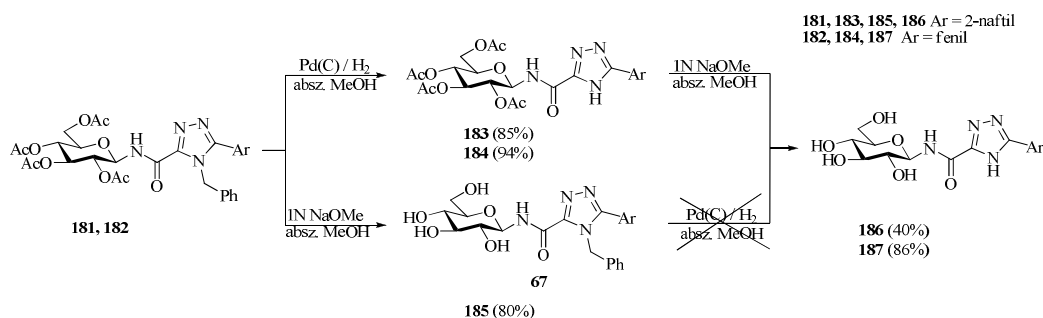
A biológiai vizsgálatokhoz a **172** tetrazol acetil védőcsoportjait Zemplén körülmények között távolítottuk el és közepes hozammal jutottunk a **173** vegyülethez (39. ábra).

A **181**, **182** triazol származékok előállítását a **172** tetrazol imidoil-kloridokkal végzett reakciójával valósítottuk meg. Ezt a módszert a kutatócsoportunkban korábban C-glikozil-1,2,4-triazolok szintézisére dolgozták ki.¹⁰³ A reakcióhoz szükséges imidoil-klorid reagenseket (**179**, **180**) a megfelelő amid származékokból (**177**, **178**)¹⁰³ kiindulva tionil-kloriddal állítottuk elő. A megfelelő *N*-benzilezett-1,2,4-triazolokat (**181**, **182**) az imidoil-kloridok (**179**, **180**) és a **172** tetrazol közti reakcióban közepes hozammal izoláltuk (40. ábra).



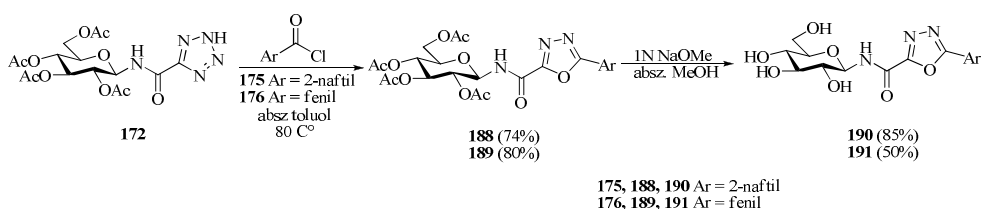
40. ábra: 3,5-Diszubsztituált-1,2,4-triazol származékok szintézise imidoil-kloridok és tetrazol közötti reakcióval

Az enzimkinetikai vizsgálatokhoz szükséges védetlen származékok szintézisét két úton kíséreltük meg. Először a **181** származék acetil védőcsoportjait távolítottuk el Zemplén módszer szerint (**185**), melyről a benzil csoportot a vegyület rossz oldhatósága miatt nem tudtuk eltávolítani. A védőcsoportok fordított sorrendben történő lehasítása azonban már nem jelentett problémát. A **181** és **182** származékok metanolban végzett katalitikus hidrogénezése jó hozammal szolgáltatta a **183**, **184** debenzilezett 1,2,4-triazolokat, melyek Zemplén módszer szerint történő dezacetilezése a védetlen **186** és **187** származékokat eredményezte (41. ábra).



41. ábra: 3,5-Diszubsztituált-1,2,4-triazolok védőcsoportok eltávolítása

Az 1,3,4-oxadiazol származékok előállítását is a **172** tetrazol származékból kiindulva valósítottuk meg. A tetrazolt savkloriddal (**175**, **176**) vízmentes toluolban 80 °C-on reagáltatva jó hozammal kaptuk a kívánt 1,3,4-oxadiazolokat. A védetlen **190** és **191** oxadiazolokat az acetilezett (**188**, **189**) származékokból Zemplén féle elszappanosítással állítottuk elő (42. ábra).



42. ábra: 2,5-Diszubsztituált-1,3,4-oxadiazol származékok szintézise

Az előállított *N*-β-D-glükopiranozil-heteroaril-karboxamid származékok glükogén foszforiláz gátló hatását a nyúl vázizmából izolált enzimmel szemben vizsgáltuk, melyek eredményeit és az eredmények értelmezését a dolgozat következő fejezetében ismertetem.

5. Szerkezet-hatás összefüggések

Az előállított vegyületek enzim kinetikai vizsgálatai a Debreceni Egyetem Orvosi Vegytani Intézetében készültek, ahol a szükséges glikogén foszforiláz enzimet a nyúl vázizomából izolálták, és a kinetikai méréseket az irodalomban leírt módon végezték.⁴² Az eredmények értelmezését segítő molekuláris dokkolások a Szlovák Tudományos Akadémia Kémiai Intézetében készültek.

5.1. Az FR258900 analogonok enzimkinetikai eredményei és szerkezet–hatás összefüggései

A mérési eredmények összehasonlíthatósága érdekében a természetes vegyület (49) GP gátló hatását az általunk alkalmazott körülmények között is meghatároztuk, és megállapítottuk, hogy a 49 vegyület hatásos inhibitora a GP enzimnek és a mért inhibíciós állandó ($K_i = 0.2 \mu\text{M}$) jó egyezést mutat az irodalomban közölt adatokkal ($K_i = 0.46 \mu\text{M}$)⁵⁷ (9. táblázat). A mérésekből az is megállapítható, hogy e származék az AMP-vel szemben kompetitív inhibitora az enzimnek, vagyis mindkét molekula a GP enzim azonos kötőhelyéhez, alloszterikus kötőhelyéhez kötődik. Meghatároztuk a 49 vegyület gátlási állandóját a glükóz-1-foszfáttal (G1P) szemben is, amelyből kiderült az is, hogy a 49 nem-kompetitív inhibíciót mutat a G1P-vel szemben ($K_i = 5.47 \mu\text{M}$) (9. táblázat).

A borkósav származékokkal (99, 100 és 107 – 112) végzett kinetikai vizsgálatokból megállapíthatjuk (9. táblázat), hogy ezen származékok az AMP-vel szemben kompetitív, míg a G1P-vel szemben nem-kompetitív inhibitorai a GP enzimnek, és így azonos kötőhelyére kötődnek az enzimnek, mint az FR258900 (49). E vegyületek esetében megállapítható, hogy az aromás gyűrűn szubsztituátlan származékok gyakorlatilag hatástalanok a GP enzimmel szemben. Azok a vegyületek, melyek a természetes vegyülethez (49) hasonlóan C-4 helyzetben hidroxil csoportot tartalmaznak (107 - 109, 116) 70 - 300 μM tartományban gátolták az enzimet. C-3 helyzetben elektronküldő szubsztituens (110 - 112, OCH_3) jelenléte a gátlás szempontjából előnyösnek bizonyult, ezek a vegyületek 2.0 - 30 μM inhibíciós állandóval rendelkeznek.

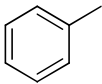
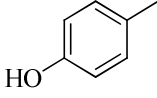
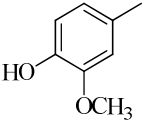
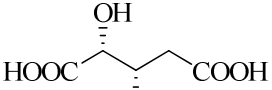
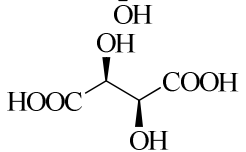
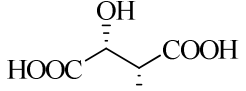
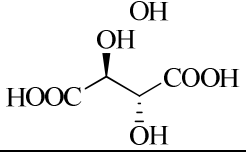
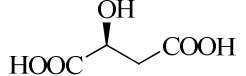
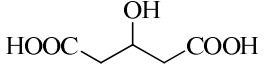
A 9. táblázat adataiból az is megállapítható, hogy a borkősav váz konfigurációja jelentősen befolyásolja a vegyületek gátló hatását, az alapváz *mezo* konfigurációja szükséges ahhoz, hogy a természetes vegyületével (**49**) összemérhető biológia aktivitást érjünk el. A természetes vegyület térszerkezetét a Dreiding modell segítségével megvizsgálva megállapítottuk, hogy az az L-borkősavnak felel meg. A **112** származék, mely esetében az alapváz *mezo* konfigurációjú és az aromás gyűrű tartalmazza a szükséges elektronküldő szubsztituenseket (C-3: OCH₃; C-4: OH) a természetes származékkal összemérhető enzim gátló hatással rendelkezik.

Az egy acil csoportot tartalmazó almasav (**113**, **116**, **117**), valamint a kutatócsoportunkban korábban előállított 3-hidroxipentándisav (**192** – **194**) származékok esetében nem tapasztaltunk gátlást, mellyel bizonyítottuk, hogy eredményes gátlás csak mindkét fahéjsav egység jelenléte esetén lehetséges.

E kísérleti eredmények pontosabb megértése érdekében dokkolási számításokat végeztettünk, melyek kimutatták, hogy az enzim-szubsztrát kölcsönhatás kialakulásában a dikarbonsav egység és az enzim allosztérikus kötőhelyének poláris zsebében található arginin egységek (Arg193, Arg242, Arg309 és Arg310) között fellépő ionos kölcsönhatások mellett kiemelkedő szerepe van az aromás oldalláncok és a GP enzim alegységeit összekötő hidrofób zseb (Tyr75A, Gln72A, Asn44B és Val45B) közötti kölcsönhatásoknak is. A monoacilezett származékok esetében (**113**, **116**, **117**, **192** – **194**) e kölcsönhatás csökkenése tehető felelőssé a hatás elmaradásáért.

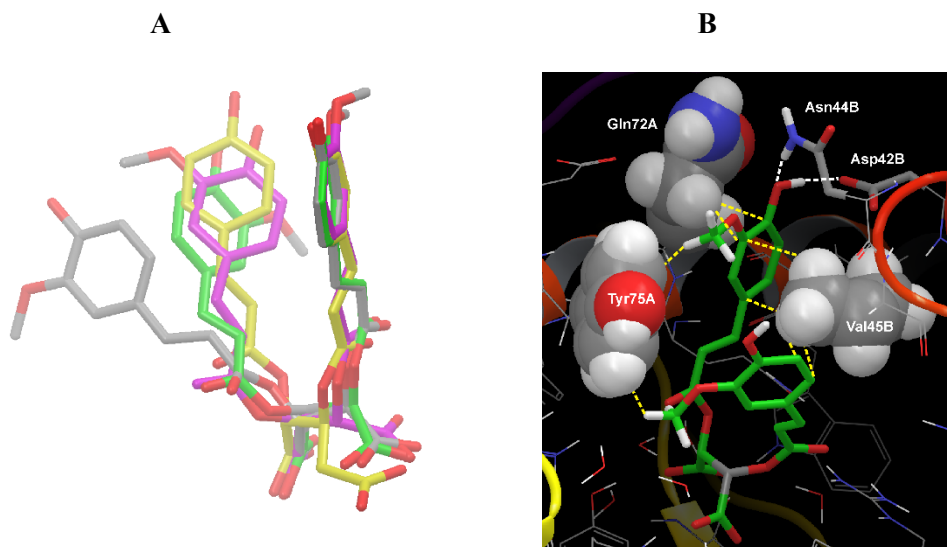
Megvizsgálva a különböző konfigurációjú borkősav származékokat, megállapítható, hogy a kötött vegyületek konformációja változik a konfiguráció függvényében, ami az enzim-szubsztrát kölcsönhatás erősségének változásával, és így az inhibíció változásával is együtt jár (43. ábra). A számításokból az is egyértelműen kiderül, hogy az alapváz azonos konfigurációja esetén az aromás gyűrű szubsztitúciója döntően befolyásolja a kötődés erősségét. Az elektron küldő szubsztituensek növelik a molekulák affinitását az enzim hidrofób zsebéhez, ami az inhibíció erősödését okozza.

9. táblázat: Dikarbonsav származékok és gátlási állandóik RMGPb enzimmel szemben

		Ar							
									
Dikarbonsav	Konf.	G1P	AMP	G1P	AMP	G1P	AMP	G1P	AMP
	2R, 3S (L) ^a	-	-	-	49	5.47	0.2 0.46 ⁵⁷	-	-
	2S, 3S	99	800 ^b	-	107	109	26.4	110	29.1 19.0
	2R, 3R	100	NG ^c	-	108	300 ^b	-	111	28.5 2.68
	2S, 3R	-	-	-	109	71.4	5.68	112	3.36 2.0
	2S	113	NG ^c	116	NG ^c	117	NG ^c	NG ^c	
	-	192	NG ^c	193	NG ^c	194	NG ^c	NG ^c	

^aAz FR258900 konfigurációja. ^bA K_i gátlási állandó az IC₅₀ értékből kalkulálva a Cheng–Prusoff egyenlet alapján: K_i = IC₅₀/(1 + [S]/K_m).

^c nem gátol



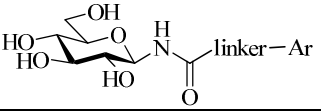
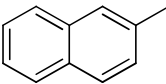
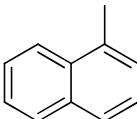
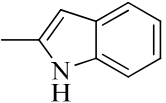
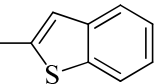
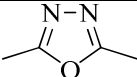
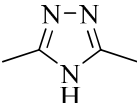
43. ábra: A oszlop: A GP enzim allosztérikus kötőhelyéhez kötődő molekulák konformereinek szuperpozíciója: FR258900 (**49**) (sárga, PDB ID: 2OFF); **112** (zöld), **111** (szürke), és **110** (lila).
B oszlop: a legaktívabb származék (**112**) kötődése a GP enzim allosztérikus kötőhelyéhez.

5.2. Az *N*-(β -D-glükopiranozil)-heteroaril-karboxamid származékok enzimkinetikai eredményei és szerkezet-hatás összefüggései

Az *N*-(β -D-glükopiranozil)-heteroaril-karboxamid származékok gátlási állandóit a 10. táblázatban foglaltam össze. Mint az a táblázat adataiból is látható, mind az 1,2,4-triazol (**186**, **187**) mind pedig az 1,3,4-oxadiazol (**190**, **191**) egységet tartalmazó származékok inhibíciós állandói elmaradnak a vezérmolekula (**26**) inhibíciós állandójától. Szintén meg kell jegyezni, hogy míg az *N*-acil-*N'*-(β -D-glükopiranozil)-karbamid típusú vegyületek esetében a 2-naftoil származék rendelkezett a legjobb gátlási állandóval ($K_i = 0.35 \mu\text{M}$), addig az 1,2,4-triazol sorban a fenil szubsztituált származék (**187**) ($K_i = 1.0 \mu\text{M}$) volt a legaktívabb. Az 1,3,4-oxadiazol sorozat esetében szintén a 2-naftil származék (**190**) bizonyult a legaktívabbnak ($K_i = 30 \mu\text{M}$), jóllehet inhibíciós állandója két nagyságrenddel nagyobb a **26** K_i értékénél.

A **170** indol származék esetében a mért inhibíciós állandó ($K_i = 5.76 \mu\text{M}$) felülmúlja az *N*-(β -D-glükopiranozil)-amidok (**12** - **14**) esetén meghatározott legjobb gátlási állandókat.

10. táblázat: Glükóz analóg inhibitorok gátlási állandói

 Linker	Ar									
										
	191	545	190	30	195	172 ^a	-	-	-	-
	187	1	186	9.26	-	-	-	-	-	-
nincs	12	81	14	10	13	444	170	5.76	196	9.7 ^a
NHCO	20	4.6	26	0.35	25	15	23	4.0	-	-

^aKutatócsoportunkban előállított vegyület.

6. Kísérleti rész

A ^1H és ^{13}C NMR spektrumokat Bruker WP-360 készülékeken vettük fel, oldószerként CDCl_3 -t és DMSO-t használtunk TMS belső standarddal, a kémiai eltolódásokat (δ) ppm-ben, a csatolási állandókat (J) Hz-ben adtuk meg. A vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálatokhoz Kieselgel 60 F_{254} (Merck) lemezt, míg az oszlopkromatográfiás elválasztásokhoz Kieselgel 60 típusú szilikagélt alkalmaztunk. A vékonyréteg-kromatogramokat melegítéssel, különböző előhívó szerekkel, valamint UV-fényben tettük láthatóvá. A reakciók feldolgozása során a szerves fázisokat izzított MgSO_4 -on szárítottuk és az oldószereket rotációs vákuumbepárlón $40\text{ }^\circ\text{C}$ -os vízfürdön távolítottuk el. A vegyületek olvadáspontját Kofler készüléken mértük, és korrekció nélkül adtuk meg. A vegyületeink forgatóképességét Perkin–Elmer 241 polariméteren mértük.

