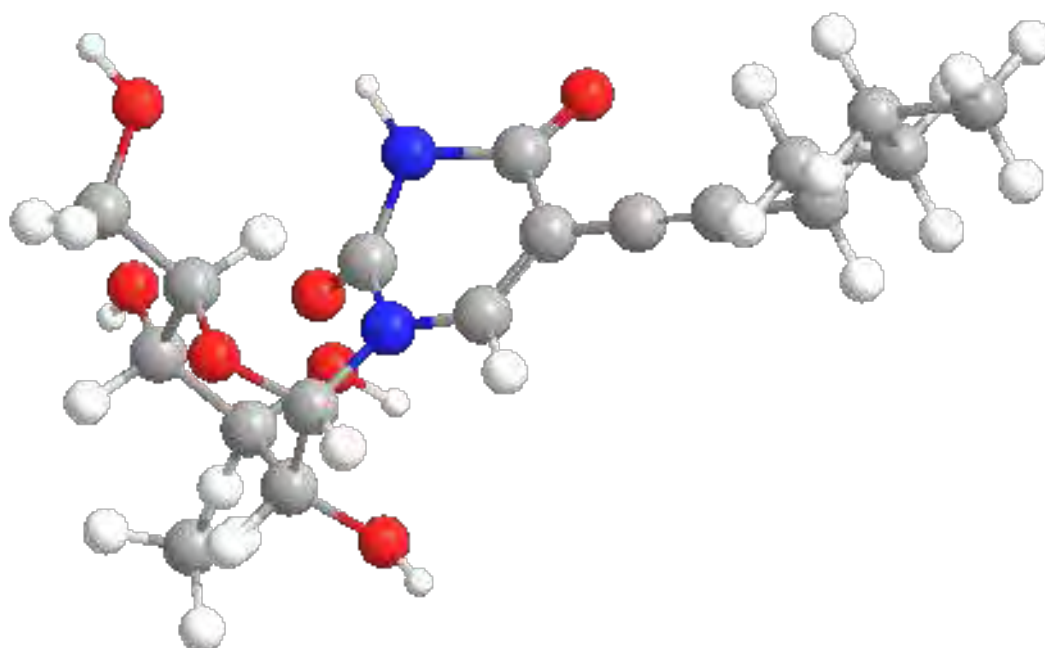


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*ΣΥΝΘΕΣΗ 5-ΑΛΚΥΝΥΛΟ ΠΥΡΙΜΙΔΙΝΟ
ΠΥΡΑΝΟΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΩΝ ΩΣ ΝΕΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ
ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ*



Κουσουρή Νεφέλη

ΛΑΡΙΣΑ 2011

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες	3
Εισαγωγή	4
Υδατάνθρακες	4
Σχηματισμός ημιακετάλης	5
Νουκλεοζίτες	9
Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί, αντιυικοί και αντιοξειδωτικοί παράγοντες	10
Γλυκοζιτικά και νουκλεοζιτικά παράγωγα ως αντιδιαβητικά	12
Σκοπός μελέτης	18
Πειραματικό μέρος	19
<i>Γενική μεθοδολογία</i>	19
Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας	19
Χρωματογραφία στήλης	19
Ξήρανση διαλυτών	20
Ταυτοποίηση ενώσεων	20
<i>Πειραματική διαδικασία</i>	21
Επισκόπηση συνθετικής οδού	21
Μεθοδολογία σύνθεσης	22
Σύνθεση 1,2,3,4,6-πεντα-Ο-ακετυλο-D-γλυκοπυρανόζης	22
Σύνθεση 1 - (2,3,6-τετρα-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο) – 5 - ιωδο ουρακίλη	23
Σύνθεση 1 - (β-D-γλυκοπυρανοζυλο) – 5 - ιωδο ουρακίλης	24
Σύνθεση 1 - (β-D-γλυκοπυρανοζυλο) – 5 - πεντυλοουρακίλης (a)	25
Σύνθεση 1 - (β-D-γλυκοπυρανοζυλο) – 5 - επτυλοουρακίλης (b)	26
Σύνθεση 6 – n – προπυλο – 3 [1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)}]-φουρανο [2,3-d]πυριμιδινο-2-ονη (a)	27
Σύνθεση 6 – n – πεντυλο -3 [1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)}]-φουρανο [2,3-d]πυριμιδινο-2-ονη (b)	28
Ταυτοποίηση ενώσεων με NMR	29
Αποτελέσματα – Συζήτηση	32
Βιβλιογραφία	35

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κομιώτης Δημήτριος –Αναπληρωτής Καθηγητής Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μαρκουλάτος Παναγιώτης –Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μαντά Στυλιανή –Διδάσκουσα ΠΔ 407/80 του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω στον επιβλέποντα καθηγητή κ. Δημήτριο Κομιώτη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το ιδιαίτερα ενδιαφέρον αυτό θέμα καθώς και για τις πολύτιμες και εποικοδομητικές υποδείξεις του. Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στη διδάσκουσα κα. Στυλιανή Μαντά για την αμέριστη συμπαράστασή της. Οι συμβουλές της και η πείρα της αποδείχθηκαν ιδιαίτερα ωφέλιμες για να κατανοήσω και να φέρω εις πέρας την εργασία που μου ανατέθηκε.

Ιδιαίτέρως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα και φίλο μου Χρήστο Κυρίτση για την καθημερινή του υποστήριξη καθ' όλη την περίοδο της παραμονής μου στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας. Η εργαστηριακή και επιστημονική του κατάρτιση, οι πολύτιμες συμβουλές του και το ευχάριστο κλίμα που δημιουργούσε υπήρξαν καθοριστικοί παράγοντες για την εκπόνηση αυτής της εργασίας.

Τέλος, θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας για την ένθερμη υποδοχή τους αλλά και για το δημιουργικό κλίμα συνεργασίας εντός του εργαστηριακού χώρου.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι υδατάνθρακες είναι μια ομάδα οργανικών ενώσεων που απαντώνται ευρέως στην φύση. Έχουν μεγάλη βιολογική σημασία καθώς αποτελούν σημαντικές συνιστώσες στη διατροφή όλων των ζωικών οργανισμών παρέχοντάς τους την απαιτούμενη ενέργεια επιβίωσης. Μπορούν επίσης να αποτελέσουν δομικά στοιχεία των κυττάρων, και μέρος άλλων μακρομορίων, όπως γλυκοπρωτεΐνες, λιποπολυσακχαρίτες και νουκλεϊκά οξέα. Τέλος, κάποιοι από αυτούς χρησιμοποιούνται και ως φάρμακα.

Μεγάλο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι νουκλεοζίτες που φέρουν τροποποιήσεις στην ετεροκυκλική βάση, έχουν εμφανίσει αξιοσημείωτη αντιδιαβητική δράση. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι πολλά φυσικά αντιβιοτικά με αντιϊική και αντικαρκινική δράση περιέχουν τροποποιημένους νουκλεοζίτες.

Στη συγκεκριμένη μελέτη γίνεται σχεδιασμός και σύνθεση νέων τροποποιημένων γλυκοπυρανόζυλο νουκλεοζιτών, αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, ως εν δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

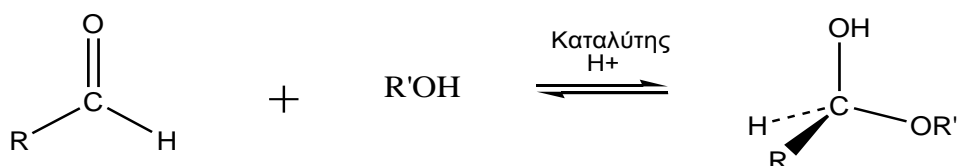
ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ

Οι υδατάνθρακες είναι αλδεϋδικές ή κετονικές ενώσεις με πολλαπλές υδροξυλικές ομάδες, που ονομάζονται κοινώς σάκχαρα. Υπάρχουν τέσσερα είδη υδατανθράκων: οι μονοσακχαρίτες οι οποίοι έχουν το μικρότερο μοριακό βάρος, οι δισακχαρίτες, οι ολιγοσακχαρίτες και τέλος οι πολυσακχαρίτες με πολύ υψηλά μοριακά βάρη.

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ	
<i>Μονοσακχαρίτες</i>	Γλυκόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη
<i>Δισακχαρίτες</i>	σουκρόζη, λακτόζη, μαλτόζη
<i>Ολιγοσακχαρίτες</i>	μαλτοδεξτρίνες, φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες
<i>Πολυσακχαρίτες</i>	Άμυλο: Αμυλόζη, αμυλοπηκτίνη
	Μη αμυλούχοι: Κυτταρίνη, πηκτίνες, υδροκολλοειδή

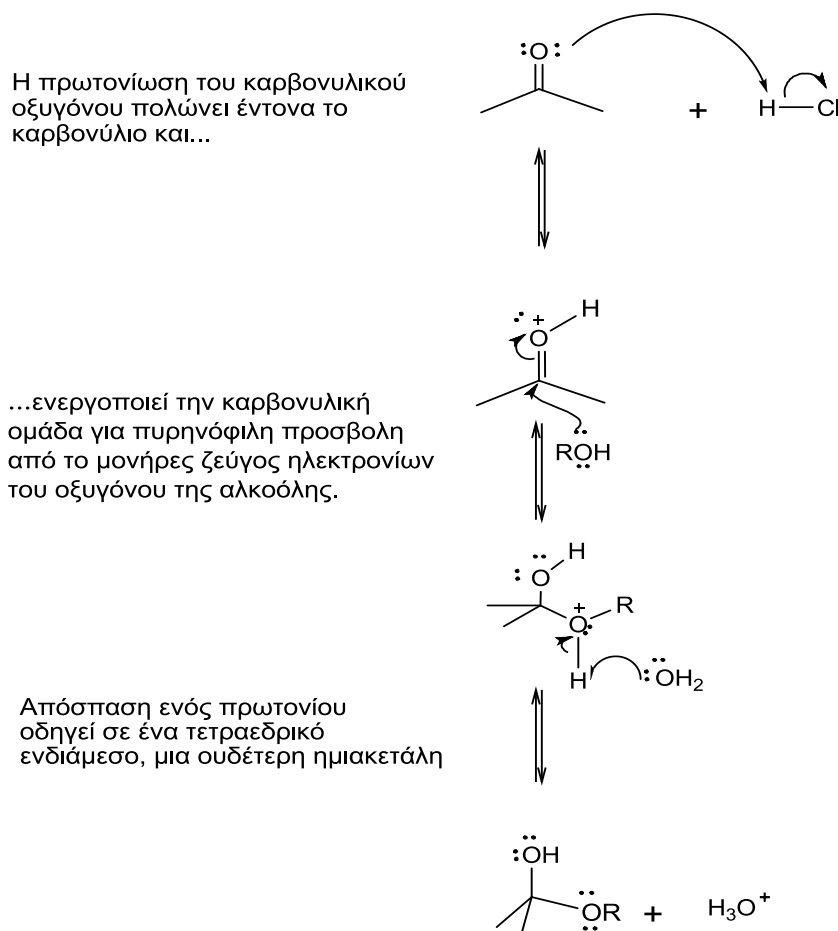
ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΗΜΙΑΚΕΤΑΛΗΣ

Γενικά, γνωρίζουμε πως οι αλκοόλες πραγματοποιούν μια γρήγορη και αντιστρεπτή πυρηνόφιλη προσθήκη με κετόνες ή αλδεΐδες προς σχηματισμό ημιακεταλών (Mc Murry, 2000, p. 1245).



Εικόνα 1: Πυρηνόφιλη προσθήκη

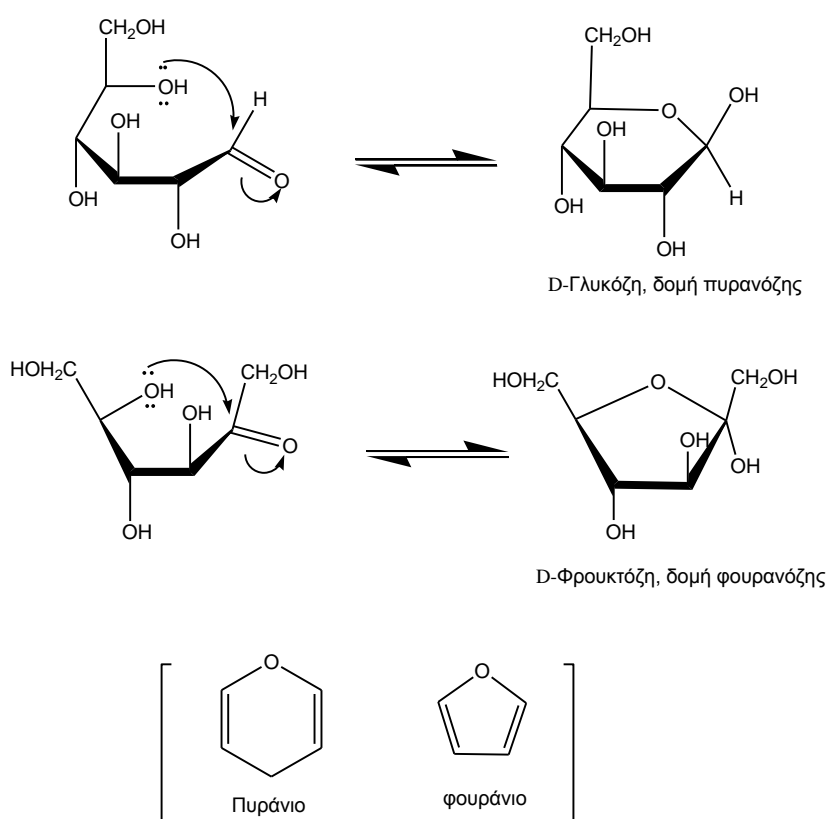
Παρακάτω (*Εικόνα 2*) παρατίθεται ο μηχανισμός της αντίδρασης αυτής (Mc Murry, 2000, p. 905):



Εικόνα 2. Μηχανισμός σχηματισμού ημιακετάλης

Τα σάκχαρα κατηγοριοποιούνται αναλόγως με το μέγεθος της αλυσίδας του άνθρακα. Για παράδειγμα, σε τριόζες αν έχουν τρία μόρια άνθρακα, πεντόζες, αν έχουν πέντε μόρια άνθρακα, ή εξόζες αν έχουν έξι. Οι μονοσακχαρίτες μπορούν να υπάρξουν σε δύο μορφές. Την μορφή ανοιχτής αλυσίδας και την κυκλοποιημένη τους μορφή.

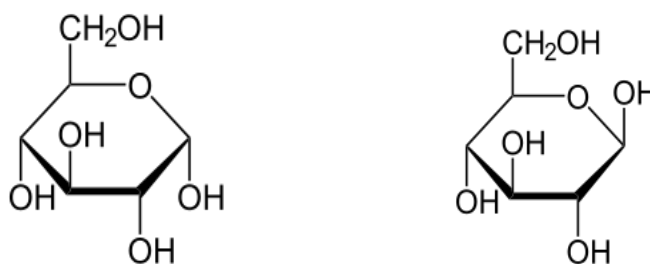
Η ανοιχτή αλυσίδα μπορεί να κυκλοποιηθεί λοιπόν, όταν μια καρβονυλική ομάδα του μορίου τους αντιδρά με μια ομάδα υδροξυλίου, προς δημιουργία ημιακετάλης. Αυτή η ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη οδηγεί στην δημιουργία φουρανοζών (πενταμελείς δακτύλιοι) ή πυρανοζών (εξαμελείς δακτύλιοι) (**Εικόνα 3**). Οι ονομασίες πυρανόζη και φουρανόζη προέρχονται από τις ονομασίες των απλών κυκλικών αιθέρων πυράνιο και φουράνιο. Οι πενταμελείς και εξαμελείς κυκλικές ημιακετάλες είναι ιδιαίτερα σταθερά μόρια, γι' αυτό αρκετοί υδατάνθρακες απαντούν σε κατάσταση ισορροπίας ανάμεσα στις δομές ανοικτής και κλειστής αλυσίδας.



Εικόνα 3. Κυκλικές δομές πυρανόζης και φουρανόζης

Παρατηρώντας την εικόνα 3, βλέπουμε πως στην περίπτωση της γλυκόζης, η αλδεϋδική ομάδα του άνθρακα C-1 αντιδρά με το υδροξύλιο που βρίσκεται στην θέση C-5, σχηματίζοντας μια ενδομοριακή ημιακετάλη και στην συνέχεια παράγοντας τον εξαμελή δακτύλιο της πυρανόζης. Στην περίπτωση της φουρανόζης η κετονική ομάδα στον άνθρακα C-2 αντιδρά με το υδροξύλιο του άνθρακα C-5 που οδηγεί στον σχηματισμό μιας ενδομοριακής ημιακετάλης, έχοντας ως αποτέλεσμα την δημιουργία δακτυλίου φουρανόζης.

Με την κυκλοποίηση των σακχάρων σε ημιακετάλη σχηματίζεται ένα πρόσθετο στερεογονικό κέντρο στο μόριο, στη θέση του πρώην καρβονυλικού άνθρακα, και παρουσιάζεται το φαινόμενο της ανωμερείας. Στην περίπτωση της γλυκόζης ο άνθρακας C-1 είναι ανωμερής με αποτέλεσμα να μπορούν να σχηματιστούν δυο στερεοχημικές δομές : της α-D-γλυκοπυρανόζης και της β-D-γλυκοπυρανόζης (**Εικόνα 4**). Στην περίπτωση της φρουκτόζης, ο ανωμερής άνθρακας είναι ο C-2. Το α ή το β καταδεικνύει σε ποια θέση στον χώρο βρίσκεται η ύδροξυ ομάδα του ανωμερούς άνθρακα σε σχέση με τον υποκαταστάτη του C-5 άνθρακα. Αν ο υποκαταστάτης (υδροξύλιο σε αυτή την περίπτωση) του ανωμερούς άνθρακα βρίσκεται σε θέση trans, κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου προς τον υποκαταστάτη στον άνθρακα C-5, τότε το σάκχαρο χαρακτηρίζεται ως μορφής α. Αν συμβαίνει το αντίθετο, δηλαδή ο υποκαταστάτης του ανωμερούς άνθρακα βρίσκεται σε θέση cis, πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου, ως προς τον υποκαταστάτη του άνθρακα C-5 τότε το σάκχαρο χαρακτηρίζεται ως μορφής β.

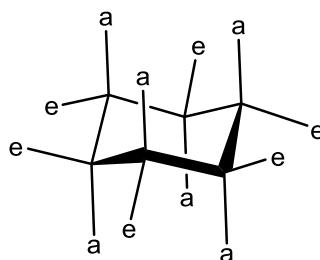


Εικόνα 4: α-D-γλυκοπυρανόζη

β-D-γλυκοπυρανόζη

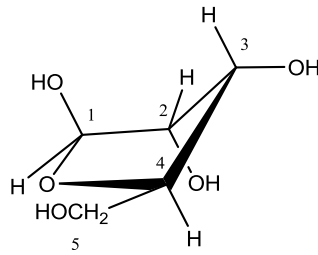
Οι δομές αυτές (Haworth) όμως, δεν μας παρέχουν ακριβή εικόνα του εξαμελή δακτυλίου της πυρανόζης. Ο συγκεκριμένος δακτύλιος δεν είναι δυνατόν να είναι επίπεδος, λόγω της τετραεδρικής γεωμετρίας των κορεσμένων ατόμων άνθρακα.

Αντίθετα, οι δακτύλιοι της πυρανόζης μπορούν να υιοθετήσουν στερεοδιατάξεις ανάκλιντρο, με αποτέλεσμα να εξουδετερώνονται όλες οι τάσεις, εφόσον όλοι οι γειτονικοί δεσμοί C-H έχουν διαβαθμισμένη διαμόρφωση και οι γωνίες C-C-C μπορούν να προσεγγίσουν την απαλλαγμένη από τάσεις τιμή της κανονικής τετραεδρικής γωνιάς (Mc Murry, 2000, p.151). Οι υποκαταστάτες των ατόμων άνθρακα του δακτυλίου είναι δύο ειδών: οι αξονικοί και οι ισημερινοί (*εικόνα 5*). Οι αξονικοί δεσμοί είναι σχεδόν κάθετοι προς το μέσο επίπεδο του δακτυλίου, ενώ οι ισημερινοί δεσμοί είναι σχεδόν παράλληλοι προς το επίπεδο αυτό. Οι αξονικοί υποκαταστάτες προβάλλουν πάνω και κάτω από το μέσο επίπεδο του δακτυλίου, ενώ οι ισημερινοί υποκαταστάτες διατάσσονται στην περιφέρεια. Οι αξονικοί υποκαταστάτες, εκτός του υδρογόνου, παρεμποδίζουν στερεοχημικά ο ένας τον άλλο, αν ξεπροβάλλουν από την ίδια πλευρά του δακτυλίου. Αντίθετα, υπάρχει πολύ περισσότερος χώρος για τους ισημερινούς υποκαταστάτες. Έτσι, ένας υποκαταστάτης είναι σταθερότερος στην ισημερινή απ' ό τι στην αξονική θέση.



Εικόνα 5. Μορφή ανάκλιντρο μιας πυρανόζης (e = ισημερινός υποκαταστάτης, a = αξονικός υποκαταστάτης)

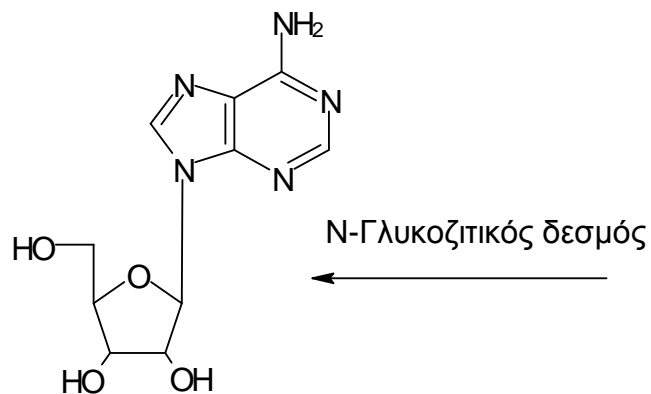
Κατά αναλογία ο δακτύλιος της φουρανόζης μπορεί να είναι πτυχωμένος, έτσι ώστε τα τέσσερα άτομα να είναι στο ίδιο επίπεδο και το πέμπτο εκτός του επιπέδου αυτού (*εικόνα 6*). Αυτή η διαμόρφωση καλείται μορφή φακέλου. Οι δακτύλιοι της φουρανόζης είναι σε θέση να αλληλομετατρέπονται ταχύτατα σε διαφορετικές στερεοδιατάξεις. Είναι πολύ πιο ευέλικτοι από τους δακτυλίους της πυρανόζης, γεγονός που εξηγεί την επιλογή τους ως συστατικών του RNA και DNA (Stryer, 1997).



Εικόνα 6. Μορφή φακέλου της β-D-ριβόζης

ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ

Οι νουκλεοζίτες απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς στην φύση διότι αποτελούν δομικά στοιχεία του DNA και του RNA. Ο νουκλεοζίτης προκύπτει από την ένωση μιας πουρινικής (αδενίνη, γουανίνη) ή πυριμιδινικής (θυμίνη, ουρακίλη, κυτοσίνη) βάσης με τον C-1 μιας πεντόζης με β-N-γλυκοζιτικό δεσμό (Berg J. M. *et al*, 2001). Αναλόγως αν η πεντόζη είναι ριβόζη ή δεοξυριβόζη, ο νουκλεοζίτης καλείται ριβονουκλεοζίτης ή δεοξυριβονουκλεοζίτης και χαρακτηρίζεται ως β στερεοδιάταξης γιατί η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του σακχάρου (**Εικόνα 7**).



Εικόνα 7: Η β-στερεοδιάταξη του N-γλυκοζιτικού δεσμού της αδενοσίνης

Επίσης, έχει βρεθεί ότι πολλά φυσικά αντιβιοτικά με σημαντική αντιική και αντικαρκινική δράση περιέχουν στη δομή τους νουκλεοζίτες συνδεδεμένους με ολιγοσακχαρίτες. Συνεπώς έχουν γίνει πολλές τροποποιήσεις στο τμήμα της βάσης

και του σακχάρου των φυσικών νουκλεοζιτών με απώτερο σκοπό να διευρυνθεί το φάσμα των θεραπευτικών δραστηριοτήτων τους.

ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ ΩΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ, ΑΝΤΪΠΙΚΟΙ ΚΑΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους παρουσιάζουν αντικαρκινικές και κυτταροστατικές ιδιότητες και αποτελούν αντικείμενο μελέτης εδώ και πολλά χρόνια (Tzioumaki N. *et al*, 2009; Agelis G. *et al*, 2008; Tsoukala E. *et al*, 2007). Επίσης, έχει διαπιστωθεί και η ικανότητα τους να ενεργοποιούν αποπτωτικούς μηχανισμούς σε ένα εύρος καρκινικών κυτταρικών σειρών (Lui V. *et al*, 2010; Bhat U. G. *et al*, 2010). Ήδη, οι αντιμεταβολίτες που ορισμένοι από αυτούς ανήκουν στην κατηγορία των νουκλεοζιτών, χρησιμοποιούνται εκτεταμένα στην ιατρική ως πρώτης γραμμής φαρμακευτική αντιμετώπιση κατά μίας πλειάδας μορφών νεοπλασιών που στοχεύει στην παρεμπόδιση της σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων των καρκινικών κυττάρων. Μερικά παραδείγματα αποτελούν:

1-β-D-αραβινοφουρανοζυλοκυτοσίνη

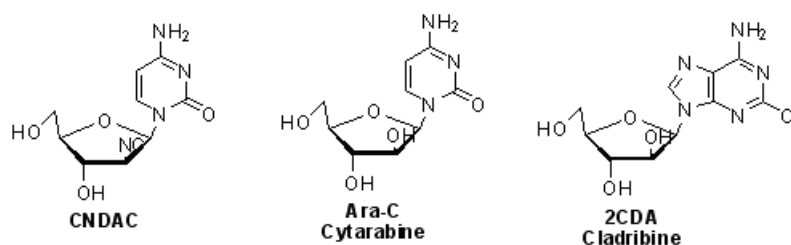
Cytarabine (1-β-D-αραβινοφουρανοζυλοκυτοσίνη, Ara-C Matsuda and Sasaki 2004)

Cladribine (2-χλωρο-2'-δεοξυαδενοσίνη, 2CDA)

CNDAC[1-(2'-C-κυανο-2'-δεοξυ-β-D-αραβινο-πεντοφουρανοζυλο)κυτοσίνη]

(Matsuda *et al*. 1991b, Azuma *et al*. 1993, Tanaka *et al*. 1992, Azuma *et al*. 1995, Matsuda and Azuma 1995)

Οι ενώσεις αυτές είναι αποτελεσματικές κατά της λευχαιμίας και των λεμφωμάτων, αλλά και κατά κακοήθων όγκων.



Εικόνα 8: CNDAC, Cytarabine, Cladribine

Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους μπορούν, επίσης, να επηρεάσουν τους αντιγραφικούς και μεταγραφικούς μηχανισμούς του πολλαπλασιασμού των ιών. Παρέχουν έτσι ένα αρκετά ενδιαφέρον σημείο εκκίνησης για την ανάπτυξη αντιικών φαρμάκων (Agelis G. *et al*, 2008; Komiotis D. *et al*, 2008; Agelis G. *et al*, 2007; Zhou W. *et al*, 2004; Perigaund C. *et al*, 1992; Komiotis D. *et al*, 1991). Πολλά νουκλεοζιτικά ανάλογα είναι ευρέως χρησιμοποιούμενα σήμερα. Από τα πιο γνωστά είναι:

ddC (Zalcitabine), **AZT** (Zidovudine):

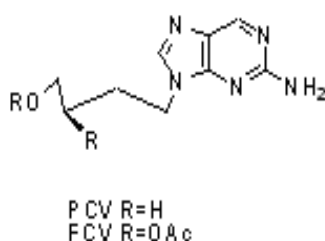
είναι αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης και χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση του ιού HIV1,ο οποίος προκαλεί το AIDS.



Εικόνα 9: ddC, AZT

PCV (Penciclovir):

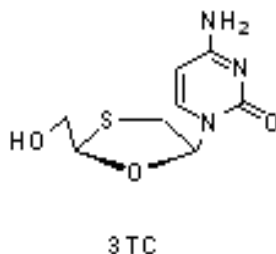
είναι αναστολέας DNA πολυμεράσης και χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση των ιών HSV1,HSV2 και VZV,οι οποίοι προκαλούν έρπητα.



Εικόνα 10: PCV

3TC (Lamivudine)

είναι αναστολέας της αντίστροφης μεταγραφάσης και χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση του ιού HBV



Εικόνα 11: 3TC

Επιπλέον, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα έχουν επιδείξει και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Spanou C. *et al*, 2007). Μία ουσία που μπορεί να επιβραδύνει ή να αποτρέψει την οξείδωση ενός υποστρώματος ενώ βρίσκεται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με το υπόστρωμα ορίζεται ως αντιοξειδωτική (Halliwell B. 2001). Μερικά παραδείγματα αναλόγων που παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση είναι οι πυρανονουκλεοζίτες της μαννόζης, της γαλακτόζης και της φθορογλυκόζης (Spanou C. *et al*, 2007). Τα συγκεκριμένα ανάλογα όταν φέρουν α,β-κετοακόρεστο σύστημα στο σάκχαρό τους εμφανίζουν αποτελεσματικότητα κατά ελεύθερων ριζών ROO[•]. Αντίθετα, ανάλογα που δεν έφεραν το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό είχαν περιορισμένη δράση ως αντιοξειδωτικά, απαιτώντας πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις για την εκδήλωση αποτελεσμάτων.

ΓΛΥΚΟΖΙΤΙΚΑ ΚΑΙ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΙΚΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΩΣ ΑΝΤΙΔΙΑΒΗΤΙΚΑ

Η γλυκόζη που αποτελεί κύρια πηγή ενέργειας, παρέχεται στον οργανισμό με τη μορφή υδατανθράκων από την τροφή αλλά παράγεται και ενδογενώς κατά τη γλυκογονόλυση (Marshall W., 2000). Ο οργανισμός προσπαθεί με κάθε τρόπο να διατηρήσει τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα σταθερά γι' αυτό και το γλυκογόνο λειτουργεί ως αποθηκευτικός χώρος με ελεγχόμενο καταβολισμό. Ο μεταβολισμός του γλυκογόνου ρυθμίζεται από ορμονικά διεγερόμενους καταρράκτες όπου εμπλέκονται η ινσουλίνη και η γλυκαγόνη. (Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, 2006). Η

ινσουλίνη παράγεται όταν αυξάνεται η συγκέντρωση της γλυκόζης, προάγει δηλαδή την απομάκρυνση της γλυκόζης από το αίμα και την αποταμίευσή της στη μορφή γλυκογόνου. Το αντίθετο συμβαίνει με τη γλυκαγόνη. Φαίνεται λοιπόν πως αυτές οι δύο ορμόνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ομοιοστασία της γλυκόζης.

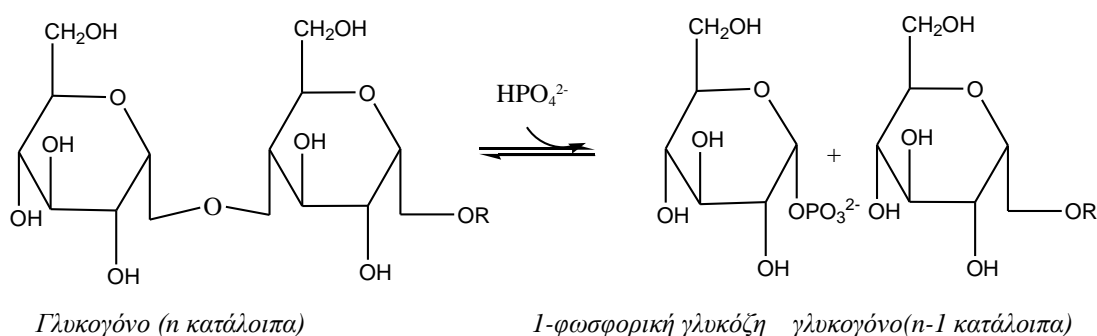
Στις μέρες μας, είναι πολύ διαδεδομένες οι διαταραχές μεταβολισμού των υδατανθράκων με πιο κύρια το σακχαρώδη διαβήτη. Η υπεργλυκαιμία αυτή οφείλεται στην αυξημένη παραγωγή γλυκόζης από το ήπαρ σε συνδυασμό με τη μειωμένη απομάκρυνση της από το αίμα. Υπάρχουν δύο τύποι διαβήτη. Στο διαβήτη τύπου 1 έχουμε καταστροφή παγκρεατικών κυττάρων και ουσιαστικά καμία έκκριση ινσουλίνης. Στο διαβήτη τύπου 2, είτε η ποσότητα της ινσουλίνης που εκκρίνεται είναι ανεπαρκής για να αποφευχθεί η υπεργλυκαιμία είτε παρατηρείται έλλειψη ευαισθησίας στη δράση ινσουλίνης. (Marshall W., 2000)

Ο διαβήτης τύπου 2 έχει εκτιμηθεί πως επηρεάζει πάνω από το 5% του ενήλικου πληθυσμού στις δυτικές κοινωνίες. Γενικότερα, οι διαβήτες είναι η κύρια αιτία της τύφλωσης και νεφρικής ανεπάρκειας και είναι γνωστό ότι αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου, οδηγώντας σε καρδιακή προσβολή, έμφραγμα και ακρωτηριασμό των κάτω άκρων (Somsak et al, 2008). Περίπου το 90% των διαβητικών είναι τύπου 2. Οι προσπάθειες για την αντιμετώπιση του έχουν επικεντρωθεί σε αγωγές που περιλαμβάνουν δίαιτα, άσκηση, υπογλυκαιμικά φάρμακα και αν αυτά αποτύχουν, σε χορήγηση ινσουλίνης. Οι προσεγγίσεις αυτές δεν είναι πάντοτε ικανοποιητικές, επομένως, υπάρχει έντονο επιστημονικό ενδιαφέρον για την ανακάλυψη νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων με σκοπό τον καλύτερο γλυκαιμικό έλεγχο με αποτέλεσμα την ελάττωση της συχνότητας εμφάνισης των επιπλοκών της νόσου.

Η ανακάλυψη αντιδιαβητικών φαρμάκων αποτελεί ένα από τους κύριους στόχους των ερευνητικών τμημάτων πολλών μεγάλων φαρμακοβιομηχανιών (AstraZeneca, Aventis Pharma, Pfizer, Novo Nordisk A/S, κ.ά.). Οι υπάρχουσες θεραπείες είναι ατελείς ή προκαλούν σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες. Η διεθνής ερευνητική προσπάθεια εστιάζεται σε αντιγονοειδικές ή γενικότερα εξειδικευμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις με ενδεχομένως ριζικά αποτελέσματα. Βάσει αυτού, η συγκεκριμένη μελέτη στοχεύει στη σύνθεση νέων τροποποιημένων γλυκοκυρανόζυλο νουκλεοσιτών ως εν δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

Η ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP), η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου, μελετάται εντατικά. Πρόκειται για ένα ένζυμο

που καταλύει το πρώτο στάδιο της ενδοκυτταρικής αποικοδόμησης του γλυκογόνου προς 1-φωσφορική γλυκόζη (Glc-1-P), η οποία χρησιμοποιείται μέσω της γλυκόλυσης για την παραγωγή ενέργειας και στο ήπαρ μετατρέπεται προς γλυκόζη (Oikonomakos and Somsak, 2008).

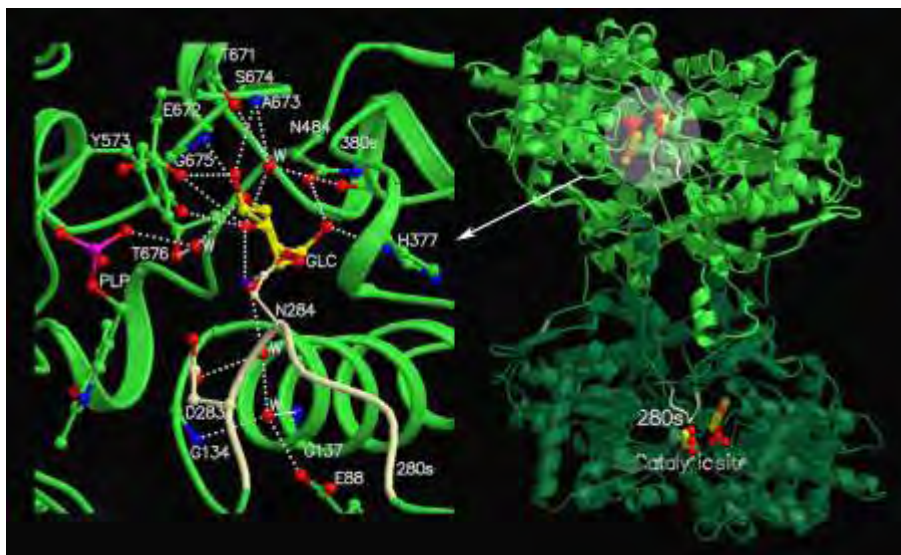


Εικόνα 12: Η φωσφορυλάση διασπά το υπόστρωμά της με την προσθήκη του ορθοφωσφορικού (Pi).