Általános előírat hidroxifahéjsav származékok fenolos hidroxil csoportjainak metoxikarbonilezésére

A hidroxifahéjsavak 1M NaOH-val készült oldatához (1.1 ekvivalens/hidroxil csoport) jeges hűtés közben 1.39 ml (18 mmol, 1.75 ekvivalens) metil-klórformiátot csepegtettünk, és a reakciót kevertettük ezen a hőmérsékleten. A reakcióelegyet 5 %-os HCl oldattal savanyítottuk, majd etil-acetáttal (3 x 50 ml) extraháltuk. A szerves fázist vízzel mostuk (3 x 50 ml) és szárítás után bepároltuk. A kapott termékeket további tisztítás nélkül alakítottuk tovább.

(2E)-3-{4-[(Metoxikarbonil)oxi]fenil}prop-2-énsav (83)

Az általános előíratnak megfelelően *p*-kumársavból (57, 2.50 g, 15.2 mmol) kiindulva 2.80 g terméket kaptunk. (fehér kristály, 84%, op.: $194\text{--}196\text{ }^\circ\text{C}$). ^1H NMR (CDCl_3): 3.92 (3H, s, OCH_3); 6.40 (1H, d, $J = 16.0$, H-2'); 7.21 (2H, d, $J = 8.4$, H-3; H-5); 7.55 (2H, d, $J = 8.7$, H-2; H-6); 7.65 (1H, d, $J = 16.0$, H-3').

(2E)-3-{3-Metoxi-4-[(metoxikarbonil)oxi]fenil}prop-2-énsav (84)

Az általános előíratnak megfelelően ferulasavból (**58**, 2.0 g, 10.3 mmol) kiindulva 2.27 g terméket kaptunk (fehér kristály 87%, op.: 170–173°C). ¹H NMR (CDCl₃): 3.84(6H, s, CH₃); 6.55(2H, d, *J* = 16.0, H-2'); 7.37(1H, d, *J* = 8.5, H-6); 7.53 (1H, dd, *J* = 8.4 és 2.1, H-5); 7.59 (1H, d, *J* = 2.1; H-2); 7.73(1H, d, *J* = 16.0, H-3').

Difenildiazometán előállítása ¹⁰⁴

Benzofenon-hidrazon (**80**) (3.2 g, 16.3 mmol) vízmentes diklórmetánban (50 ml) készült oldatához szárított magnézium-szulfátot (65.2 mmol, 4 ekv.) adtunk, és 30 percig 0°C-on kevertettük a szuszpenziót. Az elegyhez ezután 5.66 g (65.2 mmol, 4 ekv.) aktivált mangándioxidot adtunk, majd folytattuk a szuszpenzió kevertetését 4 órán át 0°C-on. Ezt követően a szuszpenziót szűrtük és a sötétlila oldatot közvetlenül, további tisztítás nélkül használtuk fel.

Általános előírat dikarbonsav származékok bisz(difenilmetil) észtereinek előállítására

A dikarbonsavat (10 mmol) oldottuk a difenildiazometán diklórmetános oldatában (30 ml, 2,5 ekv.) és a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettük, míg az oldat színe sárgára nem változott. Az oldószert rotációs vákumbepárlón eltávolítottuk, majd a párlási maradékhoz n-hexánt adva a terméket fehér kristályok formájában kicsaptuk, szűrtük, n-hexánnal mostuk és levegőn szárítottuk, majd tisztítás nélkül alakítottuk tovább.

(2S, 3S)-1,4-Bisz(difenilmetil)-2,3-dihidroxibutándioát (71)

Az általános előírat alapján 1.5 g (10 mmol) D-borkösavat (**50**) reagáltattunk, 4.8 g benzofenon-hidrazon (**80**) (24.5 mmol), MnO₂ (8.4 g, 97,8 mmol) és MgSO₄ (11.7 g, 97,8 mmol) reakciójából előállított difenildiazometánnal 2.58 g fehér kristályos anyagot kaptunk [85 %, op.: 109-111, [α]_D: -4.9 (c: 0.25; MeOH)]. ¹H NMR (CDCl₃): 4.75 (2H, brs, H-2; H-3); 6.85 (2H, s, 2 x Ph₂CH); 7.29-7.34 (20H, m, aromás). ¹³C NMR (CDCl₃): 72.21, 72.72 (C-2; C-3); 77.16 (Ph₂CH); 126.50, 126.80, 127.67, 127.83, 128.43, 128.50, 140.35, 140.42, (aromás); 170.49, 173.15 (C=O); Elemanalízis kalkulált: C₃₀H₂₆O₆ (482.17) C: 74.67; H: 5.43; Mért: C: 74.71; H: 5.49.

(2*R*,3*R*)-1,4-Bisz(difenilmetil)-2,3-dihidroxi-butándioát (72)

Az általános előírat alapján 1.0 g (6.66 mmol) L-borkösavat (**51**) reagáltattunk, 3.2 g benzofenon-hidrazonból (**80**) (16.3 mmol), MnO₂ (5.6 g, 65.2 mmol) és MgSO₄ (7.8 g, 65.2 mmol) reakciójából előállított difenildiazometánnal 2.40 g fehér kristályos anyagot kaptunk [79%, op.: 108-110°C; [α]_D: -4.9 (c: 0.25; MeOH)]. ¹H NMR (CDCl₃): 3.21 (2H, d, *J* = 6.1, 2 x OH); 4.78 (2H, d, *J* = 6.1, H-2; H-3); 7.02 (2H, s, 2 x Ph₂CH); 7.29-7.34 (20H, m, aromás). ¹³C NMR (CDCl₃): 72.72 (C-2; C-3); 77.16 (Ph₂CH); 126.50, 126.80, 127.67, 127.83, 138.88, 138.95 (aromás); 169.07, 171.67 (C=O); Elemanalízis kalkulált: C₃₀H₂₆O₆ (482.17) C: 74.67; H: 5.43; Mért: C: 74.74; H: 5.47.

(2*R*, 3*S*)-1,4-Bisz(difenilmetil)-2,3-dihidroxi-butándioát (73)

Az általános előírat alapján 2.5 g (16.6 mmol) *mezo*-borkösavat (**52**) reagáltattunk, 8.2 g benzofenon-hidrazonból (**80**) (41.6 mmol), MnO₂ (14.0 g, 166 mmol) és MgSO₄ (19.0 g, 166 mmol) reakciójából előállított difenildiazometánnal, 6.63 g fehér kristályos anyagot kaptunk [82%, op.: 110-112°C]. ¹H NMR (CDCl₃): 3.27 (2H, brs, 2 x OH); 4.76 (2H, s, H-2, H-3); 6.87 (2H, s, 2 x Ph₂CH); 7.23-7.31 (20H, m, aromás). ¹³C NMR (CDCl₃): 73.23 (C-2, C-3); 79.16 (Ph₂CH); 127.15, 127.68, 128.31, 128.63, 138.78, 139.05 (aromás); 170.07 (C=O); Elemanalízis kalkulált: C₃₀H₂₆O₆ (482.17) C: 74.67; H: 5.43; Mért: C: 74.72; H: 5.42.

(2*S*)-1,4-Bisz(difenilmetil)-2-hidroxi-butándioát (82)

Az általános előírat alapján 2.0 g (14.9 mmol) L-almasavat (**53**) reagáltattunk, 6.4 g benzofenon-hidrazonból (**80**) (32.8 mmol), MnO₂ (11.2 g, 131 mmol) és MgSO₄ (15.0 g, 131 mmol) reakciójából előállított difenildiazometánnal, 6.00 g fehér kristályos anyagot kaptunk [86%, op.: 127-130°C, [α]_D: -8.9 (c: 0.25, DMSO)]. ¹H-NMR (CDCl₃): 2.93 (1H, dd, *J* = 16.5 és 6.4 Hz H-3_A); 3.02 (1H, dd, *J* = 16.5 és 4.4, H-3_B); 4.62 (1H, dd, *J* = 6.4 és 4.3, H-2); 6.96 (1H, s, Ph₂CH); 6.98 (1H, s, Ph₂CH); 7.33 (20H, m, aromás). ¹³C-NMR (CDCl₃): 37.0 (C-3); 65.53 (C-2); 77.82 (Ph₂CH); 78.82 (Ph₂C-); 127.15, 127.21, 127.29, 128.11, 128.25, 128.37, 128.54, 128.64, 128.71, 128.84, 139.31, 139.82 (aromás); 169.53 (C=O); 171.53 (C=O); Elemanalízis kalkulált: C₃₀H₂₆O₅ (466.18) C: 77.24; H: 5.62; Mért: C: 77.31; H: 5.68.

Általános előirat bisz(difenilmetil) hidroxialkanoátok fahéjsav és fahéjsav származékokkal történő *O*-acilezésére

A fahéjsav származékok (10 mmol) tionil-kloridos oldatát (10 ml) hat órán át forraltuk, majd a tionil-klorid felesleget rotációs vákumbepárlón eltávolítottuk, és a sav-kloridokat további tisztítás nélkül alakítottuk tovább. A védett hidroxikarbonsavak (10 mmol) vízmentes toluolban (50 cm³) készült oldatához hidroxil csoportonként 1.1 ekvivalens sav-kloridot és 1.1 ekvivalens vízmentes piridint adtunk, majd a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettük, és a reakciók előrehaladását vékonyréteg-kromatográfián követtük (eluens = hexán : etil-acetát = 6:1). A reakciók lejátszódását követően az oldószert rotációs vákumbepárlón eltávolítottuk, majd a maradékot oldottuk etil-acetátban (20 cm³) és 1N HCl-val (2 x 10 ml), majd vízzel (2 x 10 ml) mostuk. A szerves fázist szárítás után bepároltuk és a maradékot oszlopkromatográfián tisztítottuk (eluens = hexán : etil-acetát = 6:1).

(2*S*, 3*S*)-1,4-Bisz(difenilmetil)-2,3-bisz({[(2*E*)-3-fenilprop-2-enoil]oxi})butándioát (88)

Az általános előirat alapján 4.4 g (9.12 mmol) védett D-borkösavból (**71**) és 3.0 g (20.08 mmol) fahéjsavból (**56**) kiindulva 3.53 g fehér kristályos anyagot kaptunk [52%, op.: 120-122°C, [α]_D: 38.9 (c: 0.3, acetone)]. ¹H NMR (CDCl₃): 6.07 (2H, s, H-2, H-3); 6.24 (2H, d, *J* = 16.0, H-2'); 6.94 (2H, s, Ph₂CH); 7.04-7.46 (30H, m, aromás); 7.60 (2H, d, *J* = 16.0, H-3'). ¹³C NMR (CDCl₃): 71.18 (C-2, C-3); 79.21 (2 x Ph₂CH); 116.24 (C-3'); 127.19, 127.45, 128.28, 128.47, 128.68, 129.02, 130.81, 134.20, 138.93, 139.03 (aromás); 146.81 (C-2'); 165.13, 165.47 (C=O); Elemanalízis kalkulált: C₄₈H₃₈O₈ (742.26) C: 77.61; H: 5.16; Mért: C: 77.69; H: 5.23.

(2*R*,3*R*)-1,4-Bisz(difenilmetil)-2,3-bisz({[(2*E*)-3-fenilprop-2-enoil]oxi})butándioát (89)

Az általános előirat alapján 0.8 g (1.65 mmol) védett L-borkösavból (**72**) és 0.54 g (3.65 mmol) fahéjsavból (**56**) kiindulva 0.76 g fehér kristályos anyagot kaptunk [63%, op.: 114-116°C, [α]_D: -33.5 (c: 0.3, acetone)]. ¹H NMR (CDCl₃): 6.16 (2H, s, 2 x H-2, H-3); 6.31 (2H, d, *J* = 16.0, H-2'); 7.03 (2H, s, Ph₂CH); 7.12-7.52 (30H, m, aromás); 7.60 (2H, d, *J* = 16.0, H-3'). ¹³C NMR (CDCl₃): 71.16 (C-2, C-3); 79.18 (Ph₂CH); 116.20 (C-2'); 127.19, 127.45, 128.28, 128.47, 128.68, 129.02, 130.78, 134.15, 138.91, 139.02 (aromás);

146.78 (C-3'); 165.10, 165.44 (C=O); Elemanalízis kalkulált: C₄₈H₃₈O₈ (742.26) C: 77.61; H: 5.16; Mért: C: 77.65; H: 5.21.

(2S)-1,4-Bisz(difenilmetil)-2-({[(2E)-3-fenilprop-2-enoil]oxi})butándioát 96

Az általános előirat alapján 3.1 g (6.6 mmol) védett L-almasavból (**82**) és 1.08 g (7.3 mmol) fahéjsavból (**56**) kiindulva 3.11 g fehér kristályos anyagot kaptunk [79 %, op.: 115 - 117°C, [α]_D: -32.0 (c: 0.3, DMSO)]. ¹H NMR (CDCl₃): 3.19 (2H, m, H-3); 5.89 (1H, m, H-2); 6.48 (1H, d, J = 15.9, H-2'); 6.98 (2H, s, Ph₂CH); 7.38 (25H, aromás); 7.78 (1H, d, J = 15.9, H-3'). ¹³C NMR (CDCl₃): 36.56 (C-3); 68.63 (H-2); 77.90 (Ph₂CH); 78.62 (Ph₂CH); 116.75 (C-2); 127.08, 127.18, 127.28, 128.14, 128.35, 128.62, 128.98, 130.69, 134.20, 139.33, 139.40, 139.70 (aromás); 146.41 (C-3'); 165.70, 168.03, 168.12 (C=O). Elemanalízis kalkulált: C₃₉H₃₂O₆ (596.22) C: 78.51; H: 5.41. Mért: C: 78.58; H: 5.46.

(2S,3S)-1,4-Bisz(difenilmetil)-2,3-bisz({[(2E)-3-{4[(metoxikarbonil)oxi]fenil}prop-2-enoil]oxi})butándioát (90)

Az általános előirat alapján 2.1 g (4.35 mmol) védett D-borkösavból (**71**) és 2.12 g (9.50 mmol) védett 4-hidroxifahéjsavból (**83**) kiindulva 1.87 g fehér kristályos anyagot kaptunk [48%, op.: 112-114°C, [α]_D: 30.3 (c: 0.2, acetone)]. ¹H NMR (CDCl₃): 3.92 (6H, s, OCH₃), 6.05 (2H, s, H-2, H-3), 6.19 (2H, d, J = 16.1, H-2'), 6.93 (2H, s, Ph₂CH), 7.10-7.32 (28H, m, aromás), 7.59 (2H, d, J = 15.9, H-3'), ¹³C NMR (CDCl₃): 55.67 (OCH₃), 71.19 (C-2, C-3), 79.23 (Ph₂CH), 116.55 (C-2'), 121.65, 127.15, 127.41, 128.29, 128.33, 128.69, 129.64, 132.05, 138.88, 138.99, 152.81 (aromás), 145.42 (C-3'), 153.93, 165.05, 165.25 (C=O); Elemanalízis kalkulált: C₅₂H₄₂O₁₄ (890.26) C: 70.11; H: 4.75; Mért: C: 70.17; H: 4.79.

(2R,3R)-1,4-Bisz(difenilmetil)-2,3-bisz({[(2E)-3-{4[(metoxikarbonil)oxi]fenil}prop-2-enoil]oxi})butándioát (91)

Az általános előirat alapján 3.64 g (7.57 mmol) védett L-borkösavból (**72**) és 3.6 g (16.2 mmol) védett 4-hidroxifahéjsavból (**83**) kiindulva 3.62 g fehér kristályos anyagot kaptunk [54%, op.: 110-112°C, [α]_D: -27.80 (c: 0.35, acetone)]. ¹H NMR (CDCl₃): 3.86 (6H, s, OCH₃); 6.11 (2H, s, H-2, H-3); 6.20 (2H, d, J = 16.0, H-2'); 6.95 (2H, s, Ph₂CH); 7.03-

7.46 (28H, m, aromás); 7.55 (2H, d, $J = 16.0$, H-3'); ^{13}C NMR (CDCl_3): 55.28 (OCH_3); 70.88 (C-2, C-3); 78.85 (Ph_2CH); 116.20 (C-2'); 121.31, 126.80, 127.06, 127.96, 128.33, 128.37, 129.32, 131.66, 138.60, 138.72, 152.48 (aromás); 145.09 (C-3'); 152.55, 164.71, 164.90 (C=O); Elemanalízis kalkulált: $\text{C}_{52}\text{H}_{42}\text{O}_{14}$ (890.26) C: 70.11; H: 4.75; Mért: C: 70.15; H: 4.76.