Η GP είναι μία αλλοστερική πρωτεΐνη η οποία βρίσκεται στους μύες και το ήπαρ και υπάρχει σε δύο μορφές, την GPb (ανενεργός, T-διαμόρφωση) και την GPa (ενεργός, R-διαμόρφωση). Στον ήρεμο μυ, υπάρχει ως GPb, η οποία ενεργοποιείται είτε με AMP είτε με φωσφορυλίωση προς GPa με τη δράση της κινάσης της φωσφορυλάσης (PhK), ενώ στο ήπαρ δεν είναι ευαίσθητη σε ρύθμιση από AMP διότι το ήπαρ δεν υφίσταται εντυπωσιακές αλλαγές στο ενεργειακό φορτίο. Η αναστολή της ενζυμικής δράσης της GP από τη γλυκόζη έχει φυσιολογική σημασία στο ήπαρ. Η γλυκόζη, ο φυσιολογικός ρυθμιστικός παράγοντας του μεταβολισμού του γλυκογόνου, προκαλεί αδρανοποίηση της GP και δρα συνεργιστικά με την ινσουλίνη, με αποτέλεσμα την ελάττωση της αποικοδόμησης και την παράλληλη αύξηση της σύνθεσης γλυκογόνου (που επιτυγχάνεται με τη δράση της γλυκογονικής συνθάσης, GS) (Oikonomakos, 2002). Έτσι ενώσεις με ισχυρότερη ανασταλτική δράση (συγκριτικά με τη δράση της γλυκόζης) δύνανται να μετατοπίζουν την ισορροπία αποικοδόμησης ↔ σύνθεσης γλυκογόνου προς την κατεύθυνση της σύνθεσης, παρουσιάζοντας ενδεχομένως κλινικό ενδιαφέρον για την αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου 2.

Η GP, λόγω του κεντρικού ρόλου που κατέχει, μεταξύ άλλων ενζύμων στο μεταβολισμό του γλυκογόνου χρησιμοποιείται ως μοριακός στόχος για τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

Ειδικότερα, η τρισδιάστατη δομή της μυϊκής φωσφορυλάσης από κουνέλι (RMGPb, MW 97,444 Da, 842 αμινοξέα) που έχει προσδιορισθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων X¹⁹, μελετήθηκε εκτενώς. Τα επί μέρους κέντρα σύνδεσης του ενζύμου τα οποία χρησιμοποιούνται ως «στόχος» για το σχεδιασμό εν δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων παρουσιάζονται στο **Εικόνα 13**.



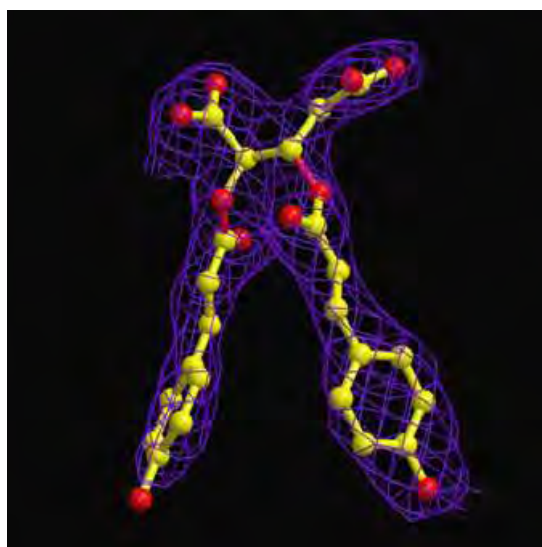
Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση του τρόπου σύνδεσης της γλυκόζης στο καταλυτικό κέντρο της RMGPb. Οι δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζονται με διακεκομμένες γραμμές. Υποδεικνύεται η θέση του βρόχου 280s με υποκίτρινο χρώμα.

Η γνώση της τρισδιάστατης δομής της α-D γλυκόζης ως συμπλόκου με την RMGPb βοήθησε στη λεπτομερή καταγραφή των αλληλεπιδράσεων αυτής με τα αμινοξέα στην περιοχή του καταλυτικού κέντρου και ειδικότερα με την πλευρική αλυσίδα των Asn284 και Asp283. Τα αμινοξέα αυτά προέρχονται από τον εύκαμπτο βρόχο 280, ο οποίος παρεμποδίζει τη σύνδεση του υποστρώματος στο καταλυτικό κέντρο.

Η γλυκόζη αποτέλεσε πρόδρομο ένωση για το σχεδιασμό νέων αναστολέων, αναλόγων αυτής οι οποίοι μελετήθηκαν με βιοχημικές και κρυσταλλογραφικές μεθόδους. Τα τελευταία 6 έτη, μελέτες κατευθυνόμενου (από την 3D) σχεδιασμού, κινητικές και κρυσταλλογραφικές αναλύσεις έχουν οδηγήσει στην ανακάλυψη πληθώρας (>100 ενώσεων) παραγώγων του α- και β-ανυδρο-γλυκο-επτονικού οξέος, της 1-δεσοξυ-1-θειο-β-D-γλυκόζης, της β-D-γλυκοκυρανοζυλαμίνης και της σπιρουδαντοΐνης με αυξημένη χημική συγγένεια (συγκριτικά με την α-D-γλυκόζη)

προς τη GPb (Kontou et al. 2000, Tiraidis al. 2007, Zographos et al. 2007, Zographos et al. 1997). Σε νεώτερη μελέτη, η ένωση (-)(S)-3-isopropyl 4-(2-chlorophenyl)-1,4

dihydro-1-ethyl-2-methyl-pyridine-3,5,6-tricarboxylate (W1807), της οποίας η σύνθεση έγινε στα εργαστήρια της Bayer AG βρέθηκε ως ο πλέον ισχυρός (μέχρι σήμερα) αναστολέας της GPb (με σταθερά αναστολής, $K_i=1.6$ nM, δηλαδή 106 φορές μικρότερη της αντίστοιχης K_i για την α -D-γλυκόζη). Η κρυσταλλογραφική ανάλυση του συμπλόκου GPb-W1807, σε ευκρίνεια 2.3 Å (Zographos et al, 1997) και του συμπλόκου GPb- α -D-γλυκόζη-W1807, σε ευκρίνεια 2.1 Å (Oikonomakos et al, 1999) αποκάλυψε ότι η W1807 συνδέεται στο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου (κέντρο σύνδεσης του AMP). Πρόσφατες μελέτες, στην κατεύθυνση ταυτοποίησης ενώσεων με ενδεχόμενο κλινικό ενδιαφέρον στη ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου στο διαβήτη τύπου II, οδήγησαν στην ανακάλυψη μιας νέας τάξης αναστολέων της γλυκογονικής φωσφορυλάσης (Hoover et al. 1998; Martin et al. 1998). Η ένωση 5-chloro-1H-indole-2-carboxylic acid [1-(4-fluorobenzyl)-2-(4-hydroxypiperidin-1-yl)-2-oxoethyl]amide (CP320626) είναι ισχυρός αναστολέας της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης α ($IC_{50}=1$ μ M), δρα συνεργιστικά με τη γλυκόζη ($IC_{50}=0.13$ μ M) και προκαλεί ελάττωση των επιπέδων γλυκόζης σε διαβητικά ob/ob ποντίκια (χωρίς να μεταβάλλονται τα επίπεδα ινσουλίνης πλάσματος) (Oikonomakos and Somsak, 2008). Η κρυσταλλογραφική ανάλυση του συμπλόκου GPb-CP320626 (Oikonomakos et al, 2000) αποκάλυψε ένα νέο αλλοστερικό κέντρο σύνδεσης, που βρίσκεται στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας του διμερούς (**Εικόνα 14**), στη μεσεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων. Το νέο κέντρο σύνδεσης απέχει > 30 Å από το καταλυτικό κέντρο, όμως, η σύνδεση της ένωσης CP320626 προκαλεί σταθεροποίηση της ανενεργούς T-διαμόρφωσης (ή επάγει την ανενεργό T-διαμόρφωση).



Εικόνα 14: Η δομή της ένωσης FR258900 και η ηλεκτρονιακής της πυκνότητα όπως παρατηρήθηκε κατά τη σύνδεση της στην GPb.

Επίσης, η φλαβοπιριδόλη (L86-8276), ισχυρός αναστολέας των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CDKs) και εν δυνάμει αντικαρκινικό φάρμακο (κλινική φάση II), βρέθηκε να αναστέλλει τη GP και να προκαλεί συσσώρευση γλυκογόνου σε A549 NSCLC κύτταρα (Kaiser et al. 2001). Οι κρυσταλλικές δομές των συμπλόκων GPb-φλαβοπιριδόλης (1.76 Å) και GPα-α-D-γλυκόζη-φλαβοπιριδόλης (2.23 Å) έδειξαν ότι η φλαβοπιριδόλη συνδέεται στο κέντρο αναστολής, το οποίο, στην T-διαμόρφωση, σχηματίζεται από δυο υδρόφοβα αμινοξέα, Phe285 (από το βρόχο 280s) και Tyr613 (από την αρχή της α19 έλικας) (Oikonomakos et al. 2000).

Σε προκαταρκτικά κινητικά και κρυσταλλογραφικά πειράματα έχουν ταυτοποιηθεί 12 γλυκοπυρανονουκλεοζιτικά παράγωγα, τα οποία προκαλούν σημαντική αναστολή της ενζυμικής δράσης της GP (Tsirkone et al. 2010). Επιπλέον, θεωρητικές *in silico* μελέτες των παραγώγων της γλυκόζης με υποκαταστάτες στην 3'-θέση (αξονικούς και ισημερινούς), υπέδειξαν ότι ο αξονικός υποκαταστάτης -CH₂OH είναι ο πιο υποσχόμενος προσδέτης και μπορεί να θεωρηθεί υποψήφιος για περαιτέρω σύνθεση και *in vitro* κινητική ανάλυση (Lamprakis et al. 2009).

Η κατανόηση του μηχανισμού δράσης των ενώσεων που βρέθηκαν ως πιθανοί υποψήφιοι υπογλυκαιμικών φαρμάκων, καθώς επίσης και ο σχεδιασμός νουκλεοζιτικών δομικών αναλόγων αυξημένης συγγένειας και εξειδίκευσης προς τη φωσφορυλάση, μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη φαρμάκων για την αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου 2.

ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η σύνθεση νέων β-D-γλυκοπυρανόζυλο νουκλεοζιτών, αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, ως εν δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

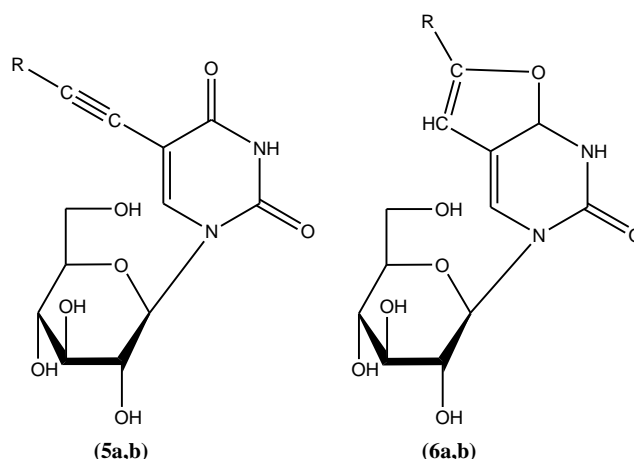
Οι νουκλεοζίτες μαζί με τα ανάλογά τους αποτελούν το θεμελιώδη λίθο για την ανάπτυξη ενώσεων με αυξημένη βιολογική δράση, ελαττωμένη τοξικότητα και λιγότερες ανοσοκατασταλτικές παρενέργειες σε σχέση με τις μέχρι τώρα κλινικά χρησιμοποιούμενες. Η ραγδαία ανάπτυξη της φαρμακευτικής χημείας επέτρεψε τη μελέτη, τη σύνθεση και την προώθηση στην αγορά πληθώρας φαρμάκων που ως δραστική ουσία περιέχουν κάποιο νουκλεοζιτικό ανάλογο.