(2*S*,3*R*)-1,4-Bisz(difenilmetil)-2,3-bisz({[(2*E*)-3-{4-[(metoxikarbonil)oxi]fenil}prop-2-enoil]oxi})butándioát (92)

Az általános előirat alapján 1.9 g (3.09 mmol) védett *mezo*-borkösavból (**73**) és 1.9 g (8.6 mmol) védett 4-hidroxifahéjsavból (**83**) kiindulva 1.89 g fehér kristályos anyagot kaptunk [54%, op.: 113-115°C]. ^1H NMR (CDCl_3): 3.90 (6H, s, OCH_3); 6.10 (2H, s, H-2, H-3); 6.34 (2H, d, $J = 16.0$, H-2'); 6.94 (2H, s, Ph_2CH); 7.17-7.35 (28H, m, aromás); 7.69 (2H, d, $J = 16.0$, H-3'). ^{13}C NMR (CDCl_3): 55.28 (OCH_3); 70.88 (C-2, C-3); 78.85 (Ph_2CH); 116.20 (C-2'); 121.31, 126.80, 127.06, 127.96, 128.33, 128.37, 129.32, 131.66, 138.60, 138.72, 152.48 (aromás); 145.09 (C-3'); 152.55, 164.71, 164.90 (C=O); Elemanalízis kalkulált: $\text{C}_{52}\text{H}_{42}\text{O}_{14}$ (890.26) C: 70.11; H: 4.75; Mért: C: 70.18; H: 4.77.

(2*S*)-1,4-Bisz(difenilmetil)-2-({[(2*E*)-3-{4-[(metoxikarbonil)oxi]fenil}prop-2-enoil]oxi})butándioát (97)

Az általános előirat alapján 1.8 g (3.8 mmol) védett L-almasavból (**82**) és 0.96 g (4.2 mmol) védett 4-hidroxifahéjsavból (**83**) kiindulva 1.67 g fehér kristályos anyagot kaptunk [66 %, op.: 99 - 101°C, $[\alpha]_D$: 35.3 (c: 0.2, DMSO)]. ^1H NMR (CDCl_3): 3.08 (2H, d, $J = 6.0$, H-3); 3.84 (3H, s, OCH_3); 6.02 (1H, t, $J = 6.0, 6.0$, H-2); 6.33 (1H, d, $J = 15.9$, H-2'); 6.88 (2H, s Ph_2CH); 7.17-7.33 (24H, m, aromás); 7.59 (1H, d, $J = 15.9$, H-3'). ^{13}C NMR (CDCl_3): 55.51 (OCH_3); 60.36 (C-3); 67.54 (C-2); 77.76 (Ph_2CH); 78.47 (Ph_2CH); 117.13 (C-2'); 121.61, 127.07, 127.27, 128.50, 129.54, 130.69, 139.39, 139.49, 139.78, 152.73, (aromás); 145.00 (C-3'); 153.86, 165.48, 167.97, 168.08, (C=O); Elemanalízis kalkulált: $\text{C}_{41}\text{H}_{34}\text{O}_9$ (670.22) C: 73.42; H: 5.11. Mért: C: 73.49; H: 5.18.

(2*S*,3*S*)-1,4-Bisz(difenilmetil)-2,3-bisz({[(2*E*)-3-{3-metoxi-4-[(metoxikarbonil)oxi]fenil}prop-2-enoil]oxi})butándioát (93)

Az általános előírat alapján 2.3 g (4.77 mmol) védett D-borkösavból (**71**) és 2.62 g (10.4 mmol) védett ferulasavból (**84**) kiindulva 2.67 g fehér kristályos anyagot kaptunk [58 %, op.: 100 - 102°C, $[\alpha]_D$: 40.8 (c: 0.3, MeOH)]. ^1H NMR (CDCl_3): 3.88 (6H, s, OCH_3); 3.95 (6H, s, OCH_3); 6.09 (2H, s, H-2, H-3); 6.21 (2H, d, $J = 15.9$, H-2'); 6.94 (2H, s, Ph_2CH); 7.04-7.33 (26H, m, aromás); 7.56 (2H, d, $J = 15.9$, H-3'). ^{13}C NMR (CDCl_3): 55.70 (OCH_3); 56.11 (OCH_3); 71.11 (C-2, C-3); 79.27 (Ph_2CH); 111.43 (C-2'); 145.84 (C-3'); 116.55, 121.70, 122.89, 127.10, 127.33, 128.25, 128.30, 128.63, 128.67, 133.23, 138.77, 138.95, 151.55 (aromás); 153.59, 165.00, 165.13 (C=O); Elemanalízis kalkulált: $\text{C}_{54}\text{H}_{46}\text{O}_{16}$ (950.29) C: 68.20; H: 4.88; Mért: C: 68.21; H: 4.89.

(2*R*,3*R*)-1,4-Bisz(difenilmetil)-2,3-bisz({[(2*E*)-3-{3-metoxi-4-[(metoxikarbonil)oxi]fenil}prop-2-enoil]oxi})butándioát (94)

Az általános előírat alapján 2.82 g (5.85 mmol) védett L-borkösavból (**72**) és 3.2 g (12.8 mmol) védett ferulasavból (**84**) kiindulva 2.65 g sárga szirupot kaptunk [48%, $R_f = 0.74$ (eluens: hexán : etil-acetát, 3:1), $[\alpha]_D$: -37.97 (c: 0.4, MeOH)]. ^1H NMR (CDCl_3): 3.92 (6H, s, OCH_3); 3.95 (6H, s, OCH_3); 6.14 (2H, s, H-2, H-3); 6.24 (2H, d, $J = 15.95$, H-2'); 6.99 (2H, s, Ph_2CH). 7.09-7.38 (26H, m, aromás); 7.59 (2H, d, $J = 15.9$, H-3'). ^{13}C NMR (CDCl_3): 55.70 (OCH_3); 56.11 (OCH_3); 71.11 (C-2, C-3); 79.27 (Ph_2CH); 111.43 (C-2'); 116.55, 121.70, 122.89, 127.10, 127.33, 128.25, 128.30, 128.63, 128.67, 133.23, 138.77, 138.95, 151.55, (aromás); 145.84 (C-3'); 153.59, 165.00, 165.13 (C=O); Elemanalízis kalkulált: $\text{C}_{54}\text{H}_{46}\text{O}_{16}$ (950.29) C: 68.20; H: 4.88; Mért: C: 68.25; H: 4.90.

(2*R*,3*S*)-1,4-Bisz(difenilmetil)-2,3-bisz({[(2*E*)-3-{3-metoxi-4-[(metoxikarbonil)oxi]fenil}prop-2-enoil]oxi})butándioát (95)

Az általános előírat alapján 2.1 g (4.35 mmol) védett *mezo*-borkösavból (**73**) és 2.4 g (9.59 mmol) védett ferulasavból (**84**) kiindulva 2.02 g sárga szirupot kaptunk [48 %, $R_f = 0.71$ (eluens: hexán : etil-acetát, 3:1)] ^1H NMR (CDCl_3): 3.91 (6H, s, OCH_3); 3.95 (6H, s, OCH_3); 6.12 (2H, s, H-2, H-3); 6.39 (2H, d, $J = 15.9$, H-2'); 6.93 (2H, s, Ph_2CH); 7.10-7.40 (26H, m, aromás); 7.69 (2H, d, $J = 15.9$, H-3'). ^{13}C NMR (CDCl_3): 55.57 (OCH_3);

55.91 (OCH₃); 71.44 (C-2, C-3); 79.56 (Ph₂CH); 111.41 (C-2'); 116.58, 121.90, 122.71, 126.96, 127.15), 128.08, 128.36, 128.67, 133.00, 138.87, 138.96, 141.81, 151.35 (aromás); 145.92 (C-3'); 153.39, 164.97, 165.05 (C=O); Elemanalízis kalkulált: C₅₄H₄₆O₁₆ (950.29) C: 68.20; H: 4.88; Mért: C: 68.22; H: 4.89.

(2S)-1,4-Bisz(difenilmetil)-2-[(2E)-3-{3-metoxi-4-[(metoxikarbonil)oxi]fenil}prop-2-enoil]oxi}butándioát (98)

Az általános előírat alapján 1.1 g (2.3 mmol) védett L-almasavból (**82**) és 1.10 g (4.6 mmol) védett ferulasavból (**84**) kiindulva 2.0 g fehér kristályos anyagot kaptunk [66 %, op.: 96 - 98°C, [α]_D: 46.2 (c: 0.3, DMSO)]. ¹H NMR (CDCl₃): 3.24 (2H, d, *J* = 5.8, H-3); 3.87 (3H, s, OCH₃); 3.93 (3H, s, OCH₃); 5.97 (1H, t, *J* = 5.8, H-2); 6.48 (1H, d, *J* = 15.9, H-2'); 7.04 (1H, s, Ph₂CH); 7.07 (1H, s, Ph₂CH); 7.30-7.45 (23H, m, aromás) 7.76 (1H, d, *J* = 15.9, H-3'). ¹³C NMR (CDCl₃): 55.47 (OCH₃); 55.79 (OCH₃); 60.21 (C-3); 68.54 (C-2); 77.73 (Ph₂CH); 78.50 (Ph₂CH); 111.49 (C-2'); 117.07; 121.33, 122.73, 127.01, 127.97, 128.48, 133.19, 139.28, 139.38, 139.66, 141.77, 151.40, 153.46, (aromás); 145.34 (C-3'); 165.33, 167.81 167.96 (C=O); Elemanalízis kalkulált: C₄₂H₃₆O₁₀ (700.23) C: 71.99; H: 5.18. Mért: C: 72.08; H: 5.27.

Általános előírat a difenilmetil védőcsoportok eltávolítására

A biszdifenilmetil alkanoát (1.59 mmol) vízmentes diklórmetánban készült oldatához (2 ml) 1.2 ml vízmentes anizolt (11,15 mmol, 7 ekv.) adtunk és 30 percig kevertettük 0 °C-on. Ezt követően a reakcióelegyhez 3 ml trifluorecetsavat (39,7 mmol, 25 ekv.) adtunk és a reakcióelegyet tovább kevertettük 0 °C-on. A reakciót vékonyréteg-kromatográfián követtük, majd a kiindulási anyag teljes átalakulását követően rotációs vákuumbepárlón bepároltuk és a nyersterméket oszlopkromatográfián tisztítottuk. (toluol – ecetsav = 3:1)

(2S,3S)-2,3-Bisz({[(2E)-3-fenilprop-2-enoil]oxi})bután-1,4-disav (99)

Az általános előírat alapján 0.5 g (0.67 mmol) **88** és 0.5 ml absz. anizol (4.70 mmol), 1.2 ml TFA (16.87 mmol) felhasználásával 0.23 g sárga kristályos anyagot kaptunk [83 %, op.: 157-160°C, [α]_D: 87.52 (c: 1, MeOH)]. ¹H NMR (DMSO-d₆): 5.76

(2H, s, H-2, H-3); 6.77 (2H, d, $J = 16.0$, H-2'); 7.46 (6H, m, aromás); 7.76 (2H, d, $J = 16.0$, H-3'); 7.79 (4H, m, aromás). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 70.93 (C-2, C-3); 116.63 (C-2'); 128.74, 129.04, 130.96, 133.71 (aromás). 146.50 (C-3'). 165.28, 167.37 (C=O). GC-MS (TMS)₃ Kalkulált m/z : 554.18, Retenciósi idő: 13.129 min, Mért: 554.2; Elemanalízis kalkulált: C₂₂H₁₈O₈ (410.10) C: 64.39; H: 4.42. Mért: C: 64.38; H: 4.40.

(2R,3R)-2,3-Bisz({[(2E)-3-fenilprop-2-enoil]oxi})bután-1,4-disav (100)

Az általános előirat alapján 0.2 g (0.26 mmol) **89** és 0.2 ml absz. anizol (1.88 mmol), 0.5 ml TFA (6.70 mmol) felhasználásával 0.11 g fehér kristályos anyagot kaptunk [86 %, op.: 126-128°C, $[\alpha]_D$: -68.8 (c: 0.2, MeOH)]. ^1H NMR (DMSO- d_6): 5.85 (2H, s, H-2, H-3); 6.65 (2H, d, $J = 16.0$, H-2'); 7.43 (6H, m, aromás); 7.65 (4H, m, aromás); 7.81 (2H, d, $J = 16.0$, H-3'). ^{13}C -HNMR (DMSO- d_6): 71.54 (C-2, C-3); 117.56 (C-2'); 128.51, 128.97, 133.89 (aromás); 145.43 (C-3'); 165.37, 168.05 (C=O); Elemanalízis kalkulált: C₂₂H₁₈O₈ (410.10) C: 64.39; H: 4.42. Mért: C: 64.41; H: 4.44.

(2R)-2,3-Bisz({[(2E)-3-fenilprop-2-enoil]oxi})bután-1,4-disav (113)

Az általános előirat alapján 0.95 g (1.6 mmol) **96** és 1.2 ml absz. anizol (11.1 mmol), 3 ml TFA (39.7 mmol) felhasználásával 0.35 g sárga szirupot kaptunk [85 %, $R_f = 0.18$ (hexán : etil-acetát 1:1), $[\alpha]_D$: 20.1 (c: 0.3, DMSO)]. ^1H NMR (CDCl₃): 2.89 (2H, d, $J = 6.7$, H-3); 5.51 (1H, t, $J = 9.7$, H-2); 6.43 (1H, d, $J = 16.1$, H-2'); 7.33 (3H, m, aromás); 7.45 (2H, m, aromás); 7.69 (1H, d, $J = 16.0$, H-3'). ^{13}C NMR (CDCl₃): 36.06 (C-3); 68.58 (C-2); 116.83 (C-2'); 128.22, 128.89, 130.59, 134.12, (aromás); 146.27 (C-3'); 166.26 (OCO); 171.27, 171.78 (COOH). Elemanalízis kalkulált: C₁₃H₁₂O₆ (264.06) C: 59.09; H: 4.58. Mért: C:59.61; H: 4.74.

(2S,3S)-2,3-Bisz({[(2E)-3-{4-[(metoxikarbonil)oxi]fenil}prop-2-enoil]oxi})bután-1,4-disav (101)

Az általános előirat alapján 1.2 g (1.34 mmol) **90** és 0.67 ml absz. anizol (9.38 mmol), 2.5 ml TFA (33.5 mmol) felhasználásával 0.66 g fehér kristályos anyagot kaptunk [88%, op.: 199-201°C, $[\alpha]_D$: 103.8 (c: 0.2, MeOH)]. ^1H NMR (DMSO- d_6): 3.67 (3H, s, OCH₃); 5.55 (2H, s, H-2, H-3); 6.60 (2H, d, $J = 15.7$, H-2'); 7.28 (4H, d, $J = 7.9$, aromás);

7.75 (6H, m, aromás, H-3'). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 55.83 (OCH₃); 73.30 (C-2, C-3) 118.25, 120.92, 137.97, 143.59, 152.54, (aromás); 148.99 (C-3'); 153.89, 166.19, 169.30 (C=O); Elemanalízis kalkulált: C₂₆H₂₂O₁₄ (558.10) C: 55.92; H: 3.97. Mért: C: 55.99; H: 3.99.

(2R,3R)-2,3-Bisz({[(2E)-3-{4-[(metoxikarbonil)oxi]fenil}prop-2-enoil]oxi})bután-1,4-disav (102)

Az általános előírat alapján 0.3 g (0.33 mmol) **91** és 0.25 ml absz. anizol (2.36 mmol), 0.564 ml TFA (8.42 mmol) felhasználásával 0.15 g fehér kristályos anyagot kaptunk [82%, op.: 127-130°C, $[\alpha]_D$: -151.072 (c: 0.4, MeOH)]. ^1H NMR (DMSO- d_6): 3.87 (3H, s, OCH₃); 5.76 (2H, s, H-2, H-3); 6.79 (2H, d, J = 16.0, H-2'); 7.33 (4H, d, J = 7.9, H-2'', H-6''); 7.79 (2H, d, J = 15.9, H-3'); 7.88 (4H, d, J = 7.9, H-3'', H-5''). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 55.65 (OCH₃); 71.38 (C-2, C-3); 117.35 (C-2'); 121.92, 131.87, 131.87, 152.44 (aromás); 145.04 (C-3'); 153.36, 165.34, 167.68 (C=O); Elemanalízis kalkulált: C₂₆H₂₂O₁₄ (558.10) C: 55.92; H: 3.97. Mért: C: 55.97; H: 3.99.

(2R,3S)-2,3-Bisz({[(2E)-3-{4-[(metoxikarbonil)oxi]fenil}prop-2-enoil]oxi})bután-1,4-disav (103)

Az általános előírat alapján 0.36 g (0.41 mmol) **92** és 0.37 ml absz. anizol (3.49 mmol), 0.88 ml TFA (11.8 mmol) felhasználásával 0.18 g sárga amorf anyagot kaptunk [80%]. ^1H NMR (CDCl₃): 3.92 (6H, s, OCH₃); 5.86 (2H, s, H-2, H-3); 6.52 (2H, d, J = 16.0, H-2'); 7.21 (4H, d, J = 8.4, H-3'', H-5''); 7.56 (4H, d, J = 8.4, H-2'', H-6''); 7.75 (2H, d, J = 16.0, H-3'). ^{13}C NMR: 55.45 (OCH₃); 71.4 (C-2, C-3); 117.22 (C-2'); 114.08, 121.47, 129.38, 131.99 (aromás); 144.92 (C-3'); 152.46, 153.65, 165.34, 167.77 (C=O); Elemanalízis kalkulált: C₂₆H₂₂O₁₄ (558.10) C: 55.92; H: 3.97. Mért: C: 55.88; H: 3.90.