Η ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου είναι μια σημαντική στρατηγική για τον έλεγχο του σακχάρου στον διαβήτη τύπου 2. Η GP είναι ένα

ένζυμο που κατέχει κεντρικό ρόλο στο μεταβολισμό του γλυκογόνου και αποτελεί σημαντικό μοριακό στόχο για την σχεδίαση νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

Λαμβάνοντας υπόψη μελέτες που υποδεικνύουν υποκατεστημένους στο σάκχαρο πυριμιδινικούς πυρανονουκλεοζίτες ως εν δυνάμει αναστολείς της GP, κρίθηκε ενδιαφέρουσα η σύνθεση μιας νέας γενιάς πυρανονουκλεοζιτικών αναστολέων. Η τροποποίηση, πλέον, γίνεται στην βάση που συνδέεται με τον δακτύλιο και συγκεκριμένα στη 5 θέση της ιωδοουρακίλης, όπου απομακρύνεται το ιώδιο και στη θέση του προσθέτονται ακραία αλκίνια. Ο προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων των νέων νουκλεοζιτικών παραγώγων καταδεικνύει- όπως αναφέρεται και στα συμπεράσματα της παρούσης εργασίας- τη δυνατότητα αξιοποίησής τους ως θεραπευτικά μέσα για την αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου 2 .

Η δομή των μορίων που στόχευσαν οι συνθετικές μας πορείες φαίνονται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 15: Νέοι πυρανονουκλεοζιτικοί αναστολείς

Όπου: **5a** R= C₃H₇, **5b** R= C₅H₁₁, **6a** R= C₃H₇, **6b** R= C₅H₁₁

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC : Thin layer chromatography)

Σε αυτή τη μέθοδο χρησιμοποιούνται πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με Silica gel (Merck Kieselgel 60F₂₅₄) ώστε να ελεγχθεί η αντίδραση. Η ανίχνευση των προϊόντων γίνεται είτε ψεκάζοντας με διάλυμα θειικού οξέος (H₂SO₄) 30% είτε υπό λυχνία υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας (254 nm).

Τα συστήματα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα παρακάτω :

- Διάλυμα Α : Εξάνιο/Οξικός Αιθυλεστέρας 30/70
- Διάλυμα Β : Εξάνιο/Οξικός Αιθυλεστέρας 60/40
- Διάλυμα Γ : Μεθανόλη/Οξικός Αιθυλεστέρας 10/90

Χρωματογραφία στήλης

Η χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό των προϊόντων και επιτυγχάνεται με υπό πίεση αέρα (flash chromatography), σε silica gel (240-400, Merck grade).

Ως διαλύτες έκλουσης χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι:

- Διάλυμα Α : Εξάνιο/Οξικός Αιθυλεστέρας 30/70
- Διάλυμα Β : Εξάνιο/Οξικός Αιθυλεστέρας 60/40
- Διάλυμα Γ : Μεθανόλη/Οξικός Αιθυλεστέρας 10/90

Ξήρανση διαλυτών

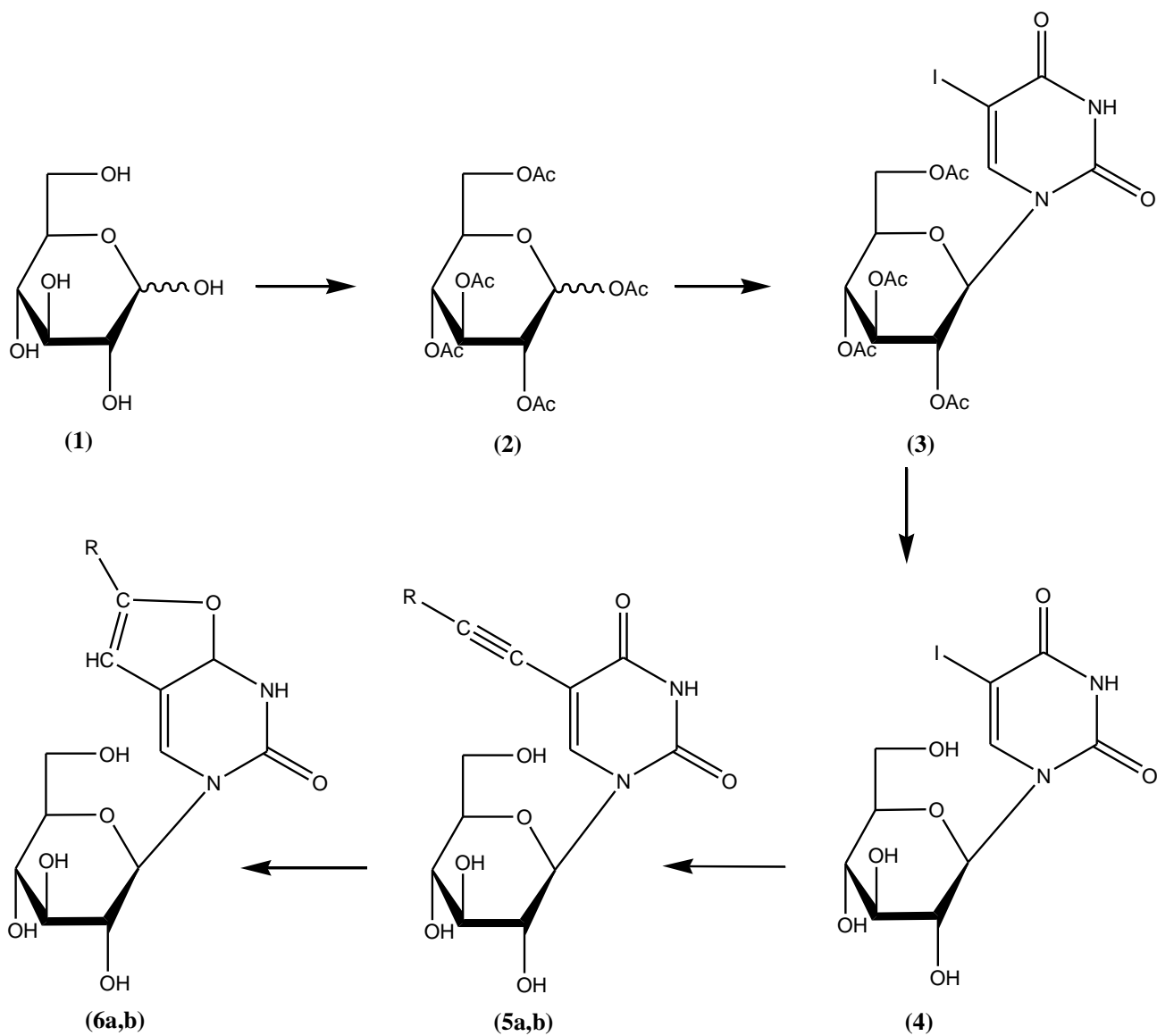
Ορισμένες από τις αντιδράσεις που περιγράφονται, επιβάλλουν την χρήση άνυδρων διαλυτών όπως CH_3CN και DMF. Η ξήρανση τους γίνεται παρουσία υδριδίου του ασβεστίου με θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα υπό αναβρασμό κατά τη διάρκεια μιας νύχτας. Στη συνέχεια πραγματοποιείται απόσταξη υπό άζωτο και το απόσταγμα συλλέγεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3\AA (molecular sieves).

Ταυτοποίηση ενώσεων

Μετά τη σύνθεση των ενώσεων γίνεται ταυτοποίηση με τη χρήση φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα ^1H NMR μετρήθηκαν με Bruker 500 MHz, χρησιμοποιώντας δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3) ή σε δευτεριωμένη μεθανόλη (CD_3OD). Το tetramethylsilane (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς και η πολλαπλότητα των καμπύλων φαίνεται με s (single), d (double), m (multiple). Οι σταθερές σύζευξης J μετρήθηκαν σε Hz.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Επισκόπηση συνθετικής οδού



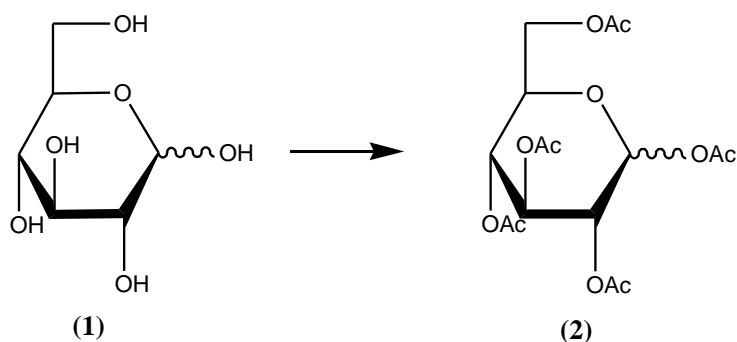
Όπου: **5a** R= C₃H₇, **5b** R= C₅H₁₁, **6a** R= C₃H₇, **6b** R= C₅H₁₁

Μεθοδολογία σύνθεσης

Η πορεία της σύνθεσης ξεκίνησε με την ακετυλίωση της D-γλυκόζης (**1**), η οποία πραγματοποιήθηκε σε πυριδίνη παρουσία Ac_2O , με αποτέλεσμα την 1,2,3,4,6-πεντα-O-ακετυλο-D-γλυκοπυρανόζη (**2**). Στη συνέχεια, αφού έγινε συλλίωση της βάσης 5-ιωδο ουρακίλης, έγινε προσθήκη αυτής στην πυρανόζη **2** παρουσία καταλύτη $\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3/\text{SnCl}_4$ και CH_3CN . Έτσι έχουμε την ένωση 1-(2,3,6-τετρα-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-ιωδο ουρακίλη (**3**). Το αμέσως επόμενο βήμα της πορείας αυτής είναι η απακετυλίωση της ένωσης **3** με κορεσμένο διάλυμα μεθανολικής αμμωνίας, η οποία οδήγησε στην σύνθεση της ένωσης 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-ιωδο ουρακίλη (**4**). Έπειτα, έχουμε την αντικατάσταση του ιωδίου του νουκλεοζίτη της 5-ιωδο ουρακίλης από ακραία αλκίνια, κατά την αντίδραση Sonogashira. Γίνεται προσθήκη στην ένωση **4** των αλκινίων πεντύνιο και επτύνιο, παρουσία Et_3N (triethylamine) (βάση), CuI (καταλύτης) και $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (καταλύτης) σε άνυδρο DMF, με αποτέλεσμα τους αντίστοιχους 1-(β-D-γλυκοπυρανονουκλεοζίτες) της 5-πεντυνυλοουρακίλης (**5a**) και της 5-επτυνυλοουρακίλης (**5b**). Στο τελευταίο στάδιο της συνθετικής πορείας πραγματοποιείται η κυκλοποίηση των αλκυνυλο νουκλεοζιτών, η οποία καταλύεται από AgNO_3 , με σκοπό τη λήψη των φουρανοπυριμιδινό νουκλεοζιτών (**6a**) και (**6b**).

Αναλυτικά:

1. ΣΥΝΘΕΣΗ 1,2,3,4,6-πεντα-O-ακετυλο-D-γλυκοπυρανόζης

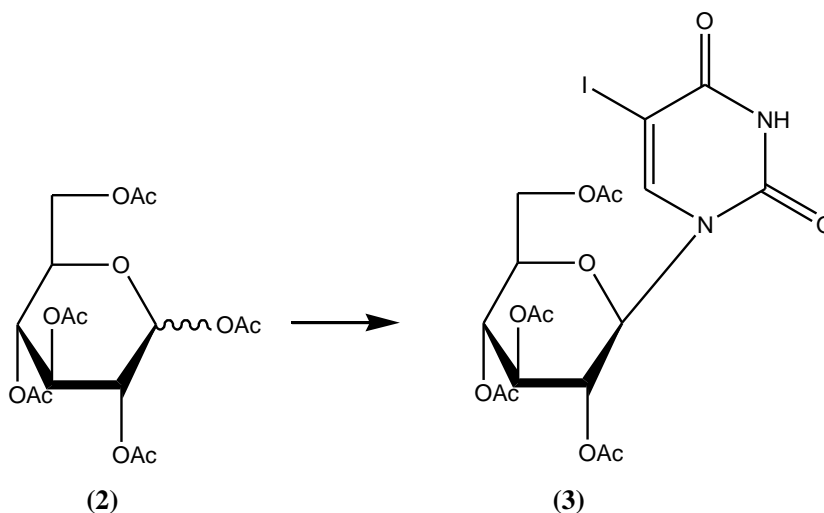


Σε ένα διάλυμα της ένωσης (**1**) (5g, 27.7 mmol) σε πυριδίνη (96.9 mL) προστέθηκε Ac₂O (49.9 mL). Το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα. Μετά την πιστοποίηση του TLC προστέθηκε μεθανόλη (1.5 mL) στο μίγμα, όταν αυτό βρισκόταν σε πάγο (0 °C) για την εξουδετέρωση του Ac₂O. Έτσι η αντίδραση ολοκληρώθηκε. Οι διαλύτες απομακρύνθηκαν υπό κενό, το υπόλειμμα διαλύθηκε σε EtOAc και εκχυλίστηκε αρχικά με κορεσμένο διάλυμα NaHSO₄ και στη συνέχεια με κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃. Η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο Na₂SO₄, διηθήθηκε και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα A. Το επιθυμητό προϊόν (**2**) (4.5g) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού αφρώδους στερεού. Η σύνθεση αυτή είχε απόδοση 85 %.