(2S)-2-({[(2E)-3-{4-[(Metoxikarbonil)oxi]fenil}prop-2-enoil]oxi})bután-1,4-disav (114)

Az általános előírat alapján 1.3 g (1.9 mmol) **97** és 1.48 ml absz. anizol (13.5 mmol), 3.6 ml TFA (48.5 mmol) felhasználásával 0.59 g fehér kristályos anyagot kaptunk [90 %, op.: 131 - 133°C, $[\alpha]_D$: 16.4 (c: 0.3, DMSO)]. ^1H NMR (CDCl₃): 3.14 (2H, d, J = 6.8, H-3); 4.08 (3H, s, OCH₃); 5.74 (1H, t, J = 6.8, H-2); 6.64 (1H, d, J = 16.0, H-2'); 7.23

(2H, d, $J = 8.5$, H-3'', H-5''); 7.60 (2H, d, $J = 8.5$, H-2'', H-6''); 7.74 (1H, d, $J = 16.01$, H-3''). ^{13}C NMR (CDCl_3): 35.84 (C-3); 55.28 (OCH_3); 68.55 (C2); 117.11 (C-2'); 121.37, 129.28, 131.99, 152.41 (aromás); 144.68 (C-3'); 153.58, 165.96, 171.01, 171.50 (C=O). Elemanalízis kalkulált: $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_9$ (338.06) C: 53.26; H: 4.17. Mért: C: 53.32; H: 4.28.

(2*S*,3*S*)-2,3-Bisz({[(2*E*)-3-{3-metoxi-4-[(metoxikarbonil)oxi]fenil}prop-2-enoil]oxi})bután-1,4-disav (104)

Az általános előirat alapján 0.7 g (0.73 mmol) **93** és 0.56 ml absz. anizol (5.5 mmol), 1.4 ml TFA (18.4 mmol) felhasználásával 0.38 g fehér kristályos anyagot kaptunk [85%, op.: 172-175°C, $[\alpha]_{\text{D}}$: 88.7 (c: 0.2, MeOH)]. ^1H -NMR (DMSO-d_6): 4.2 (12H, s, OCH_3); 5.81 (2H, s, H-2, H-3); 6.77 (2H, d, $J = 16.0$, H-2'); 7.21-7.35 (6H, m, aromás); 7.79 (2H, d, $J = 15.9$, H-3'). ^{13}C NMR (DMSO-d_6): 56.73 (OCH_3); 56.97 (OCH_3); 72.04 (C-2, C-3); 117.84 (C-2'); 113.00, 122.79, 123.88, 133.86, 142.17, 152.02 (aromás); 146.69 (C-3'); 154.06, 166.33, 168.54 (C=O); Elemanalízis kalkulált: $\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{O}_{16}$ (618.12) C: 54.37; H: 4.24. Mért: C: 54.41; H: 4.29.

(2*R*,3*R*)-2,3-Bisz({[(2*E*)-3-{3-metoxi-4-[(metoxikarbonil)oxi]fenil}prop-2-enoil]oxi})bután-1,4-disav (105)

Az általános előirat alapján 0.15 g (0.15 mmol) **94** és 0.11 ml absz. anizol (1.09 mmol), 0.29 ml TFA (3.9 mmol) felhasználásával 0.077 g fehér kristályos anyagot kaptunk [79 %, op.: 168-170°C, $[\alpha]_{\text{D}}$: -97.8 (c: 0.3, MeOH)]. ^1H NMR (Aceton- d_6): 3.87 (6H, s, OCH_3); 3.96 (6H, s, OCH_3); 5.92 (2H, s, H-2, H-3); 6.73 (2H, d, $J = 15.9$, H-2'); 7.24 (2H, d, $J = 8.1$, H-5''); 7.34 (2H, d, $J = 8.1$, H-6''); 7.62 (2H, s, H-2''); 7.77 (2H, d, $J = 15.9$, H-3'). ^{13}C NMR (Aceton- d_6): 55.94 (OCH_3); 56.55 (OCH_3); 71.77 (C-2, C-3); 117.80 (C-2''); 112.58, 122.85, 123.70, 134.20, 146.58, 152.68 (aromás); 142.97 (C-3''); 154.14, 166.01, 167.44 (C=O); Elemanalízis kalkulált: $\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{O}_{16}$ (618.12) C: 54.37; H: 4.24. Mért: C: 54.44; H: 4.32.

(2*S*,3*R*)-2,3-Bisz({[(2*E*)-3-{3-metoxi-4-[(metoxikarbonil)oxi]fenil}prop-2-enoil]oxi})bután-1,4-disav (106)

Az általános előírat alapján 1.5 g (1.5 mmol) **95** és 1.2 ml absz. anizol (11.0 mmol), 2.9 ml TFA (39.2 mmol) felhasználásával 0.89 g fehér kristályos anyagot kaptunk [92%, op.: 174-176°C]. ¹H NMR (CD₃OD): 3.65 (6H, s, OCH₃); 3.72 (6H, s, OCH₃); 5.72 (2H, s, H-2, H-3); 6.49 (2H, d, *J* = 15.9, H-2'); 6.98 (2H, d, *J* = 8.1, H-5''); 7.04 (2H, brd, *J* = 8.1, H-6''); 7.16 (2H, brs, H-2''); 7.58 (2H, d, *J* = 15.9, H-3'). ¹³C NMR (CD₃OD): 56.21 (OCH₃); 56.56 (OCH₃); 72.88 (C-2, C-3); 118.26 (C-2'); 112.81, 122.71, 123.80, 134.78, 143.22, 152.92, (aromás); 146.85 (C-3'); 155.07, 167.01, 169.41 (C=O); Elemanalízis kalkulált: C₂₈H₂₆O₁₆ (618.12) C: 54.37; H: 4.24. Mért: C: 54.38; H: 4.24.

(2*R*)-2-({[(2*E*)-3-{3-Metoxi-4-[(metoxikarbonil)oxi]fenil}prop-2-enoil]oxi})bután-1,4-disav (115)

Az általános előírat alapján 1.5 g (2.14 mmol) **98** és 1.6 ml absz. anizol (15.0 mmol), 4.0 ml TFA (53.5 mmol) felhasználásával 0.68 g fehér kristályos anyagot kaptunk [87 %, op.: 137 - 139°C, [α]_D: 6.3 (c: 0.3, DMSO)]. ¹H NMR (D₂O): 2.84 (1H, dd, *J* = 8.4, 16.2, H-3_A); 2.94 (1H, dd, *J* = 2.8, 16.2, CH-3_B); 3.82 (3H, s, OCH₃); 3.89 (3H, s, OCH₃); 5.37 (1H, dd, *J* = 2.8, 8.4, H-2); 6.82 (1H, d, *J* = 16.1, H-2'); 7.28 (1H, d, *J* = 8.4, H-5''); 7.35 (1H, brd, *J* = 8.4, H-6''); 7.64 (1H, brs, H-2''); 7.72 (1H, d, *J* = 16.1, H-3'). ¹³C NMR (D₂O): 35.84 (C-3); 55.70 (OCH₃); 56.18 (OCH₃); 68.68 (C-2); 117.86 (C-2'); 112.16, 122.05, 122.82, 133.25, 141.18, 151.16, 144.90 (C-3'); 152.96, 165.47, 171.21, 170.79 (C=O). GC-MS (TMS)₃ Kalkulált. m/z: 512.1, Retenció idő: 11.637 min, Mért: 512.2. Elemanalízis kalkulált: C₁₆H₁₆O₁₀ (368.07) C: 52.18; H: 4.38. Mért: C: 52.25; H: 4.48.

Általános előírat metoxikarbonil védőcsoportok eltávolítására⁷¹

A metoxikarbonilezett származék (0.33 mmol) metanolos oldatához (5 cm³) 2 cm³ 25%-os NH₃ oldatot adtunk, a reakcióelegyet a kiindulási anyag teljes átalakulásáig szobahőmérsékleten kevertettük (eluens: toluol: ecetsav 1:3). A kiindulási anyag átalakulását követően a reakcióelegyet 10% -os sósavval megsavanyítottuk, majd rotációs vákuumbepárlón szárazra pároltuk. A párlási maradékot hexánban eldörzsölve a termék

kikristályosodott, amit szűrtünk és levegőn szárítottunk. Szükség esetén a nyersterméket oszlopkromatográfiásan tisztítottuk (eluens: toluol : ecetsav 1:3).

(2*S*,3*S*)-2,3-bisz({[(2*E*)-3-(4-hidroxifenil)prop-2-enoil]oxi})bután-1,4-disav (107)

Az általános előirat szerint 200 mg (0.3 mmol) **101**-ből kiindulva 135 mg fehér kristályos terméket kaptunk [85%, op.: 258-260°C, $[\alpha]_D$: 87.3 (c: 0.3, DMSO)]. ^1H NMR (DMSO- d_6): 5.65 (2H, s, H-2, H-3); 6.45 (2H, d, $J = 15.9$, H-2'); 6.79 (4H, d, $J = 8.4$, H-3'', H-5''); 7.40 (4H, d, $J = 8.4$, H-2'', H-6''); 7.70 (2H, d, $J = 15.9$, =CH). ESI-MS: 441.081 [M-H]⁻; Elemanalízis kalkulált: C₂₂H₁₈O₁₀ (442.09) C: 59.73; H: 4.10. Mért: C: 59.78; H: 4.19.

(2*R*,3*R*)-2,3-Bisz({[(2*E*)-3-(4-hidroxifenil)prop-2-enoil]oxi})bután-1,4-disav (108)

Az általános előirat szerint 186 mg (0.33 mmol) **102**-ből kiindulva 132 mg fehér kristályos terméket kaptunk [89 %, op.: 256-258°C, $[\alpha]_D$: -101.8 (c: 0.4, DMSO)]. ^1H NMR (DMSO- d_6): 5.61 (2H, s, H-2, H-3); 6.47 (2H, d, $J = 16.1$, H-2'); 6.85 (4H, d, $J = 8.2$, H-3'', H-5''); 7.50 (4H, d, $J = 8.2$, H-2'', H-6''); 7.68 (2H, d, $J = 14.6$, H-3'). 115.62 (C-2'); 116.72, 126.92 130.92 133.85 (aromás), 145.99 (C-3'), 160.91 167.93 (C=O). ESI-MS: 441.052 [M-H]⁻; Elemanalízis kalkulált: C₂₂H₁₈O₁₀ (442.09) C: 59.73; H: 4.10. Mért: C: 59.80; H: 4.21.

(2*S*,3*R*)-2,3-Bisz({[(2*E*)-3-(4-hidroxifenil)prop-2-enoil]oxi})bután-1,4-disav (109)

Az általános előirat szerint 180 mg (0.32 mmol) **103**-ből kiindulva 45 mg sárga amorf anyagot kaptunk [30%]. ^1H NMR (CDCl₃ + DMSO): 5.56 (2H, s, H-2, H-3); 6.11 (2H, d, $J = 15.9$, H-2'); 6.61 (4H, d, $J = 7.8$, H-3'', H-5''); 7.16 (4H, d, $J = 7.8$, H-2'', H-6''); 7.44 (2H, d, $J = 15.9$, H-3'). ESI-MS: 441.073 [M-H]⁻; Elemanalízis kalkulált: C₂₂H₁₈O₁₀ (442.09) C: 59.73; H: 4.10. Mért: C: 59.75; H: 4.15.

(2*S*)-2-({[(2*E*)-3-(4-Hidroxifenil)prop-2-enoil]oxi})bután-1,4-disav(116)

Az általános előirat szerint 510 mg (1.5 mmol) **114**-ből kiindulva 360 mg fehér kristályos anyagot kaptunk [85 %, op.: 175-177°C, $[\alpha]_D$: 25.5 (c: 0.3, DMSO)]. ^1H NMR

(D₂O): 2.56 (1H, m, H-3_A); 2.64 (1H, m, H-3_B); 5.08 (1H, m, H-2); 6.29 (1H, d, $J = 15.4$, H-2'); 6.78 (2H, d, $J = 8.4$, H-3'', H-5''); 7.43 (2H, d, $J = 8.4$, H-2'', H-6''); 7.55 (1H, d, $J = 15.4$, H-3'). ¹³C NMR (D₂O + acetone-d₆): 40.38 (C-3); 112.33 (C-2'); 115.94, 124.77, 130.06 (aromás); 143.99 (C-3'); 156.47, 166.10 (C=O). GC-MS (TMS)₃ Kalkulált m/z: 496.2, Retenciós idő: 10.879 perc, Mért: 496.2; Elemanalízis kalkulált: C₁₃H₁₂O₇ (280.06) C: 55.72; H: 4.32. Mért: C: 55.77; H: 4.40.

(2*S*,3*S*)-2,3-Bisz({[(2*E*)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)prop-2-enoil]oxi})bután-1,4-disav (110)

Az általános előirat szerint 300 mg (0.48 mmol) **104**-ből kiindulva 199 mg sárga kristályos anyagot kaptunk [81%, op.: 260-262°C, $[\alpha]_D$: 76.1 (c: 0.2, DMSO)]. ¹H NMR (CD₃OD): 3.86 (6H, s, OCH₃); 5.70 (2H, s, H-2, H-3); 6.48 (2H, d, $J = 15.7$, H-2'); 6.77 (2H, d, $J = 8.4$, H-5''); 7.06 (2H, d, $J = 8.4$, H-6''); 7.19 (2H, s, H-2''); 7.66 (2H, d, $J = 15.7$, H-3'). ¹³C NMR (DMSO-d₆): 56.35 (OCH₃); 111.71 (C-2'); 116.02, 116.38, 123.63, 126.63 148.76 (aromás); 145.13 (C-3'); 150.30, 166.81 (C=O). ESI-MS: 501.104 [M-H]; Elemanalízis kalkulált: C₂₄H₂₂O₁₂ (502.11) C: 57.37; H: 4.41. Mért: C: 57.38; H: 4.41.

(2*R*,3*R*)-2,3-Bisz({[(2*E*)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)prop-2-enoil]oxi})bután-1,4-disav (111)

Az általános előirat szerint 200 mg (0.32 mmol) **105**-ből kiindulva 113 mg sárga kristályos anyagot kaptunk [69%, op.: 261-263°C, $[\alpha]_D$: -108.1 (c: 0.5, DMSO)]. ¹H NMR (DMSO-d₆): 3.71 (6H, s, OCH₃); 5.39 (2H, s, H-2, H-3); 6.37 (2H, d, $J = 15.7$, H-2'); 6.83 (2H, d, $J = 7.8$, H-5''); 7.0 (2H, brd, $J = 7.7$, H-6''), 7.2 (2H, s, H-2''); 7.56 (2H, d, $J = 15.7$, H-3'). ¹³C NMR (DMSO-d₆): 55.57 (OCH₃); 111.24 (C-2'); 115.42, 115.76, 122.60, 125.34, 147.96 (aromás); 144.09 (C-3'); 149.70, 166.14 (C=O); ESI-MS: 501.108 [M-H]; Elemanalízis kalkulált: C₂₄H₂₂O₁₂ (502.11) C: 57.37; H: 4.41. Mért: C: 57.44; H: 4.48.

(2*R*,3*S*)-2,3-Bisz({[(2*E*)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)prop-2-enoil]oxi})bután-1,4-disav (112)

Az általános előirat szerint 1.0 g (1.6 mmol) **106**-ből kiindulva 718 mg fehér kristályos anyagot kaptunk [88%, op.: 267-269 °C]. ¹H NMR (DMSO-d₆): 3.79 (6H, s, OCH₃); 5.46

(2H, s, H-2, H-3); 6.51 (2H, d, $J = 15.0$, H-2'); 6.80 (2H, d, $J = 6.8$, H-5''); 7.03 (2H, d, $J = 6.8$, H-6''); 7.26 (2H, s, H-2''); 7.50 (2H, d, $J = 15.0$, H-3'). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 56.73 (OCH₃); 110.97 (C-2'); 115.92, 116.43, 123.68, 126.42, 148.88 (aromás); 144.99 (C-3'); 150.78, 167.01 (C=O). ESI-MS: 501.103 [M-H]; Elemanalízis kalkulált: C₂₄H₂₂O₁₂ (502.11) C: 57.37; H: 4.41. Mért: C: 57.40; H: 4.43.

(2S)-2-([(2E)-3-(4-Hidroxi-3-metoxifenil)prop-2-enoil]oxi})bután-1,4-disav (117)

Az általános előírat szerint 512 mg (1.39 mmol) **115**-ből kiindulva 449 mg fehér kristályos anyagot kaptunk [88%, op.: 170-172°C, $[\alpha]_D$: 29.8 (c: 0.2, DMSO)]. ^1H NMR (D₂O): 2.70 (1H, d, $J = 11.2$, H-3_A); 2.82 (1H, d, $J = 14.1$, H-3_B); 3.85 (3H, s, OCH₃); 3.89 (3H, s, OCH₃); 5.21 (1H, d, $J = 9.7$, H-2); 6.42 (1H, d, $J = 15.8$, H-2'); 6.89 (1H, d, $J = 8.2$, H-5''); 7.11 (1H, d, $J = 7.9$, H-6''); 7.19 (1H, s, H-2''); 7.60 (1H, d, $J = 16.1$, H-3'). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 53.78 (OCH₃); 57.18 (C-2); 116.03 (C-2'); 112.56, 117.05, 124.85, 128.15, 149.15, 149.49 (aromás); 147.09 (C-3'); 161.16, 169.98, 177.93 (C=O); GC-MS (TMS)₃ kalkulált m/z: 526.19, Retenciós idő: 11.261 perc, Mért: 526.3, Elemanalízis kalkulált: C₁₄H₁₄O₈ (310.07) C: 54.20; H: 4.55. Mért: C: 54.29; H: 4.61.

***N*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-glükopiranozil)-1*H*-indol-2-karboxamid (163)**

Az *N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-glükopiranozil)-azid (**165**, 451 mg, 1.21 mmol) vízmentes diklórmétánban (10 ml) készült oldatához trimetilfoszin 1M-os toluolos oldatát adtuk (1.2 ml, 91 mmol). A reakció beindulását intenzív gázfejlődés jelezte. Az iminofoszfórán intermedier képződését vékonyréteg-kromatográfiásan követtük (kloroform : metanol = 1 : 1), majd a kiindulási anyag teljes átalakulását követően 1*H*-indol-2-karbonsavkloridot (217 mg, 1.34 mmol) adtuk az elegyhez, és szobahőmérsékleten 8 órán át kevertettük. Az oldószert ezt követően vákuumban eltávolítottuk, és a maradékot oszlopkromatográfiásan tisztítva (eluens = hexán – etil-acetát =1:1) sárga kristályos anyagot kaptunk [272 mg, 46%, op.: 158-160°C, $[\alpha]_D$: - 19.36 (c: 0.6, DMSO)]. ^1H NMR (DMSO- d_6): 1.88 - 2.16 (12H, 4 x s, 4 x CH₃); 3.96 (1H, ddd, $J = 9.8$, 4.2 és <1 Hz, H-5); 4.07 (1H, dd, $J = 12.6$ és <1 Hz, H-6_A); 4.31 (1H, dd, $J = 12.8$ és 4.2 Hz, H-6_B); 5.09, 5.11, 5.52, 5.55 (4 x 1H, 4 *pszeudo* t, $J = 9.8$, 9.8, 9.8 és 9.8 Hz, H-1, H-2, H-3, H-4); 6.91- 7.45 (5H, m, aromás); 7.63 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, CONH); 9.89 (1H, s, indol-NH). ^{13}C NMR

(DMSO-d₆): 20.75 (4 x CH₃); 61.75 (C-6); 68.33 - 73.56 (C-2, C-3, C-4, C-5); 78.75 (C-1); 104.39, 112.17, 122.46, 125.26, 127.44, 129.10, 136.91 (aromás); 161.92 (CONH); 169.76, 170.26, 170.93, 171.71 (C=O); Elemanalízis kalkulált: C₂₃H₂₆O₁₀ (490.16) C: 56.32; H: 5.34; N: 5.71. Mért: C: 56.27; H: 5.30; N: 5.76.

***N*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-2*H*-tetrazol-5-karboxamid (172)**

A **171** cianokarbonil származék (2.00 g, 5.0 mmol) vízmentes toluolban (90 ml), készült oldatához Me₃SiN₃ toluolos oldatát (2.23 cm³, 16.96 mmol) és Bu₂SnO-t (0.10 g, 0.42 mmol) adtunk, majd a reakcióelegyet egy éjszakán át kevertettük 80 °C-on. Ezt követően az oldószert rotációs vákuumbepárlón eltávolítottuk és a maradékot metanolból átkristályosítva 1.95 g fehér kristályos anyagot kaptunk [88 %, op.: 174-177 °C, [α]_D = -1.61, c : 0.335, CHCl₃]. ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 1.93 (3H, s, COCH₃); 1.99 (9H, s, COCH₃); 3.99 (1H, m, H-5); 4.10 (1H, dd, *J* = 12.3, <1, H-6_A); 4.24 (1H, dd, *J* = 12.3, 2.8, H-6_B); 5.22, 5.32, 5.47, 5.66 (4 x 1H, 4 *pseudo* t, *J* = 9.6, 9.1 Hz, H-1, H-2, H-3, H-4); 7.26-7.01 (1H, kiszélesedett s, NH); 8.74 (1H, kiszélesedett s, CONH); ¹³C NMR (CDCl₃) δ (ppm): 20.54 és 20.61 (COCH₃); 61.78 (C-6); 68.01, 70.42, 73.07, 73.74 (C-2, C-3, C-4, C-5); 77.96 (C-1); 152.59 (tetrazol C-5); 156.97 (amid CO); 169.69, 170.23, 170.47, 170.83 (COCH₃); Elemanalízis kalkulált: C₁₆H₂₁N₅O₁₀ (443.13): C: 43.34, H: 4.77, N: 15.80. Mért: C: 43.39, H: 4.89, N: 15.94.

Általános előirat *N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-5-aril-1,3,4-oxadiazol-2-karboxamid szintézisére

A **172** tetrazol (2.25 mmol) vízmentes toluolban készült oldatához (15 ml) aroil-kloridot (3.37 mmol) adtunk, és a reakcióelegyet 80 °C-on két órán át kevertettük. Az oldószert rotációs-vákuumbepárló eltávolítottuk, és a párlási maradékot oszlopkromatográfiásan tisztítottuk (eluens: hexán : etil-acetát : 2 : 1).

***N*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-5-(naft-2-il)-1,3,4-oxadiazol-2-karboxamid (188)**

Az általános előirat alapján 2-naftoil-kloridból **175** (640 mg, 3.37 mmol) és 1.0 g (2.25 mmol) **172** tetrazolból kiindulva 943 mg fehér kristályos anyagot kaptunk [74 %,

op.: 186-188 °C, $[\alpha]_D = -12.843$, $c : 0.61$, DMSO]. ^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm): 2.04 (3H, s, COCH_3); 2.06 (6H, s, 2 x COCH_3); 2.07 (3H, s, COCH_3); 3.95 (1H, ddd, $J = 9.3$, 2.6 és < 1 Hz, H-5); 4.15 (1H, dd, $J = 12.3$ és 4.3, H-6_A); 4.30 (1H, dd, $J = 12.6$ és 2.0 Hz, H-6_B); 5.16, 5.23, 5.40, 5.49 (4 x 1H, 4 *pszeudo* t; $J = 9.5$, 9.5, 9.5, és 9.2 Hz; H-1, H-2, H-3, H-4); 7.54 (2H, m, aromás); 7.81 (1H, d, $J = 7.6$ Hz; NH); 7.88 (2H, t, $J = 7.2$ Hz; aromás); 8.09 (2H, m, aromás); 8.57 (1H, s, H-1 naftalin). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ (ppm): 20.67 (4x COCH_3); 61.83 (C-6); 68.24, 70.54, 72.96, 74.05, (C-2; C-3, C-4, C-5); 78.29 (C-1); 123.23, 127.39, 128.03, 128.68, 129.12, 129.30, 132.75, 135.19 (aromás); 153.76, 157.75 (C-2, C-5 oxadiazol); 167.09(NHCO); 169.59, 170.06, 170.68, 170.98 (COCH_3); Elemanalízis kalkulált: $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_{11}$ (569.16): C: 56.94, H: 4.78, N: 7.38. Mért: C: 57.02, H: 4.86, N: 7.45.

***N*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-glükopiranozil)-5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-karboxamid (189)**

Az általános előírat alapján benzoil-kloridból **176** (196 μl , 1.68 mmol) és 0.5 g (1.12 mmol) **172** tetrazolból kiindulva 470 mg fehér kristályos anyagot kaptunk [80 %, op.: 169-171 °C, $[\alpha]_D = -4.672$, $c : 0.6$, DMSO]. ^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm): 2.02 (6H, s, 2 x CH_3); 2.04, 2.05 (6H, s, 2 x CH_3); 3.95 (1H, ddd, $J = 9.8$, 4.6 és 2.1 Hz, H-5); 4.16 (1H, dd, $J = 12.6$ és 4.6 Hz, H-6_A); 4.28 (1H, dd, $J = 12.6$ és 2.1 Hz, H-6_B); 5.13, 5.18, 5.36 (3 x 1H, 3 *pszeudo* t, $J = 9.8$, 9.4 és 9.4 Hz, H-2, H-3, H-4); 5.44 (1H, d, $J = 9.4$ Hz, H-1); 7.50 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, aromás); 7.56 (1H, m, aromás); 8.15 (2H, d, $J = 7.3$ Hz, aromás). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ (ppm): 20.68 (4 x CH_3); 61.74 (C-6); 68.09 70.38, 72.90, 73.95 (C-2, C-3, C-4, C-5); 78.12 (C-1); 120.07 - 132.95 (aromás); 153.68, 157.67 (C-2, C-5 oxadiazol); 166.89 (CO); 169.64, 170.11, 170.63, 170.76, (4 x CH_3); Elemanalízis kalkulált: $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_{11}$ (519.15): C: 53.18, H: 4.85, N: 8.09. Mért: C: 53.25, H: 4.96, N: 8.18.

Általános előírat 4-benzil-*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glükopiranozil)-5-aril-1,2,4-triazol-3-karboxamid származékok szintézisére

N-Benzil-arilkarboxamidot (4.7 mmol) oldottunk tionil-kloridban (20 ml) és három órán át forraltuk a reakcióelegyet, majd a tionil-klorid feleslegét rotációs vákuumbepárlón eltávolítottuk, és az így kapott nyerstermékről vízmentes toluolt (2 x 20 ml) pároltunk le. A

maradékot oldottuk vízmentes toluolban (15 ml) és 700 mg tetrazolt (**172**) adtunk hozzá, majd az elegyet 18 órán át 80 °C-on kevertettük, és a reakció lefutását vékonyréteg-kromatográfiásan követtük (eluens: hexán : etil-acetát 1:1). A kiindulási anyag átalakulása után az elegyet rotációs vákuumbepárlón bepároltuk, és a maradékot oszlopkromatográfiásan tisztítottuk (eluens: hexán: etil-acetát 3:1)

4-Benzil-*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glükopiranozil)-5-(naft-2-il)-1,2,4-triazol-3-karboxamid (181)

Az általános előírat alapján 1.2 g (4.7 mmol) *N*-benzil-(naft-2-il)-karboxamidból¹⁰⁵ (**177**) és 700 mg tetrazolból (**172**) (1.58 mmol) kiindulva 506 mg fehér kristályos anyagot kaptunk [50 %, op.: 129-131 °C, $[\alpha]_D = -4.323$, $c : 0.5$, DMSO]. ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 1.98 (3H, s, CH₃); 2.04 (6H, s, 2 x CH₃); 2.08 (3H, s, CH₃); 3.83 (1H, ddd, $J = 9.8$, 4.2, <1 Hz H-5); 4.12 (1H, dd, $J = 12.6$, <1 Hz, H-6_A); 4.29 (1H, dd, $J = 12.6$, <1 Hz, H-6_B); 5.15, 5.19, 5.34, 5.42 (4 x 1H, 4 x *pseudo t*, $J = 9.8$, 9.1, Hz, H-1, H-2, H-3, H-4); 5.71 (1H, d, $J = 15.4$, CH_{2A}); 5.7 (1H, dd, $J = 15.4$ Hz, CH_{2B}); 6.96 - 7.97 (12H, m, aromás); 8.35 (1H, d, $J = 9.1$ Hz, NH). ¹³C NMR (CDCl₃) δ (ppm): 20.5, 20.6, 20.7, 21.1 (4 x CH₃); 49.1 (CH₂); 61.7 (C-6); 68.1, 70.4; 73.1, 73.8 (C-2, C-3, C-4, C-5); 77.9 (C-1); 123.2 – 136.1 (aromás); 146.5, 157.7 (C-3, C-5 triazol); 158.2 (NHCO); 169.6, 170.0, 170.1, 170.7 (CO); Elemanalízis kalkulált: C₃₄H₃₄N₄O₁₀ (658.23): C: 62.00, H: 5.20, N: 8.51. Mért: C: 62.10, H: 5.29, N: 8.60.

4-Benzil-*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glükopiranozil)-5-(fenil)-1,2,4-triazol-3-karboxamid (182)

Az általános előírat alapján 1.2 g (5.6 mmol) *N*-benzilbenzaimdból¹⁰⁶ (**178**) és 839 mg tetrazolból **172** (1.89 mmol) kiindulva 437 mg fehér kristályos anyagot kaptunk [37 %, op.: 74-76 °C, $[\alpha]_D = -5.632$, $c : 0.4$, DMSO]. ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 1.96 (3H, s, CH₃); 2.02 (3H, s, CH₃); 2.03 (3H, s, CH₃); 2.06 (3H, s, CH₃); 3.82 (1H, ddd, $J = 9.8$, 4.2, <1 Hz, H-5); 4.10 (1H, dd, $J = 12.6$, <1 Hz, H-6'); 4.27 (1H, dd, $J = 12.6$, 4.6 Hz, H-6); 5.10, 5.15, 5.30, 5.36 (4 x 1H, 4 x pt, $J = 9.8$, 9.1, 9.1, 9.1 Hz, H-1, H-2, H-3, H-4); 5.63 (1H, d, $J = 15.4$ Hz, CH_{2A}); 5.72 (1H, d, $J = 15.4$ Hz, CH_{2B}); 6.91 - 7.51 (10H, m, aromás); 8.20 (1H, d, $J = 9.1$ Hz, NH); ¹³C NMR (CDCl₃) δ (ppm): 20.5, 20.6, 20.8, 20.9 (4 x CH₃);

48.9 (CH₂); 61.7 (C-6); 68.2, 70.5, 73.2, 73.9 (C-2, C-3, C-4, C-5); 78.1 (C-1); 126.2 – 136.1 (aromás); 146.5, 157.8 (C-3, C-5 triazol); 158.26 (NHCO); 169.5, 170.0, 170.1, 170.7 (4 x CO); Elemanalízis kalkulált: C₃₀H₃₂N₄O₁₀ (608.21): C: 59.21, H: 5.30, N: 9.21. Mért: C: 59.25, H: 5.32, N: 9.27.

Általános előirat *N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-glükopiranozil)-5-aryl-1,2,4-triazol-3-karboxamid származékok előállítására

10% Pd(C)-et (20 mg) vízmentes metanolban, argon atmoszféra alatt 10 – 15 percig kevertettük, majd hozzáadtuk a 0.6 mmol 4-benzil-*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-glükopiranozil)-5-aryl-1,2,4-triazol-3-karboxamid származék vízmentes metanollal (30 ml) készült oldatát. A reakcióelegyet 50 °C-on kevertettük miközben hidrogén gázt buborékolattunk keresztül a reakcióelegyen, és a reakció lejátszódását vékonyréteg-kromatográfiás módszerrel követtük (eluens: kloroform-metanol = 1:1). Az átalakulást követően a katalizátort Celiten kiszűrtük, majd a szűrletet bepároltuk. A terméket további tisztítás nélkül alakítottuk tovább.

***N*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-glükopiranozil)-5-(naft-2-il)-1,2,4-triazol-3-karboxamid (183)**

Az általános előirat alapján 0.4 g (0.6 mmol) **181** származék és 20 mg 10% Pd(C) metanolos oldatából kiindulva 0.296 g fehér kristályos anyagot kaptunk. [85 %, op.: 124-126 °C; [α]_D = -22.118, c : 0.3; DMSO]. ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 2.01 (3H, s, CH₃), 2.03 (3H, s, CH₃); 2.05 (3H, s, CH₃); 2.06 (3H, s, CH₃); 3.92 (1H, ddd, *J* = 9.9, 4.2, <1 Hz, H-5); 4.13 (1H, dd, *J* = 12.3, <1 Hz, H-6_A); 4.32 (1H, dd, *J* = 12.3, <1 Hz, H-6_B); 5.16, 5.18, 5.41, 5.52 (4 x 1H, 4 x t, *J* = 9.5 Hz, H-1, H-2, H-3, H-4); 7.44 7.48 (3H, m, aromás); 8.05 (3H, m, aromás és NH); 13.2 (1H, kiszélesedett s, triazol NH). ¹³C NMR (CDCl₃) δ (ppm): 20.5 (4 x CH₃); 61.7 (C-6); 68.2, 70.7, 73.1, 73.8 (C-2, C-3, C-4, C-5); 78.0 (C-1); 123.4 – 134.1 (aromás); 146.5, 155.7 (C-3, C-5 triazol); 159.3 (NHCO); 170.0, 170.2, 170.5, 170.7 (4 x CO); Kalkulált *m/z*: 568.53, Mért (M+Na)⁺: 591.191, Elemanalízis kalkulált: C₂₇H₂₈N₄O₁₀ (568.18): C: 57.04, H: 4.96, N: 9.85. Mért: C: 57.11, H: 4.99, N: 9.90.