Συνοπτικά αποτελέσματα της σύνθεσης και χαρακτηριστικά του προϊόντος (**2**):

TLC (Σύστημα A)	R _f = 0,37
Απόδοση	85%

2. ΣΥΝΘΕΣΗ *1*-(2,3,6-τετρα-*O*-ακετυλο-β-*D*-γλυκοπυρανοζυλο)-5-ιωδο ουρακίλη



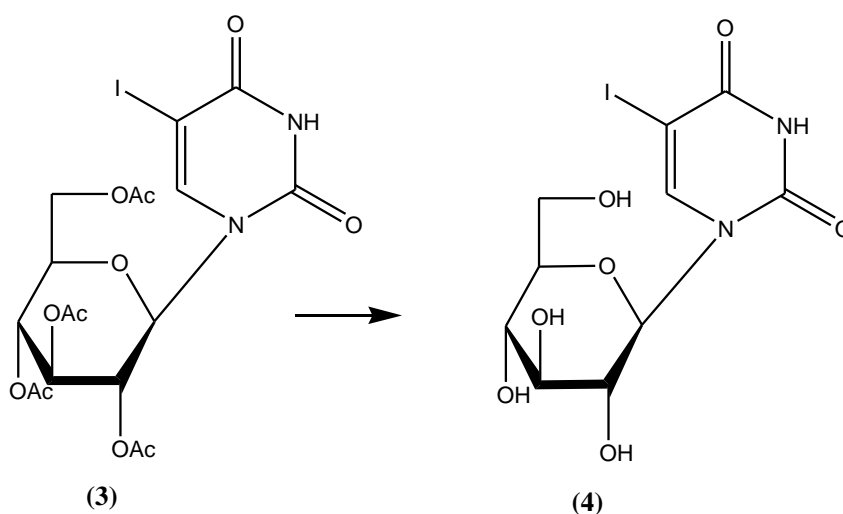
Ένα διάλυμα που περιείχε 5-ιωδοουρακίλη (7.82g, 32.9mmol), HMDS (8.6mL) και σακχαρίνη (277.1mg) σε άνυδρο CH₃CN (115.03mL), θερμάνθηκε με κάθετο ψυκτήρα στους 120 °C και αναδεύτηκε υπό άζωτο. Όταν το μίγμα έγινε διαυγές, γεγονός που υποδεικνύει πως έγινε η συλλιώση της βάσης, προστέθηκαν η *D*-γλυκοπυρανόζη (**2**) (9.17g, 23.5mmol) και ο καταλύτης Me₃SiOSO₂CF₃ (5.9mL).

Έπειτα από μία ώρα, ύστερα από έλεγχο της αντίδρασης με TLC, η αντίδραση ολοκληρώθηκε με θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα στους 55 °C. Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης αφού κρύωσε, εξουδετερώθηκε με κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃, αραιώθηκε με EtOAc, εκχυλίστηκε με νερό και μετά από διήθηση συμπυκνώθηκε. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος αφού πρώτα διαλύθηκε σε CH₂Cl₂ σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Β. Το επιθυμητό προϊόν (**3**) (9.08g) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού στερεού. Η σύνθεση αυτή είχε απόδοση 68%.

Συνοπτικά αποτελέσματα της σύνθεσης και χαρακτηριστικά του προϊόντος (**3**):

TLC (Σύστημα Β)	R _f = 0,37
Απόδοση	68%

3. ΣΥΝΘΕΣΗ 1-(β-D-γλυκοπυρανοζύλο)-5-ιωδο ουρακίλης



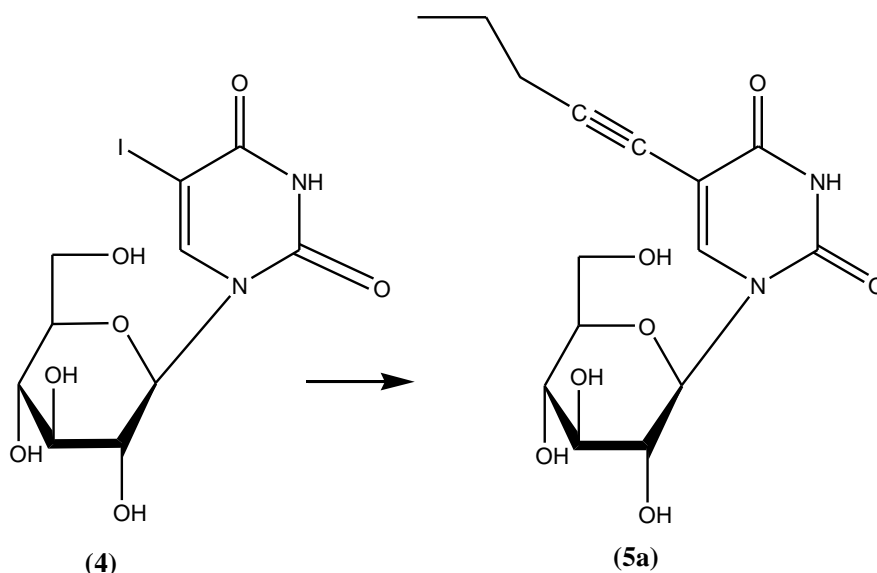
Έγινε κορεσμός διαλύματος MeOH 890.6mL με αέρια αμμωνία σε πάγο (0 °C) και στη συνέχεια προστέθηκε στο διάλυμα της ένωσης (**3**) (9.08g, 15.98mmol). Το διάλυμα αναδεύτηκε ολόκληρη τη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου και συμπυκνώθηκε υπό μειωμένη πίεση. Ο έλεγχος της αντίδρασης έγινε με TLC με διαλύτη EtOAc (πίνακας 4). Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα Γ.

Το επιθυμητό προϊόν (**4**) (4.6g) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού στερεού. Η σύνθεση αυτή είχε απόδοση 72 %.

Συνοπτικά αποτελέσματα της σύνθεσης και χαρακτηριστικά του προϊόντος (**4**)

TLC (ΣΥΣΤΗΜΑ Γ)	R _f = 0,2
Απόδοση	72%

4. ΣΥΝΘΕΣΗ 1-(β-D-γλυκοπυρανοζύλο)- 5-πεντυνυλοουρακίλης (a)



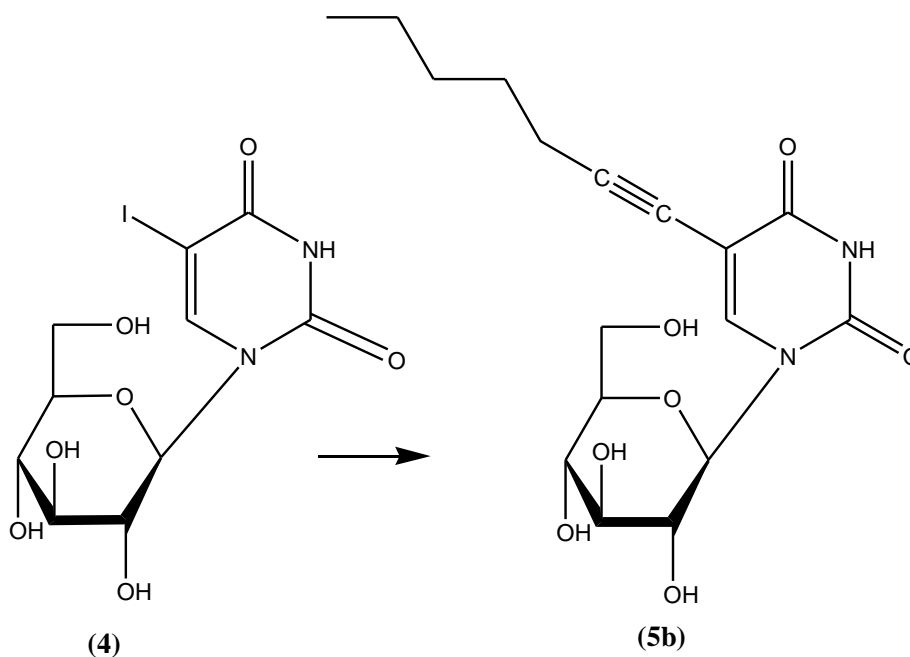
Η ένωση (**4**) (4.6g, 11.5mmol) που προέκυψε διαλύεται σε ένα μίγμα άνυδρου DMF (34.5mL), άνυδρης Et₃N (138mL) και του αλκινίου C₅H₈ (**a**) (34.5mmol, 3.39mL) (3eq). Στη συνέχεια προστέθηκαν 0.391g ή 0.23mmol CuI (0.2 eq) και 1.33g Pd(PPh₃)₄ (0.1 eq) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε ολόκληρη τη νύχτα (5-20 ώρες) σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να ολοκληρωθεί η αντίδραση. Αφού η αντίδραση ελέγχθηκε TLC, οι διαλύτες απομακρύνθηκαν υπό κενό. Το ελαιώδες υπόλειμμα διαλύθηκε σε AcOEt και πλύθηκε με νερό και brine (NaCl). Έπειτα από εκχύλιση, η οργανική φάση ξηράθηκε με MgSO₄ και οι διαλύτες εξατμίστηκαν σε κενό δίνοντας ένα σκούρο λάδι. Ένας πρώτος καθαρισμός χρησιμοποιώντας

χρωματογραφία στήλης (σύστημα έκλουσης Γ) έδωσε την επιθυμητή ένωση (**5a**) μαζί με παραπροϊόντα. Ένας δεύτερος καθαρισμός με τον ίδιο τρόπο και συστήματα έκλουσης AcOEt, και μετά AcOEt/MeOH 9:1 έδωσε το καθαρό προϊόν. Η σύνθεση αυτή είχε απόδοση 70%.