***N*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-glükopiranozil)-5-fenil-1,2,4-triazol-3-karboxamid (184)**

Az általános előírat alapján 0.48 g (0.78 mmol) **182** származék és 26 mg 10% Pd(C) metanolos oldatából kiindulva 0.384 g fehér kristályos anyagot kaptunk. [94 %, op.: 115-118 °C; $[\alpha]_D = -20.027$, $c : 0.4$; DMSO]. ^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm): 2.06 (3H, s, CH_3); 2.10 (3H, s, CH_3); 2.11 (3H, s, CH_3); 2.12 (3H, s, CH_3); 3.93 (1H, ddd, $J = 8.5, 4.0, <1$ Hz, H-5); 4.15 (1H, dd, $J = 12.3, <1$ Hz, H-6_A); 4.34 (1H, dd, $J = 12.3, 4.0$ Hz, H-6_B); 5.18, 5.28, 5.33, 5.59 (4 x 1H, 4 x t, $J = 9.4, 9.4, 9.4, 9.4$ Hz, H-1, H-2, H-3, H-4); 7.53 (3H, m, aromás); 8.12 (3H, m, aromás, NH). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ (ppm): 20.5 (4 x CH_3); 61.7 (C-6); 68.2, 70.5, 73.0, 73.9 (C-2, C-3, C-4, C-5); 78.0 (C-1); 123.4 – 134.1 (aromás); 146.5, 155.7 (C-3, C-5 triazol); 159.4 (NHCO); 170.0, 170.2, 170.5, 170.7 (4 x CO); Elemanalízis kalkulált: $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_{10}$ (518.16): C: 53.28, H: 5.05, N: 10.81. Mért: C: 53.34, H: 5.15, N: 10.88

Általános előírat *N*- β -D-glükopiranozil-heteroaril-karboxamid származékok előállítására

A védett cukor származékot (0.15 mmol) oldottunk vízmentes metanol (5 ml) és kloroform (1 ml) elegyében, majd NaOMe vízmentes metanolban készült oldatát (1 M) csepegtettük hozzá, míg az oldalt pH-ja tartósan lúgos kémhatású maradt. A reakció előrehaladását vékonyréteg kromatográfián követtük (eluens: kloroform : metanol = 3:1). A reakció lejárásdát követően, a reakcióelegyet Amberlyst 15 H^+ formájú kationcserélő gyantával, majd szűrtük és bepároltuk. A nyersterméket oszlopkromatográfián tisztítottuk (eluens: kloroform : metanol = 2:1).

***N*- β -D-Glükopiranozil-2*H*-tetrazol-5-karboxamid (173)**

Az általános előírat alapján 0.3 g **172** (0.67 mmol) származékból kiindulva 62 mg fehér kristályos terméket kaptunk [33%, op.: 253-256 °C, $[\alpha]_D = 14.81$, $c = 0.56$; DMSO]. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 3.33 – 3.11 (5H, m, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6_B); 3.64 (1H, dd, $J = 12.6, <1$ Hz H-6_B); 4.59 (1H, kiszélesedett s, OH); 4.89 (1H, t, $J = 9.2, 8.6$, H-1); 4.98 (1H, brs, OH); 5.06 (1H, kiszélesedett s, OH); 5.35 (1H, kiszélesedett s, OH); 8.59 (1H, d, $J = 8.6$, NH); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 60.86 (C-6); 69.88, 71.85, 77.24, 78.51, 79.54 (C-1, C-2, C-3, C-4, C-5); 157.41 (tetrazol C-5); 161.41 (CONH);

Elemanalízis kalkulált: C₈H₁₃N₅O₆ (275.09): C: 34.91, H: 4.76, N: 25.45. Mért: C: 34.95, H: 4.80, N: 25.55.

***N*-β-D-Glükopiranozil-5-(naft-2-il)-1,3,4-oxadiazol-2-karboxamid (190)**

Az általános előirat alapján 0.41 g **188** (0.72 mmol) védett származékból kiindulva, 0.24 g fehér kristályos terméket kaptunk [85%, op.: 219 - 221 °C; [α]_D= 8.776, c = 0.69, DMSO]. ¹H NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 3.12 (1H, *pseudo* t, *J* = 9.2, Hz, H-2 vagy H-3 vagy H-4); 3.21 – 3.31 (4H, m, H-2 és/vagy H-3 és/vagy H-4, H-5, H-6_A); 3.69 (1H, d, *J* = 11.2 Hz H-6_B), 4.61 (1H, kiszélesedett s, OH); 4.96 (1H, d, *J* = 9.2 Hz, H-1); 5.11 (2H, kiszélesedett s 2 x OH), 7.52 – 7.79 (2H, m, aromás); 8.05 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, aromás); 8.18 (3H, s, aromás); 8.75 (1H, s, aromás); 9.86 (1H, brs, NHCO). ¹³C NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 60.9 (C-6); 70.00, 71. 93, 77.44, 79.18, 80.17 (C-1, C-2, C-3, C-4, C-5); 120.18, 123.23, 127.75, 128.15, 129.20, 129.57, 123.57, 134.74 (aromás); 158.4, 153.6 (C-2, C-3 oxadiazol); 165.47 (NHCO); Elemanalízis kalkulált: C₁₉H₁₉N₃O₇ (401.12): C: 56.86; H: 4.77; N: 10.47. Found: C: 56.94; H: 4.87; N: 10.58.

***N*-β-D-Glükopiranozil-5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-karboxamid (191)**

Az általános előirat alapján 0.09 g **189** (0.2 mmol) védett származékból kiindulva 0.05 g fehér kristályos terméket kaptunk [50%, op.: 229-232 °C, [α]_D= 7.82, c = 0.45; DMSO]. ¹H-NMR (D₂O): δ (ppm): 4.90 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H-1); 7.57 – 7.78 (m; 3H); 8,04 – 8,18 (m, 2H); ¹³C-NMR (D₂O): δ (ppm): 60.59 (C-6); 69.43, 71.34, 76.75, 78.62, 79.61 (C-1; C-2; C-3; C-4; C-5); 122.34, 127.01, 129.41, 132.71 (aromás); 153.40, 157.99 (C-2, C-3 oxadiazol); 165.02 (NHCO); Elemanalízis kalkulált: C₁₅H₁₇N₃O₇ (351.11): C: 51.28; H: 4.88; N: 11.96. Mért: C: 51.38, H: 4.96, N: 12.01.

***N*-β-D-glükopiranozil-5-(naft-2-il)-1,2,4-triazol-3-karboxamid (186)**

Az általános előirat alapján 0.138 g **183** (0.24 mmol) védett származékból kiindulva 39 mg fehér kristályos terméket kaptunk [40%, op.: 171-173 °C, [α]_D= 8.14, c = 0.64; DMSO]. ¹H NMR (DMSO-d₆): δ (ppm): 3.15 – 3.26 (1H, m, H-5); 3.29 - 3.40 (2H, m, H-2, H-3); 3.40 – 3.51 (2H, m, H-4, H-6_A); 4.98 (1H, m, H-1) ; 7.61-7.77 (3H, m, aromás); 8.10 – 8.21 (3H, m, aromás); 8.61 (1H, s, aromás). ¹³C NMR (DMSO-d₆): δ

(ppm): 60.9 (C-6); 69.9, 71.9, 77.31, 78.81, 79.69 (C-1; C-2; C-3; C-4; C-5); 123.21, 123.43, 125.60, 126.67, 126.83, 127.06, 127.72, 128.32, 128.57, 129.45 (aromás); 152.41, 156.8 (C-3, C-5 triazol); 157.2 (NHCO); Elemanalízis kalkulált: C₁₉H₂₀N₄O₆ (400.14): C: 57.00; H: 5.03; N: 13.99. Mért: C: 57.07; H: 5.10; N: 14.03.

***N*-β-D-glükopiranozil-5-fenil-1,2,4-triazol-3-karboxamid (187)**

Az általános előírat alapján 0.3 g **184** (0.57 mmol) védett származékból kiindulva 0.175 g fehér kristályos terméket kaptunk [86%, op.: 169-171 °C, [α]_D = 9.34, c = 0.54; DMSO]. ¹H NMR (DMSO-d₆): δ (ppm): 3.18 – 3.24 (1H, m, H-5); 3.31 - 3.38 (2H, m, H-2, H-3); 3.41 – 3.52 (2H, m, H-4, H-6_A); 5.08 (1H, m, H-1); 7.69 - 7.81 (3H, m, aromás); 8.20 – 8.32 (3H, m, aromás); 8.69 (1H, s, aromás); ¹³C NMR (DMSO-d₆): δ (ppm): 61.9 (C-6); 69.1, 72.5, 76.91, 78.12, 79.69 (C-1; C-2; C-3; C-4; C-5); 122.91, 123.03, 125.60, 126.17, 126.99, 127.23, 127.72, 128.01, 128.97, 129.58 (aromás); 148.55, 157.35 (C-3, C-5 triazol); 162.22 (NHCO); Elemanalízis kalkulált: C₁₅H₁₈N₄O₆ (350.12): C: 51.43; H: 5.18; N: 15.99. Mért: C: 51.49; H: 5.21; N: 15.99.

***N*-β-D-glükopiranozil-1*H*-indol-2-karboxamid (170)**

Az általános előírat alapján 0.39 g **163** (0.8 mmol) védett származékból kiindulva 0.205 mg fehér kristályos terméket kaptunk [79%, op.: 239-241 °C, [α]_D = 24.094, c = 0,75; DMSO]. ¹H NMR (DMSO-d₆, D₂O): 3.99 (1H, pt, *J* = 9.9, 8.9 Hz, H-2 vagy H-3 vagy H-4); 3.22 - 3.36 (3H, m, H-2 és/vagy H-3 és/vagy H-4, H-5); 3.45 (1H, dd, *J* = 11.9 és 5.3 Hz, H-6); 3.65 (1H, *pszeudo t*, *J* = 11.9, <1 Hz, H-6_A); 4.92 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H-1); 7.05, 7.23, 7.47, 7.60 (4H, aromás); ¹H NMR (DMSO-d₆): 4.99 (1H, pt, *J* = 8.9, 8.9 Hz, H-1); 8.9 (1H, dd, *J* = 8.6 Hz, NHCO); 11.6 (1H, s, indol-NH); ¹³C NMR (DMSO-d₆): 61.10 (C-6); 70.10, 72.35, 77.79, 78.83, (C-2, C-3, C-4, C-5); 79.90 (C-1); 101.01, 103.48, 112.41, 119.79, 121.73, 123.57, 131.39, 136.66 (aromás); 161.39 (CONH); Elemanalízis kalkulált: C₁₅H₁₈N₂O₆ (322.12) C: 55.90; H: 5.63; N: 8.69. Mért: C: 56.08; H: 5.68; N: 8.76.

7. Összefoglalás

Napjaink fejlett társadalmában egyre gyakrabban előforduló betegség a *diabetest mellitus* és annak számos hosszútávú szövődménye. A cukorbetegség gyógyítása jelenleg nem lehetséges, csupán tüneti kezelésre van lehetőség, melynek során a normál vércukorszintet diétával, testmozgással, hipoglikémiás szerekkel illetve külső inzulin bevitellel próbálják biztosítani. Napjainkban a 2. típusú *diabetes* esetében, a máj glükóz termelésének csökkentését célzó terápiás lehetőségek közül az egyik legígéretesebb a glikogén lebontását katalizáló glikogén foszforiláz enzim gátlásán alapul. Kutatócsoportunkban több éve folynak kutatások biológiailag aktív glikogén foszforiláz inhibitorok szintézisére.

Doktori munkám során célunk volt a természetes eredetű FR259800 nevű optikailag aktív dikarbonsav származék analagonjainak szintézise és szerkezet-hatás vizsgálata. Egy olyan általános szintézis módszer kidolgozására volt szükségünk, mely alkalmas az FR258900 molekula alapvázának és oldalláncának módosítására is. A könnyen hozzáférhető D-, L-, *mezo*-borkósavakból és L-almasavból kiindulva a fahéjsav, *p*-kumársav és ferulasav származékokkal kívántuk az *O*-acilezett származékot előállítani. Az acilezési reakció elvégzése előtt a karboxil csoportokat és a fenolos hidroxil csoportokat ideiglenesen védeni kellett. A D-, L-, *mezo*-borkósavakat (**50-52**) és L-almasavat (**53**) a benzofenon-hidrazonból (**80**) *in situ* generált difenildiazometánnal (**81**) reagáltatva jó hozammal (79 - 86 %) kaptuk a megfelelő észter származékokat. Az így kapott védett dikarbonsav származékok **71 - 73, 82** szabad hidroxil csoportjait különböző fahéjsav származékokkal (**56, 83, 84**) történő acilezéssel kívántuk átalakítani. Ehhez az **57 - 58** *p*-kumársav származékok fenolos hidroxil csoportjait metoxikarbonil csoporttal védtük, jó hozammal, az így nyert karbonsavakat tionil-kloriddal aktiváltuk és közvetlenül használtuk fel az acilezési reakciókhoz. A kívánt **88 - 98** acilezett termékeket közepes (43 - 54 %) és jó hozammal (63 - 79 %) izoláltuk. A sikeres acilezési reakciókat követően először a difenilmetil védőcsoportok eltávolítását valósítottuk meg trifluorecetsav – vízmentes anizol reagenseket alkalmazva (7 ekv. vízmentes anizol és 25 ekv. TFA / vízmentes CH₂Cl₂). Mind a borkósav, mind az almasav származékok esetében kiváló hozammal (79 –

92 %) izoláltuk a kívánt termékeket. Következő lépésben a metoxikarbonil védőcsoportokat vizes NH_3 oldat alkalmazásával MeOH-ban hasítottuk és közepes - kiváló hozammal (62 – 92%) izoláltuk a védetlen karbonsav származékokat. (**107 – 112, 116, 117**).

Doktori munkám másik részében új glükóz analóg glikogén foszforiláz inhibitorokat is szintetizáltunk. Munkám során az *N*-acil-*N'*-(β -D-glükoporanozil)-karbamid „harmadik” NHCO egységének nem klasszikus heterociklusos bioizoszterekkel történő helyettesítését valósítottuk meg. Az izosztéria érvényességének vizsgálata céljából 1,2,4-triazol és 1,3,4-oxadiazol tartalmazó heterociklusos glükóz származékok előállítását valósítottuk meg. Kiindulási anyagként a kutatócsoportunk által előállított **171** *N*-cianokarbonil származékot használva Me_3SiN_3 és Bu_2SnO reagensekkel, jó hozammal kaptuk a **172** tetrazolt. A **181, 182** triazolokat a **172** tetrazolból kiindulva 1,3-dipoláris cikloaddiciós reakcióval valósítottuk meg. Az ehhez szükséges imidoil-klorid (**179, 180**) reagenseket a megfelelő amid származékokból (**177, 178**) kiindulva tionil-kloriddal állítottuk elő. Az imidoil-klorid származékokat (**179, 180**) és a **172** tetrazol reakciójával közepes hozammal nyertük a megfelelő *N*-benzilezett 1,2,4-triazolokat (**181, 182**). A védőcsoportok eltávolítása során fényt derült arra, hogy első lépésben katalitikus hidrogénezéssel a benzil védőcsoportot kell eltávolítani (**183, 184**), majd e vegyületekből Zemplén körülményeket alkalmazva lehet előállítani a védetlen **186, 187** 1,2,4-triazol származékokat.

A **172** tetrazol származékból kiindulva, a megfelelő savkloriddal reagáltatva jó hozammal kaptuk a kívánt 1,3,4-oxadiazolokat (**188, 189**). Az acetyl védőcsoportok eltávolítását Zemplén reakciókörülményeket alkalmazva valósítottuk meg.

Vegyületeink glikogén foszforiláz inhibitor aktivitását a Debreceni Egyetem Orvosi Vegytani Intézetében vizsgálták. A vegyületek RMGPb enzimmal végzett enzimkinetikai vizsgálatai alapján elmondható, hogy az előállított FR258900 analogonok közül a legjobb gátlás a *mezo* izomerek estében volt megfigyelhető. Egyértelműen kijelenthető, hogy az aromás gyűrűn *para* helyzetben lévő hidroxil csoportok jelenléte szükséges volt a jó gátlás eléréséhez, e hatást a *meta* helyzetben lévő metoxi csoportok tovább javították és a **112** származék a természetes vegyületével összemérhető aktivitást mutatott.