Συνοπτικά αποτελέσματα της σύνθεσης και χαρακτηριστικά του προϊόντος (**5a**):

TLC (ΣΥΣΤΗΜΑ Γ)	R _f = 0,2
Απόδοση	70%

5. ΣΥΝΘΕΣΗ 1-(β-D-γλυκοκυρανοζύλο)- 5-επτονυλοουρακίλης (b)



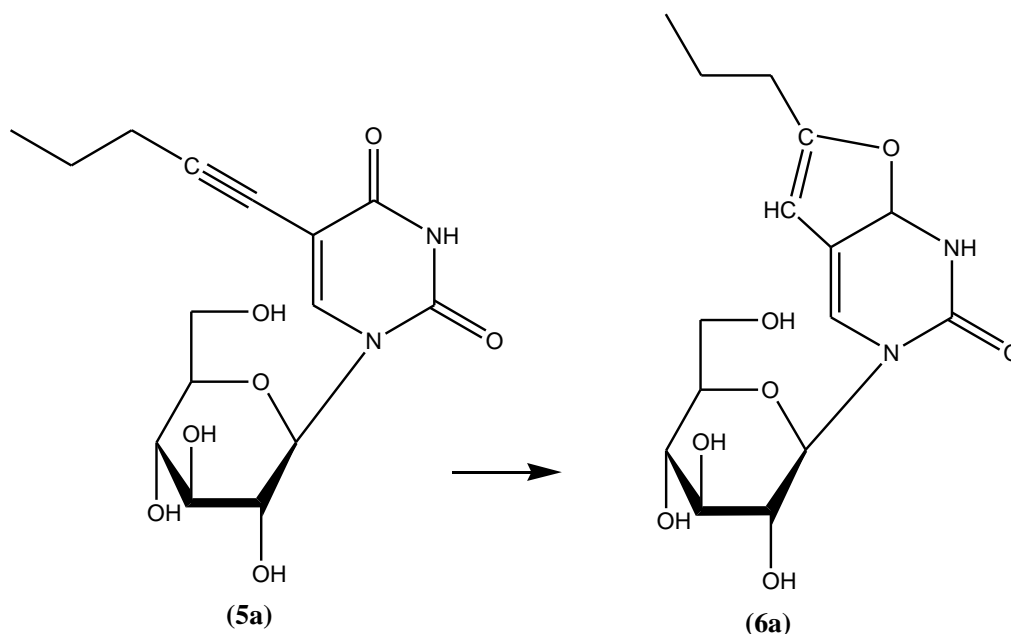
Με παρόμοιο τρόπο προέκυψε και η ένωση (**5b**). Σε μίγμα άνυδρου DMF (34.5mL), άνυδρης Et₃N (3 eq) (138mL) και του αλκινίου C₇H₁₂ (**b**) (34.5mmol, 4.5mL) (3eq), διαλύονται τα 2 mmol της ένωσης (**4**). Έπειτα έγινε προσθήκη 0.391g ή 0.23mmol CuI (0.2 eq) και 1.33g Pd(PPh₃)₄ (0.1 eq) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε ολόκληρη τη νύχτα (5-20 ώρες) σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να ολοκληρωθεί η αντίδραση. Αφού η αντίδραση ελέγχθηκε TLC, οι διαλύτες απομακρύνθηκαν υπό κενό. Το ελαιώδες υπόλειμμα διαλύθηκε σε AcOEt και πλύθηκε με νερό και brine (NaCl). Έπειτα από εκχύλιση, η οργανική φάση ξηράθηκε με MgSO₄ και οι διαλύτες

εξατμίστηκαν σε κενό δίνοντας ένα σκούρο λάδι. Με τον πρώτο καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης (σύστημα έκλουσης Γ) δεν έδωσε μόνο την ένωση (**5b**), αλλά και παραπροϊόντα. Έτσι, ένας δεύτερος καθαρισμός με τον ίδιο τρόπο και σύστημα έκλουσης AcOEt/MeOH 9:1 έδωσε το καθαρό προϊόν. Η σύνθεση αυτή είχε απόδοση 70%.

Συνοπτικά αποτελέσματα της σύνθεσης και χαρακτηριστικά του προϊόντος (**5b**)

TLC (ΣΥΣΤΗΜΑ Γ)	R _f = 0,3
Απόδοση	70%

6. ΣΥΝΘΕΣΗ *6-n-προπυλο-3[1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-φουρανο[2,3-d]πυριμιδινο-2-ονη (a)*



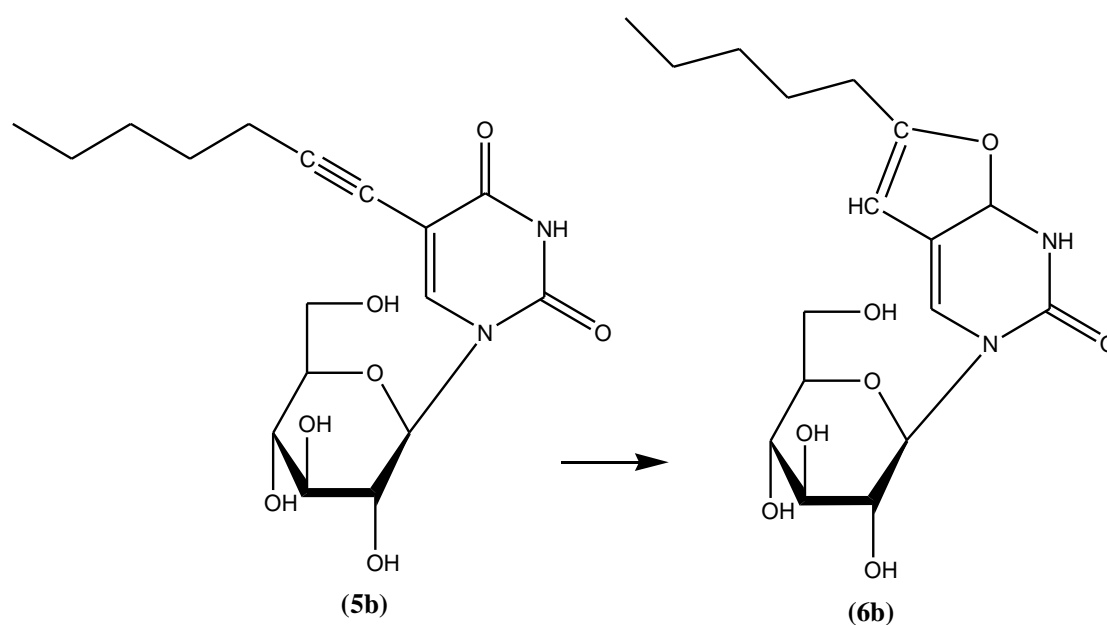
Η ένωση που προέκυψε (**5a**) (2.7g, 8.05mmol) διαλύθηκε σε ακετόνη και στο διάλυμα αυτό προστέθηκε AgNO₃ (0.2 eq). Στη συνέχεια, έγινε ανάδευση ολόκληρη τη νύχτα (5-20 ώρες) μέχρι να ολοκληρωθεί η αντίδραση. Οι διαλύτες απομακρύνθηκαν με κενό και το υπόλειμμα διαλύθηκε σε CH₂Cl₂. Η οργανική φάση

πλύθηκε με νερό και brine. Έπειτα, ξηράθηκε με MgSO₄ και συμπυκνώθηκε υπό κενό με αποτέλεσμα να δώσει τον επιθυμητό νουκλεοζίτη (**6a**). Η σύνθεση αυτή είχε απόδοση 68%.

Συνοπτικά αποτελέσματα της σύνθεσης και χαρακτηριστικά του προϊόντος (**5c**)

TLC (ΣΥΣΤΗΜΑ Γ)	R _f = 0,28
Απόδοση	68%

7. ΣΥΝΘΕΣΗ *6-n*-πεντολο-3[1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-φουρανο[2,3-d]πυριμιδινο-2-ονη (b)



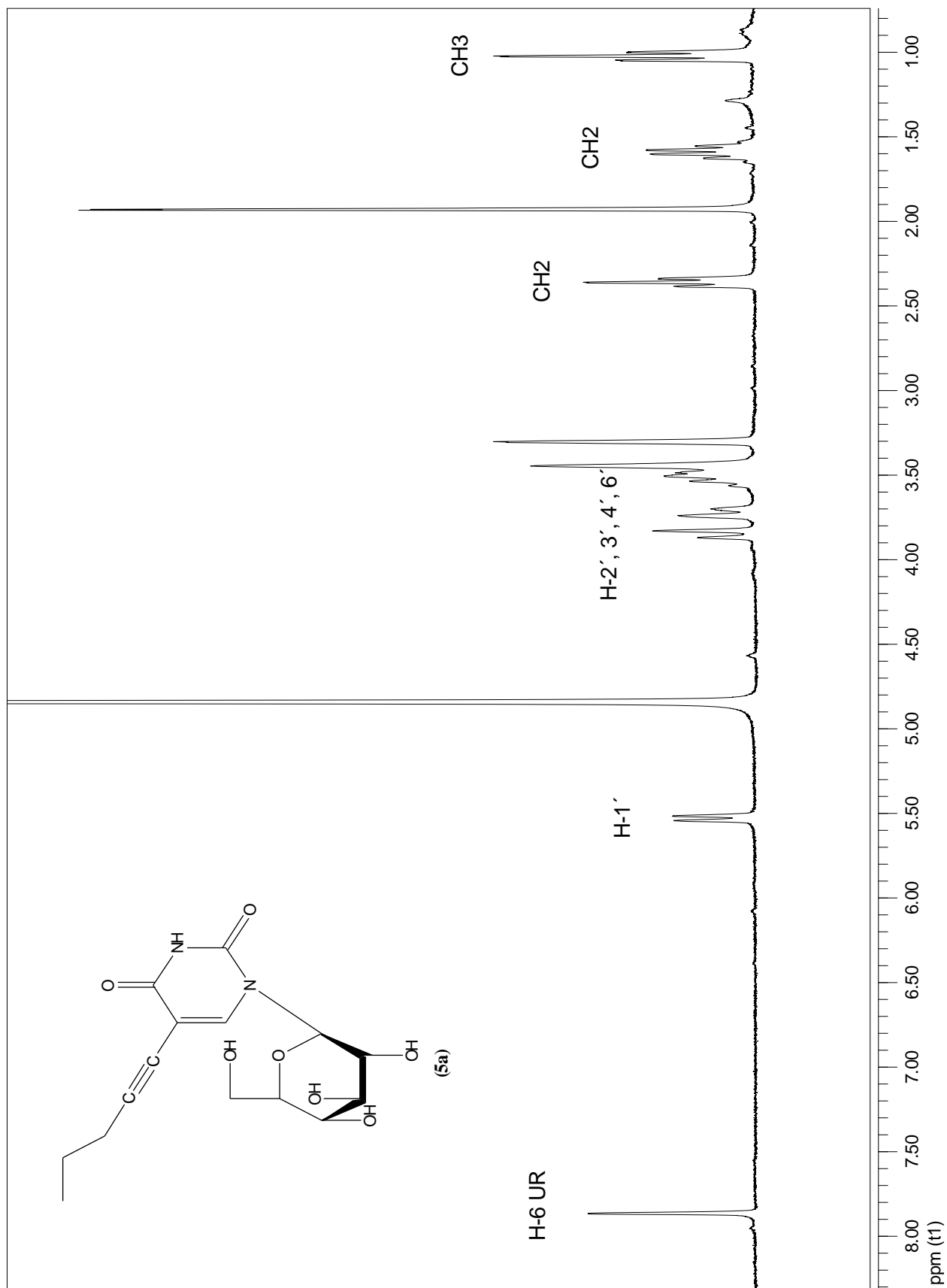
Παρομοίως, διαλύθηκε σε ακετόνη η ένωση που προέκυψε (**5b**) (2.9g, 8.05mmol) και στο διάλυμα αυτό προστέθηκε AgNO₃ (0.2 eq). Ύστερα, το μίγμα αναδεύτηκε ολόκληρη τη νύχτα (5-20 ώρες) μέχρι να ολοκληρωθεί η αντίδραση. Οι διαλύτες απομακρύνθηκαν με κενό και το υπόλειμμα διαλύθηκε σε CH₂Cl₂. Η οργανική φάση πλύθηκε με νερό και brine (5mL). Στη συνέχεια, ξηράθηκε με MgSO₄ και συμπυκνώθηκε υπό κενό με αποτέλεσμα να δώσει τον επιθυμητό νουκλεοζίτη (**6b**). Η σύνθεση αυτή είχε απόδοση 68%.