A (β -D-glükopiranozil)-heteroaril-karboxamid származékok gátlási állandóit meghatározva elmondható, hogy mind az 1,2,4-triazol (**186**, **187**), mind pedig 1,3,4-oxadiazol (**190**, **191**) egységet tartalmazó származékok inhibíciós állandói elmaradnak a *lead* vegyület (**26**) inhibíciós állandójától. Szintén meg kell jegyeznünk, hogy míg az *N*-acil-*N'*-(β -D-glükopiranozil)-karbamid típusú származékok esetében a 2-naftoil szubsztituens rendelkezett a legjobb gátlási állandóval ($K_i = 0,35 \mu\text{M}$) addig az 1,2,4-triazol sorban a fenil szubsztituált származék (**187**) ($K_i = 1,0 \mu\text{M}$) volt a legaktívabb. Az 1,3,4-oxadiazol sorozat esetében szintén a 2-naftil származék (**190**) bizonyult a legaktívabbnak ($K_i = 30 \mu\text{M}$), jóllehet inhibíciós állandója két nagyságrenddel nagyobb volt a **26** K_i értékénél.

8. Summary

Nowadays more than 360 million people suffer from Diabetes mellitus worldwide, and more than 90% of the diagnosed cases belong to the type 2 or non-insulin dependent (T2DM or NIDDM) form of the disease characterized by defects in pancreatic insulin secretion, peripheral insulin resistance, and elevated hepatic glucose production. T2DM is a major concern to public health with several long term complications such as cardiovascular disease, neuropathy, retinopathy and nephropathy.

Although several drugs are in clinical use for symptomatic treatment of T2DM, these therapies are inadequate for 30-40 % of the patients. In the treatment of T2DM the new target is glycogen phosphorylase (GP), the main regulatory enzyme in the liver responsible for the control of blood glucose levels. Biochemical and pharmacological aspects of T2DM have been amply reviewed and for a detailed rationalization of the possible use of glycogen phosphorylases inhibitors (GPIs) as antidiabetics. The aim of my PhD thesis was to synthesise new inhibitors of glycogen phosphorylases and study the structure-activity relationships of these new compounds.

The FR258900 (**49**) was isolated from fungi No. 138354. The compound was shown to inhibit glycogen phosphorylases and to bind to the allosteric site of GP. Compound **49** stimulated glycogen synthesis in primary rat hepatocytes, and investigations on glucagon-induced hyperglycemia in C57BL/6 mice suggested that **49** could suppress hepatic glucose output *in vivo*.

We envisaged the preparation of structural analogues of **49**: the core unit was planned to be replaced by easily available D-, L- and *meso* tartaric acid (**50** - **52**), L-malic acid (**53**), 3-hydroxypentandioic acid, and L-glutamic acid. Furthermore, the substitution pattern of the aromatic rings was also modified.

Our synthesis was based on the known preparation of chicoric acid (2,3-dicaffeoyl-butanedioic acid). The crucial points in the syntheses of O-acyl derivatives of hydroxy carboxylic acids were the orthogonal protections of phenolic OH and COOH groups. The COOH groups of D-, L- and *meso*-tartaric acids (**50** - **52**) and L-malic acid (**53**) were transformed into diphenylmethyl (DPM) esters (**71** - **73**, **82**) by diphenyldiazomethane (DPDAM) generated *in situ* from benzophenone-hydrazone (**80**) by oxidation with

activated MnO₂. The phenolic OH groups were protected as methyl-carbonates (**83**, **84**), and used without further purification.

Acylation of DPM protected hydroxy carboxylic acids (**71** – **73**, **82**) were carried out with chlorides of cinnamic- (**85**), *p*-coumaric- (**86**) and ferulic acids (**87**) in dry toluene using dry pyridine as catalyst.

Subsequent deprotections following the suggested protocol (removal of methoxycarbonyl groups with Na₂CO₃/aq THF and cleavage of DPM esters with 70% aq AcOH) caused in our hands total decomposition of the molecules, irrespective of the order of the deprotection steps. Therefore, a new protocol for the cleavage of protecting groups was developed. The DPM esters could be cleaved by using dry anisole–TFA reagent at room temperature to give methoxycarbonyl esters **99** - **106**, **113** – **115** whose hydrolysis was achieved by using an aq. solution of NH₃ to yield the test compounds **107** - **112**, **116**, **117**.

The second aim of my PhD research was the preparation of new glucose analogue inhibitors of GP by the bioisosteric replacements of the “third” NHCO moiety of *N*-acyl-*N'*-β-D-glucopyranosyl urea type GP inhibitors with 1,3,4-oxadiazole and 1,2,4-triazole heterocycles and study their effects on inhibitor activity.

The *N*-cyanocarbonyl (**171**) derivative was converted to tetrazole (**172**) with Me₃SiN₃–Bu₂SnO which was used as the starting material for the preparation of *N*-(β-D-glucopyranosyl)-5-aryl-1,3,4-oxadiazole-2-carboxamides and *N*-(β-D-glucopyranosyl)-5-aryl-1,2,4-triazole-3-carboxamides.

The **172** tetrazole was reacted with *N*-benzyl-carboximidoyl chlorides (**1179**, **180**) obtained from the corresponding *N*-benzyl-carboxamides **177**, **178** by SOCl₂ proved an efficient way to get *N*-β-D-glucopyranosyl-5-aryl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (**181**, **182**). Deprotection of these derivatives was readily carried out starting with the catalytic hydrogenation to cleave benzyl groups (**183**, **184**), followed by the Zemplén conditions to remove the *O*-acyl groups to give the target 1,2,4-triazoles (**186**, **187**). If the *O*-acyl groups were removed first, the catalytic hydrogenation didn't give the expected product.

The 5-aryl-1,3,4-oxadiazole-2-carboxamides (**188**, **189**) were obtained from tertazole **172** by the reaction with aroyl chlorides in dry toluene at elevated temperature in moderate to good yields (**188**: 74%; **189**: 80%). *O*-Deacetylations were performed by the

Zemplén protocol to give the unprotected 1,3,4-oxadiazole derivatives **190**, **191** in good yields.

The synthesized derivatives were evaluated as inhibitors of rabbit muscle glycogen phosphorylase b (RMGPb). For comparison FR258900 (**49**) was also tested under our conditions. Compound **49** proved a competitive inhibitor against AMP and the obtained K_i of 0.2 μM showed a good agreement with the literature value. When tested against G1P, FR258900 compound appeared as a non-competitive inhibitor with a K_i of 5.47 μM . Similar conclusions could be drawn from the kinetic studies of D-, L- and *meso* tartaric acid derivatives **99**, **100**, **107** - **112**, as well, thereby indicating that in general the tartaric acid derivatives bound to the same site as FR258900 (**49**).

As non-competitive inhibitors against G1P, the cinnamoyl derivatives **99**, **100**, lacking the 4-OH substituents characteristic of the natural product, proved practically inefficient. In the p-coumaroyl (**107** – **109**) and feruloyl (**110** – **112**) series the meso-configured compounds **109** and **112** proved most efficient. The latter demonstrated that introduction of an additional substituent in the aromatic rings (3-CH₃O) was very advantageous and **112** proved equipotent with the natural product **49**. As competitive inhibitors against AMP, beside the meso-configured **109** and **112**, the L-configured **110** proved most efficient.

The 1,3,4-oxadiazolecarboxamide and 1,3,4-triazolecarboxamide derivatives were less active than the “lead” compounds. In the 1,3,4-oxadiazole series the 2-naphtoyl derivative was the best inhibitor ($K_i = 30 \mu\text{M}$). The 1,2,4-triazole series the phenyl derivative was the best ($K_i = 1.0 \mu\text{M}$).

N-glucopyranosyl-indole-2-carboxamide inhibitor activity $K_i = 5.76 \mu\text{M}$ was the one of the best out of these new.

11. Irodalom

1. Wild, S.; Roglic, G.; Green, A.; Sicree, R.; King, H. Global prevalence of diabetes - Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* **2004**, 27, 1047-1053.
2. Whiting, D. R.; Guariguata, L.; Weil, C.; Shaw, J. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2011**, 94, 311-321.
3. Diamond, J. The double puzzle of diabetes. *Nature* **2003**, 423, 599-602.
4. Bollen, M.; Keppens, S.; Stalmans, W. Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochem. J.* **1998**, 336, 19-31.
5. Hengesh, E. J. Drugs affecting sugar metabolism. In *Principles of Medicinal Chemistry*, Foye, W. O.; Lemke, T. L.; Williams, D. A., Eds. Williams & Wilkins: Baltimore, 1995; pp 581-600.
6. Moller, D. E. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature* **2001**, 414, 821-827.
7. Zimmet, P.; Alberti, K. G. M. M.; Shaw, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* **2001**, 414, 782-861.
8. Wagman, A. S.; Nuss, J. M. Current Therapies and Emerging Targets for the Treatment of Diabetes. *Curr. Pharma. Design* **2001**, 7, 417-450.
9. Israili, Z. H. Advances in the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Am. J. Therapeut.* **2011**, 18, 117-152.
10. Cheng, A. Y. Y.; Fantus, I. G. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Can. Med. Assoc. J.* **2005**, 172, 213-226.
11. Acton, J. J.; Black, R. M.; Jones, A. B.; Moller, D. E.; Colwell, L.; Doebber, T. W.; MacNaul, K. L.; Berger, J.; Wood, H. B. Benzoyl 2-methyl indoles as selective PPAR gamma modulators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 357-362.
12. Kim, B. Y.; Ahn, J. B.; Lee, H. W.; Kang, S. K.; Lee, J. H.; Shin, J. S.; Ahn, S. K.; Hong, C. I.; Yoon, S. S. Synthesis and biological activity of novel substituted pyridines and purines containing 2,4-thiazolidinedione. *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, 39, 433-447.

13. Cantello, B. C. C.; Cawthorne, M. A.; Cottam, G. P.; Duff, P. T.; Haigh, D.; Kindley, R. M.; Lister, C. A.; Smith, S. A.; Thurlby, P. L. Omega-(Heterocyclylamino)Alkoxy Benzyl-2,4-Thiazolidinediones As Potent Antihyperglycemic Agents. *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 3977-3985.
14. Norris, A. W.; Chen, L. H.; Fisher, S. J.; Szanto, I.; Ristow, M.; Jozsi, A. C.; Hirshman, M. F.; Rosen, E. D.; Goodyear, L. J.; Gonzalez, F. J.; Spiegelman, B. M.; Kahn, C. R. Muscle-specific PPAR gamma-deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinediones. *J. Clin. Invest.* **2003**, 112, 608-618.
15. Berger, J.; Leibowitz, M. D.; Doebber, T. W.; Elbrecht, A.; Zhang, B.; Zhou, G. C.; Biswas, C.; Cullinan, C. A.; Hayes, N. S.; Li, Y.; Tanen, M.; Ventre, J.; Wu, M. S.; Berger, G. D.; Mosley, R.; Marquis, R.; Santini, C.; Sahoo, S. P.; Tolman, R. L.; Smith, R. G.; Moller, D. E. Novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma and PPAR delta ligands produce distinct biological effects. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 6718-6725.
16. Matsusue, K.; Haluzik, M.; Lambert, G.; Yim, S. H.; Gavrilova, O.; Ward, J. M.; Brewer, B.; Reitman, M. L.; Gonzalez, F. J. Liver-specific disruption of PPAR gamma in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. *J. Clin. Invest.* **2003**, 111, 737-747.
17. Rangwala, S. M.; Lazar, M. A. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes and metabolism. *Trends Pharmacol. Sci.* **2004**, 25, 331-336.
18. Haskins, J. R.; Rowse, P.; Rahbari, R.; de la Iglesia, F. A. Thiazolidinedione toxicity to isolated hepatocytes revealed by coherent multiprobe fluorescence microscopy and correlated with multiparameter flow cytometry of peripheral leukocytes. *Arch. Toxicol.* **2001**, 75, 425-438.
19. Ledford, H. Diabetes drugs offered fresh start. *Nature* **2010**, 466, 420-421.
20. Treadway, J. L.; Mendys, P.; Hoover, D. J. Glycogen phosphorylase inhibitors for treatment of type 2 diabetes mellitus. *Expert Opin. Invest. Drugs* **2001**, 10, 439-454.
21. Oikonomakos, N. G. Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2002**, 3, 561-586.
22. McCormack, J. G.; Westergaard, N.; Kristiansen, M.; Brand, C. L.; Lau, J. Pharmacological Approaches to Inhibit Endogenous Glucose Production as a Means of Anti-diabetic Therapy. *Curr. Pharma. Design* **2001**, 7, 1451-1474.
23. Newgard, C. B.; Hwang, P. K.; Fletterick, R. J. The family of glycogen phosphorylases: structure and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1989**, 24, 69-99.

24. Walsh, D. A.; Newsholme, P.; Cawley, K. C.; van Patten, S. M.; Angelos, K. L. Motifs of protein phosphorylation and mechanisms of reversible covalent regulation. *Phys. Rev.* **1991**, *71*, 285-304.
25. Chrysina, E. D.; Kosmopolou, M. N.; Tiraidis, C.; Kardarakis, R.; Bischler, N.; Leonidas, D. D.; Hadady, Z.; Somsák, L.; Docsa, T.; Gergely, P.; Oikonomakos, N. G. Kinetic and crystallographic studies on 2-(β -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.* **2005**, *14*, 873-888.
26. Barf, T. Intervention of hepatic glucose production. Small molecule regulators of potential targets for type 2 diabetes therapy. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2004**, *4*, 897-908.
27. Somsák, L.; Nagy, V.; Hadady, Z.; Docsa, T.; Gergely, P. Glucose analog inhibitors of glycogen phosphorylases as potential antidiabetic agents: recent developments. *Curr. Pharma. Design* **2003**, *9*, 1177-1189.
28. Henke, B. R.; Sparks, S. M. Glycogen phosphorylase inhibitors. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2006**, *6*, 845-857.
29. Oikonomakos, N. G.; Somsák, L. Recent advances in glycogen phosphorylase inhibitor design. *Curr. Opin. Invest. Drugs* **2008**, *9*, 379-395.
30. Somsák, L.; Czifrák, K.; Tóth, M.; Bokor, É.; Chrysina, E. D.; Alexacou, K. M.; Hayes, J. M.; Tiraidis, C.; Lazoura, E.; Leonidas, D. D.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G. New inhibitors of glycogen phosphorylase as potential antidiabetic agents. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 2933-2983.
31. 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. Glucose Analogue Inhibitors of Glycogen Phosphorylase: The Design of Potential Drugs for Diabetes. *Biochem.* **1991**, *30*, 10101-10116.
32. Sprang, S. R.; Goldsmith, E. J.; Fletterick, R. J.; Withers, S. G.; Madsen, N. B. Catalytic site of Glycogen Phosphorylase: Structure of the T State and Specificity for α -D-Glucose. *Biochem.* **1982**, *21*, 5364-5371.
33. Street, I. P.; Armstrong, C. R.; Withers, S. G. Hydrogen Bonding and Specificity. Fluorodeoxy Sugars as Probes of Hydrogen Bonding in the Glycogen Phosphorylase-Glucose Complex. *Biochem.* **1986**, *25*, 6021-6027.
34. 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. Design of Inhibitors of Glycogen Phosphorylase: A Study of α - and β -C-Glucosides and 1-Thio- β -D-glucose Compounds. *Biochem.* **1994**, *33*, 5745-5758.

35. 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. Glucose Analogue Inhibitors of Glycogen Phosphorylase: from Crystallographic Analysis to Drug Prediction using GRID Force-Field and GOLPE Variable Selection. *Acta Cryst.* **1995**, D51, 458-472.
36. Somsák, L.; Kovács, L.; Tóth, M.; Ósz, 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-Glucose and D-Xylopyranosylidene-spiro-(thio)hydantoin and N-(D-Glucopyranosyl) Amides. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 2843-2848.
37. Chrysina, E. D.; Bokor, É.; Alexacou, K.-M.; Charavgi, M.-D.; Oikonomakos, G. N.; Zographos, S. E.; Leonidas, D. D.; Oikonomakos, N. G.; Somsák, L. Amide-1,2,3-triazole bioisosterism: the glycogen phosphorylase case. *Tetrahedron: Asymm.* **2009**, 20, 733-740.
38. Györgydeák, Z.; Hadady, Z.; Felföldi, N.; Krakomperger, A.; Nagy, V.; Tóth, M.; Brunyánszky, A.; Docsa, T.; Gergely, P.; Somsák, L. Synthesis of N-(β -D-glucopyranosyl)- and N-(2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl) amides as inhibitors of glycogen phosphorylase. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 4861-4870.
39. Felföldi, N. PhD Thesis. University of Debrecen, Debrecen, 2009.
40. Nagy, V. PhD Thesis. University of Debrecen, Debrecen, 2003.
41. 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. Potent Inhibition of Glycogen Phosphorylase by a Spirohydantoin of Glucopyranose: First Pyranose Analogues of Hydantocidin. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 2145-2148.
42. Ósz, 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.* **1999**, 9, 1385-1390.
43. Benlifa, M.; Hayes, J. M.; Vidal, S.; Gueyrard, D.; Goekjian, P. G.; Praly, J.-P.; Kizilis, G.; Tiraidis, C.; Alexacou, K.-M.; Chrysina, E. D.; Zographos, S. E.; Leonidas, D. D.; Archontis, G.; Oikonomakos, N. G. Glucose-based Spiro-isoxazolines: A New Family of Potent Glycogen Phosphorylase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 7368-7380.
44. Somsák, L.; Nagy, V.; Vidal, S.; Czifrák, K.; Berzsényi, E.; Praly, J.-P. Novel design principle validated: glucopyranosylidene-spiro-oxathiazole as new nanomolar inhibitor of glycogen phosphorylase, potential antidiabetic agent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 5680-5683.

45. Hadady, Z. Szintetikus vizsgálatok glikogén foszforiláz inhibitorok szerkezet-hatás összefüggéseinek felderítésére. *PhD értekezés, Debreceni Egyetem*, **2007**.
46. Hadady, Z.; Tóth, M.; Somsák, L. C-(β -D-glucopyranosyl) heterocycles as potential glycogen phosphorylase inhibitors. *Arkivoc* **2004**, (vii), 140-149.
47. Benlifa, M.; Vidal, S.; Fenet, B.; Msaddek, M.; Goekjian, P. G.; Praly, J.-P.; Brunyánszki, A.; Docsa, T.; Gergely, P. In the Search of Glycogen Phosphorylase Inhibitors: 5-Substituted 3-C-Glucopyranosyl-1,2,4-Oxadiazoles from β -D-Glucopyranosyl Cyanides upon Cyclization of O-Acyl-amidoxime Intermediates. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 4242-4256.
48. Tóth, M.; Kun, S.; Bokor, É.; Benlifa, M.; Tallec, G.; Vidal, S.; Docsa, T.; Gergely, P.; Somsák, L.; Praly, J.-P. Synthesis and structure-activity relationships of C-glycosylated oxadiazoles as inhibitors of glycogen phosphorylase. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 4773-4785.
49. Klabunde, T.; Wendt, K. U.; Kadereit, D.; Brachvogel, V.; Burger, H. J.; Herling, A. W.; Oikonomakos, N. G.; Kosmopoulou, M. N.; Schmoll, D.; Sarubbi, E.; von Roedern, E.; Schonafinger, K.; Defossa, E. Acyl ureas as human liver glycogen phosphorylase inhibitors for the treatment of type 2 diabetes. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 6178-6193.
50. Oikonomakos, N. G.; Kosmopoulou, M. N.; Chrysina, E. D.; Leonidas, D. D.; Kostas, I. D.; Wendt, K. U.; Klabunde, T.; Defossa, E. Crystallographic studies on acyl ureas, a new class of glycogen phosphorylase inhibitors, as potential antidiabetic drugs. *Protein Sci.* **2005**, 14, 1760-1771.
51. Lu, Z.; Bohn, J.; Bergeron, R.; Deng, Q.; Ellsworth, K. P.; Geissler, W. M.; Harris, G.; McCann, P. E.; McKeever, B.; Myers, R. W. A new class of glycogen phosphorylase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 4125-4128.
52. Loughlin, W. A. Recent Advances in the Allosteric Inhibition of Glycogen Phosphorylase *Mini-Rev. Med. Chem.* **2010**, 10, 1139-1155.
53. Bergans, N.; Stalmans, W.; Goldmann, S.; Vanstapel, F. 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, 1419-1426.
54. 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. The structure of glycogen phosphorylase b with an alkyl-dihydropyridine-dicarboxylic acid compound, a novel and potent inhibitor. *Structure* **1997**, 5, 1413-1425.
55. Oikonomakos, N. G.; Tsitsanou, K. E.; Zographos, S. E.; Skamnaki, V. T.; Goldmann, S.; Bischoff, H. Allosteric inhibition of glycogen phosphorylase a by the

potential antidiabetic drug 3-isopropyl 4-(2-chlorophenyl)-1,4-dihydro-1-ethyl-2-methylpyridine-3,5,6-tricarboxylate. *Protein Sci.* **1999**, 8, 1930-1945.

56. Furukawa, S.; Tsurumi, Y.; Murakami, K.; Nakanishi, T.; Ohsumi, K.; Hashimoto, M.; Nishikawa, M.; Takase, S.; Nakayama, O.; Hino, M. FR258900, a novel glycogen phosphorylase inhibitor isolated from Fungus No 138354 Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiot.* **2005**, 58, 497-502.

57. Furukawa, S.; Murakami, K.; Nishikawa, M.; Nakayama, O.; Hino, M. FR258900, a novel glycogen phosphorylase inhibitor isolated from Fungus No. 138354 - II. Anti-hyperglycemic effects in diabetic animal models. *J. Antibiot.* **2005**, 58, 503-506.

58. Tiraidis, C.; Alexacou, K. M.; Zographos, S. E.; Leonidas, D. D.; Gimisis, T.; Oikonomakos, N. G. FR258900, a potential anti-hyperglycemic drug, binds at the allosteric site of glycogen phosphorylase. *Protein Sci.* **2007**, 16, 1773-1782.

59. Patani, G. A.; LaVoie, E. J. Bioisosterism: A rational approach in drug design. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 3147-3176.

60. Lima, L. M. A.; Barreiro, E. J. Bioisosterism: A useful strategy for molecular modification and drug design. *Curr. Med. Chem.* **2005**, 12, 23-49.

61. 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.* **2010**, 18, 1171-1180.

62. Kónya, B.; Docsa, T.; Gergely, P.; Somsák, L. Synthesis of heterocyclic N-(β-D-glucopyranosyl)carboxamides for inhibition of glycogen phosphorylase. *Carbohydr. Res.* **2012**, 351, 56-63.

63. Scarpati, M. L.; Oriente, G. Chicoric acid (dicafeoyltartaric acid): Its isolation from chicory (*Chicorium intybus*) and synthesis. *Tetrahedron* **1958**, 4, 43-48.

64. Robinson, W. E.; Cordeiro, M.; AbdelMalek, S.; Jia, Q.; Chow, S. A.; Reinecke, M. G.; Mitchell, W. M. Dicafeoylquinic acid inhibitors of human immunodeficiency virus integrase: Inhibition of the core catalytic domain of human immunodeficiency virus integrase. *Mol. Pharmacol.* **1996**, 50, 846-855.

65. Zhao, H.; Burke, T. R. Facile syntheses of (2R,3R)-(-)- and (2S,3S)-(+)-chicoric acids. *Synth. Commun.* **1998**, 28, 737-740.

66. King, P. J.; Ma, G. X.; Miao, W. F.; Jia, Q.; McDougall, B. R.; Reinecke, M. G.; Cornell, C.; Kuan, J.; Kim, T. R.; Robinson, W. E. Structure-activity relationships: Analogues of the dicafeoylquinic and dicafeoyltartaric acids as potent inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase and replication. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 497-509.

67. Lamidey, A. M.; Fernon, L.; Pouysegu, L.; Delattre, C.; Quideau, S.; Pardon, P. A convenient synthesis of the Echinacea-derived immunostimulator and HIV-1 integrase inhibitor (-)-(2R,3R)-chicoric acid. *Helv. Chim. Acta* **2002**, 85, 2328-2334.
68. Varga, G.; Docsa, T.; Gergely, P.; Juhasz, L.; Somsak, L. Synthesis of tartaric acid analogues of FR258900 and their evaluation as glycogen phosphorylase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23, 1789-1792.
69. Ko, K. Y.; Kim, J. Y. Generation of diphenyldiazomethane by oxidation of benzophenone hydrazone with Magtrieve(TM). *Bull. Korean Chem. Soc.* **1999**, 20, 771-772.
70. Thoraval, J. Y.; Nagai, W.; Yeung Lam Ko, Y. Y. C.; Carrié, R. Cycloadditions of disubstituted diazo compounds to P-chloro (bistrimethylsilyl) methylene phosphine. *Tetrahedron* **1990**, 46, 3859-3868.
71. Chen, P. C.; Wharton, R. E.; Patel, P. A.; Oyelere, A. K. Direct diazo-transfer reaction on beta-lactam: Synthesis and preliminary biological activities of 6-triazolypenicillanic acids. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, 7288-7300.
72. Yu, Y. L.; Maeda, T.; Mamiya, J.; Ikeda, T. Photomechanical effects of ferroelectric liquid-crystalline elastomers containing azobenzene chromophores. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2007**, 46, 881-883.
73. Taylor, C. M. Glycopeptides and Glycoproteins: Focus on the Glycosidic Linkage. *Tetrahedron* **1998**, 54, 11317-11362.
74. Walkernasir, E.; Jeanloz, R. W. Synthesis of Oligosaccharide-L-Asparagine Compounds .7. Derivatives of 2-Acetamido-3-O-(2-Acetamido-2-Deoxy-Beta-D-Glucopyranosyl)-N-(1-Benzoyloxy-L-Aspartoyl)-2-Deoxy-Beta-D- Glucopyranosylamine. *Liebigs Ann. Chem.* **1976**, 1262-1275.
75. Plusquellec, D.; Brennerhenaff, C.; Leonruaud, P.; Duquenoy, S.; Lefeuvre, M.; Wroblewski, H. An Efficient Acylation of Free Glycosylamines for the Synthesis of N-Glycosyl Amino-Acids and N-Glycosidic Surfactants for Membrane Studies. *J. Carbohydr. Chem.* **1994**, 13, 737-751.
76. Messmer, A.; Pintér, I.; Szegő, F. Acetylzucker-phosphinimine und -carbodiimide. *Angew. Chem.* **1964**, 76, 227-228.
77. Kovács, J.; Pintér, I.; Messmer, A.; Tóth, G. Unprotected Sugar Phosphinimines - a Facile Route to Cyclic Carbamates of Amino-Sugars. *Carbohydr. Res.* **1985**, 141, 57-65.
78. Staudinger, H.; Meyer, J. New organic compounds of phosphorus. III. Phosphinemethylene derivatives and phosphinimines. *Helv. Chim. Acta* **1919**, 2, 635-46.

79. Shalev, D. E.; Chiacchiera, S. M.; Radkowsky, A. E.; Kosower, E. M. Sequence of reactant combination alters the course of the Staudinger reaction of azides with acyl derivatives. *Bimanes* .30. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 1689-1701.
80. Mizuno, M.; Muramoto, I.; Kobayashi, K.; Yaginuma, H.; Inazu, T. A simple method for the synthesis of N-beta-glycosylated- asparagine and -glutamine derivatives. *Synthesis* **1999**, 162-165.
81. Boullanger, P.; Maunier, V.; Lafont, D. Syntheses of amphiphilic glycosylamides from glycosyl azides without transient reduction to glycosylamines. *Carbohydr. Res.* **2000**, 324, 97-106.
82. Bognár, R.; Somogyi, L. Acylierungsreaktionen und Umwandlungen einiger Glucosyl-thioharnstoff- und Glucosylisothiocyanat-Derivative. *Chem. Ber.* **1966**, 99, 1032-1039.
83. Parrot-Lopez, H.; Galons, H.; Coleman, A. W.; Mahuteau, J.; Miocque, M. Vectorized Transport of Drugs - Synthesis of a New Glycosyl Derivative of Beta-Cyclodextrin. *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 209-212.
84. Kun, S.; Nagy, G. Z.; Tóth, M.; Czece, L.; Nguyen van Nhien, A.; Docsa, T.; Gergely, P.; Charavgi, M.-D.; 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.* **2011**, 346, 1427-1438.
85. Hill, J. 1,3,4-Oxadiazoles. In *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, 1984; Vol. 6, pp 427-446.
86. Potts, K. T. The Chemistry of 1,2,4-Triazoles. *Chem. Rev.* **1961**, 61, 87-127.
87. Potts, K. T. 1,2,4-Triazoles. Part I. A Synthesis of 3,5-Disubstituted 1,2,4-Triazoles. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1954**, 3461-3464.
88. Polya, J. B. 1,2,4-Triazoles. In *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, 1984; Vol. 5, pp 733-790.
89. Vanek, T.; Velkova, V.; Gut, J. Preparation of 3-Substituted and 3,5-Substituted 1,2,4-Triazoles. *Coll. Czech. Chem. Commun.* **1984**, 49, 2492-2495.
90. Rosauer, K. G.; Ogawa, A. K.; Willoughby, C. A.; Ellsworth, K. P.; Geissler, W. M.; Myers, R. W.; Deng, Q. L.; Chapman, K. T.; Harris, G.; Moller, D. E. Novel 3,4-dihydroquinolin-2(1H)-one inhibitors of human glycogen phosphorylase *a*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 4385-4388.
91. Rauter, A. P.; Padilha, M.; Figueiredo, J. A.; Ismael, M. I.; Justino, J.; Ferreira, H.; Ferreira, M. J.; Rajendran, C.; Wilkins, R.; Vaz, P. D.; Calhorda, M. J. Bioactive pseudo-

C-nucleosides containing thiazole, thiazolidinone, and tetrazole rings. *J. Carbohydr. Chem.* **2005**, 24, 275-296.

92. Francis, J. E.; Gorczyca, L. A.; Mazzenga, G. C.; Meckler, H. A Convenient Synthesis of 3,5-Disubstituted-1,2,4-Triazoles. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 5133-5136.

93. Spassov, A.; Demirov, G. Umsetzung von Amidrazonen mit Chloridestern, Anhydriden, Mono- und Diestern der Dicarbonsäuren. Darstellung von ω -[4.5-Diphenyl-1.2.4-triazolyl-(3)]-carbonsäuren. *Chem. Ber.* **1969**, 102, 2530-2535.

94. Huisgen, R.; Sauer, J.; Seidel, M. Die Synthese von 1,2,4-Triazolen aus 5-substituierten Tetrazolen und Carbonsäure-imidchloriden. *Chem. Ber.* **1960**, 93, 2885-2891.

95. Koldobskii, G. I.; Ostrovskii, V. A. Tetrazoles. *Russ. Chem. Rev. (Engl. Transl.)* **1994**, 63, 797.

96. Huisgen, R.; Sauer, J.; Seidel, M. Die Thermolyse 2,5-disubstituierter Tetrazole zu Nitrilimininen. *Chem. Ber.* **1961**, 94, 2503-2509.

97. Huisgen, R.; Grashey, R.; Seidel, M.; Wallbillich, G.; Knupfer, H.; Schmidt, R. Synthese von 1,2,4-Triazolen aus Nitrilimininen und Nitrilen. *Liebigs Ann.* **1962**, 653, 105-113.

98. Brogini, G.; Bruche, L.; Garanti, L.; Zecchi, G. Medium- and Large-ring Heterocyclic Systems by Intramolecular Nitrile Imine Cycloadditions. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. I* **1994**, 433-438.

99. Condi, S.; Corral, C.; Madronero, R. Synthesis of 1*H*-1,2,4-Triazoles via Nitrilium Salts. *Synthesis* **1974**, 28-29.

100. Shine, H. J.; Hoque, A. Formation of 1,2,4-Triazoles by Cation Radical Induced Oxidative Addition of Arylhydrazones of Benzaldehyde and Butyraldehyde to Nitriles. *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 4349-4353.

101. Polyák, M.; Varga, G.; Szilágyi, B.; Juhász, L.; Docsa, T.; Gergely, P.; Begum, J.; Hayes, J. M.; Somsák, L. Synthesis, enzyme kinetics and computational evaluation of N-(β -d-glucopyranosyl) oxadiazolecarboxamides as glycogen phosphorylase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, 21, 5738-5747.

102. Wittenberger, S. J.; Donner, B. G. Dialkyltin Oxide-Mediated Addition of Trimethylsilyl Azide to Nitriles - a Novel Preparation of 5-Substituted Tetrazoles. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 4139-4141.

103. Somsák, L.; Bokor, É.; Tóth, M.; Juhász, L.; Czifrák, K.; Kónya, B.; Kun, S.; Páhi, A.; Szöcs, B.; Varga, G.; Kóder, L.; Nagy, K.; Gergely, P.; Docsa, T. Glikogén foszforiláz

inhibitorok (Glycogen phosphorylase inhibitors). P1100602 Hungarian patent application. 2011.

104. Thoraval, J. Y.; Nagai, W.; Ko, Y.; Carrie, R. CYCLOADDITIONS OF DISUBSTITUTED DIAZO-COMPOUNDS TO P-CHLORO (BISTRIMETHYLSILYL) METHYLENE PHOSPHINE. *Tetrahedron* **1990**, 46, 3859-3868.

105. Ragnarsson, U.; Grehn, L.; Maia, H. L. S.; Monteiro, L. S. Reductive cleavage of N-substituted aromatic amides as tert-butyl acylcarbamates. *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. I* **2002**, 97-101.

106. Katritzky, A. R.; Cai, C. M.; Singh, S. K. Efficient microwave access to polysubstituted amidines from imidoylbenzotriazoles. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 3375-3380.