Συνοπτικά αποτελέσματα της σύνθεσης και χαρακτηριστικά του προϊόντος (**5c**)

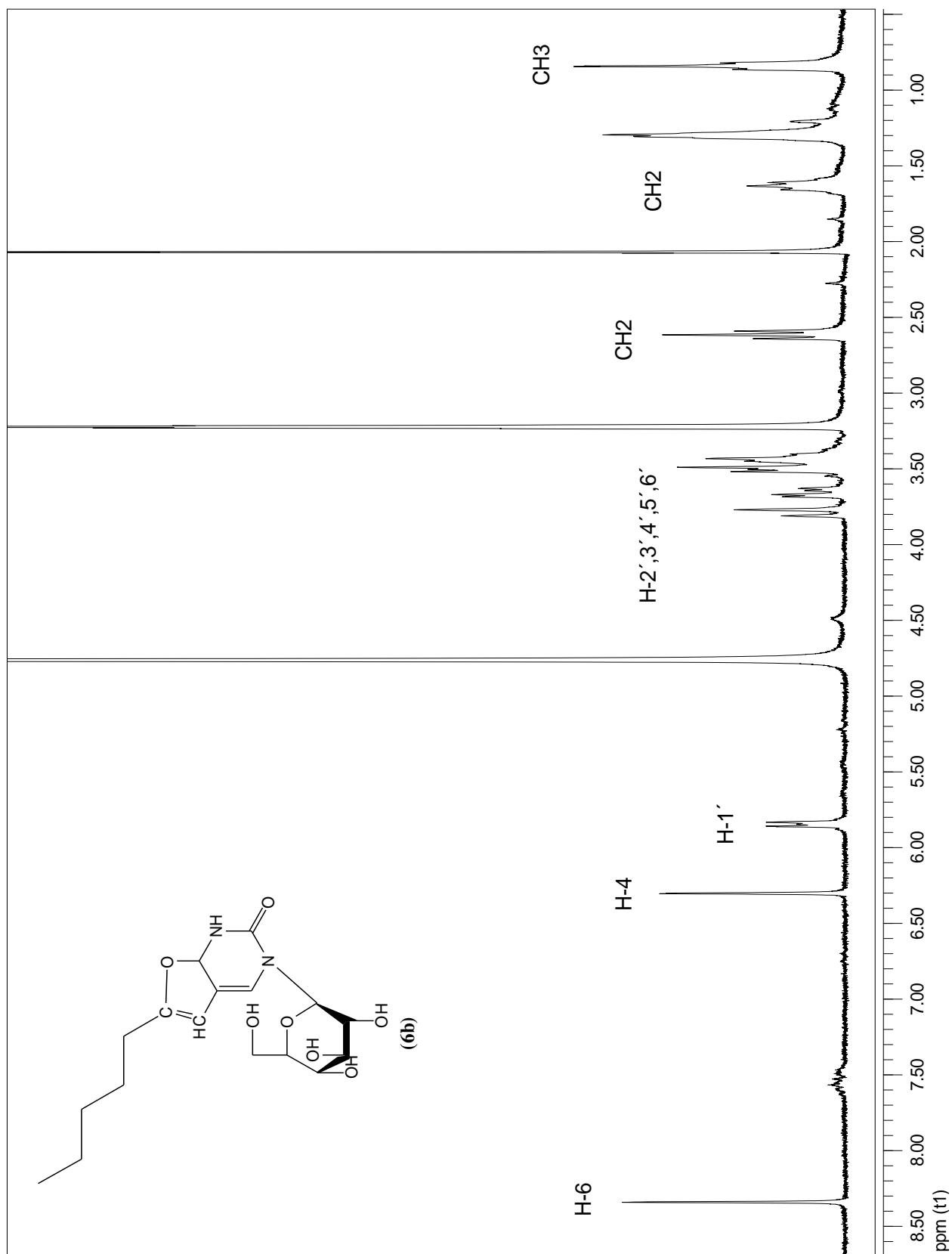
TLC (ΣΥΣΤΗΜΑ Γ)	R _f = 0,30
Απόδοση	68%

Ταυτοποίηση ενώσεων με NMR:

Όλες οι ενώσεις ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ¹H NMR. Ενδεικτικά αναφέρεται το φάσμα της ένωσης 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-πεντινυλοουρακίλης (**5a**) καθώς επίσης και της 6-n-πεντυλο-3[1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)}-φουρανο[2,3-d]πυριμιдино-2-ονη (**6b**). Στα παρακάτω διαγράμματα διαφαίνονται τα πρωτόνια του σακχάρου και της ανθρακικής αλυσίδας που ενώνεται με την ετεροκυκλική βάση.



Εικόνα 16: NMR της ενώσης (5a)



Εικόνα 17: NMR της ενώσης (6b)

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι ερευνητικές προσπάθειες για την καταπολέμηση χρόνιων νόσων όπως ιικές μολύνσεις, κακοήθειες νεοπλασίες, και υπεργλυκαιμικές νόσοι έχουν στραφεί στην ανάπτυξη νουκλεοζιτικών αναλόγων ως πιθανά φάρμακα. Κύριος στόχος των ερευνητικών προσπαθειών είναι η ανάπτυξη νουκλεοζιτικών αναλόγων, τα οποία να παρουσιάζουν εκλεκτικότητα όσον αφορά στην δράση τους και να έχουν χαμηλή τοξικότητα σε υγιή κύτταρα, όπως κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας νέας τάξης γλυκοπυρανονουκλεοζιτών με πιθανή αντιδιαβητική δράση. Η πειραματική διαδικασία ήταν σχετικά απλή, με σύντομα βήματα. Οι τελικές αποδόσεις της σύνθεσης του τελικών ενώσεων των γλυκοπυρανονουκλεοζιτών είναι αρκετά καλές. Πιο συγκεκριμένα, η σύνθεση της 1,2,3,4,6-πεντα-Ο-ακετυλο-D-γλυκοπυρανόζης (**2**) είχε απόδοση 85%, της 1-(2,3,6-τετρα-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-ιωδο ουρακίλη (**3**) είχε απόδοση 68%, της 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-ιωδο ουρακίλης (**4**) είχε απόδοση 72%. Η σύνθεση της 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-πεντυλοουρακίλης (αντίδραση Sonogashira) (**5a**) είχε απόδοση 70%, της 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-επτυνυλοουρακίλης (αντίδραση Sonogashira) (**5b**) είχε απόδοση 70%, της 6-n-προπυλο-3[1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)]-φουρανο[2,3-d]πυριμιдино-2-ονη (**6a**) είχε απόδοση 68% και της 6-n-πεντυλο-3[1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)]-φουρανο[2,3-d]πυριμιдино-2-ονη (**6b**) είχε απόδοση 68%.

Όλες οι νέες ενώσεις χαρακτηρίζονται από στοιχειώδεις αναλύσεις και αναλύσεις φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού $^1\text{H NMR}$.

Έχουν πραγματοποιηθεί κινητικά πειράματα για τον προσδιορισμό της ανασταλτικής δράσης των νέων C-5-αλκυνολο πυριμιдино καθώς και των κυκλοποιημένων αναλόγων τους. Τα κινητικά πειράματα έδειξαν ότι αυτές οι ενώσεις είναι αναστολείς του ενζύμου με τιμές IC₅₀ που κυμαίνονται μεταξύ 121 μM και 6145 μM. (**ΠΙΝΑΚΑΣ 1**)

ΠΙΝΑΚΑΣ 1:

5a	5b	6a	6b
$IC_{50} = 765.8 \pm 9.6 \mu M$	$IC_{50} = 6145.8 \pm 237.6 \mu M$	$IC_{50} = 154.2 \pm 4.1 \mu M$	$IC_{50} = 121.8 \pm 0.1 \mu M$

Έγινε μέτρηση της ενεργότητας της GP ύστερα από την αλληλεπίδρασή της με τους παραπάνω αναστολείς και παρατηρώντας την τιμή IC_{50} μπορούμε να βγάλουμε συμπεράσματα για την ανασταλτική δράση των ενώσεων. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή IC_{50} , τόσο μεγαλύτερη είναι η ενζυμική δραστηριότητα, δηλαδή τόσο λιγότερη ανασταλτική δράση έχουν οι ενώσεις μας.

Στις ενώσεις **6a** και **6b** πραγματοποιήθηκε η κυκλοποίηση των τελικών αλκινίων που είχαν προστεθεί στη θέση 5 της ουρακίλης, με σκοπό τη σύνθεση φουρανοπυριμιδινό- νουκλεοζιτών. Οι νουκλεοζίτες αυτοί είναι αρκετά ογκώδεις με αποτέλεσμα να δυσκολεύεται η διόδος τους στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου και κατά συνέπεια η τιμή της IC_{50} σε αυτούς τους αναστολείς να είναι στα 121.8μM για την (**6b**) και 154.2μM για την (**6a**). Στην ένωση (**5a**) έγινε προσθήκη ενός πεντύνυλο υποκαταστάτη σχηματίζοντας έτσι μια «ουρά» στο τέλος του αναστολέα. Το μεγάλο μέγεθος δυσκολεύει ακόμα περισσότερο την διόδο του αναστολέα στο καταλυτικό κέντρο με αποτέλεσμα η τιμή της IC_{50} να αυξάνεται στα 765.8μM. Τέλος, η ένωση (**5b**) είναι ο χειρότερος αναστολέας. Διαθέτει έναν επτύνυλο υποκαταστάτη στη θέση 5 της ουρακίλης. Η ουρά του τελικού αλκινίου που δημιουργείται, όπως και στην περίπτωση της ένωσης (**5a**), αυξάνει το μέγεθος του αναστολέα. Η προσθήκη ακόμα 2 ατόμων άνθρακα στο τελικό αλκίνιο δυσκολεύει την πρόσβαση του αναστολέα και την ισχυρή πρόσδεση του στο καταλυτικό κέντρο για μείωση της δραστηριότητας

του ενζύμου. Το μεγάλο μέγεθος του αναστολέα έχει σαν αποτέλεσμα η τιμή της IC_{50} να είναι 6145.8 μ M, μεγαλύτερη δηλαδή από κάθε άλλη ένωση που μελετήθηκε.

Από τα παραπάνω προκύπτει το συμπέρασμα πως η δραστικότητα των αναστολέων που μελετήθηκαν, εξαρτάται από τον υποκαταστάτη που προστίθεται στη θέση 5 της ουρακίλης. Υποκαταστάτες με ιδιαίτερα μεγάλο μήκος ή μέγεθος παρεμποδίζουν την πρόσβαση στο καταλυτικό κέντρο με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται και η αναστολή της βιολογικής δραστικότητας του ενζύμου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agelis, G.; Tzioumaki, N.; Botic, T.; Cencic, A.; Komiotis D. *Bioorg. Med. Chem.* 2007, p.15, 5448
- Agelis G., Tzioumaki N., Tselios T., Botic T., Cencic A., Komiotis D. *Eur. J. Med. Chem.* 2008, p.43, 1366
- Azuma, A.; Nakajima, Y.; Nishizono, N.; Minakawa, N.; Suzuki, M.; Hanaoka, K.; Kobayashi, T.; Tanaka, M.; Sasaki, T.; Matsuda, A. *J. Med. Chem.* 1993, p.36, 4183
- Azuma, A.; Hanaoka, K.; Kurihara, A.; Kobayashi, T.; Miyaushi, S.; Kamo, N.; Tanaka, M.; Sasaki, T.; Matsuda, A. *J. Med. Chem.* 1995, p.38, 3391
- Berg, J. M., Tymoczko J. L., Stryer L, *Βιοχημεία Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*, 2001 (p) 329-351
- Berg, J. M., Tymoczko J. L., Stryer L, *Βιοχημεία Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*, 2006 p.649, 651
- Bhat, U. G.; Pandit, B.; Gartel, A. L. *Molecular cancer therapeutics* 2010
- Halliwell, B. *Free Radicals and other reactive species in disease. Encyclopaedia of life sciences* 2001
- Hoover, D.J., Lefkowitz-Snow, S., Burgess-Henry, J.L., Martin, W.H., Armento, S.J., Stock, I.A., McPherson, R.K., Genereux, P.E., Gibbs, E.M., and Treadway, J.L., Indole-2-carboxamide inhibitors of human liver glycogen phosphorylase. 1998. *J. Med. Chem.* 41: p. 2934-2938.
- Komiotis, D.; Manta S.; Tsoukala E.; Tzioumaki N. *Curr. Med. Chem.: Anti-Infect. Agents* 2008, p.7, 219
- Komiotis, D.; Delatre, S.; Holt, L.; Ollapally, A.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Ligo, M. *Nucleosides Nucleotides* 1991, p.10, 431
- Kontou, M., Leonidas, D.D., Vatzaki, E.H., Tsantili, P., Mamalaki, A., Oikonomakos, N.G., Acharya, K.R., and Tzartos, S.J., The crystal structure of the Fab fragment of a rat monoclonal antibody against the main immunogenic region of the human muscle acetylcholine receptor. 2000. *Eur. J. Biochem.* 267: p. 2389-2397.

- Lui V.W.Y.W., Lau C.P.Y.P., Cheung C.S.F.S., Ho K., Ng M.H.L.H., Cheng S.H.H., Hong B., Tsao S.-W.W., Tsang C.M.M., Lei K.I.K.I., Yamasaki Y., Mita A., Chan A.T. *Biochemical pharmacology* 2010, p.79, 1772–1780.
- Marshall W., *Clinical biochemistry*, 2000, p.217-220
- Martin, W.H., Hoover, D.J., Armento, S.J., Stock, I.A., McPherson, R.K., Danley, D.E., Stevenson, R.W., Barrett, E.J., and Treadway, J.L., Discovery of a human liver glycogen phosphorylase inhibitor that lowers blood glucose in vivo. 1998. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: p. 1776-1781.
- Matsuda, A.; Nakajima, Y.; Azuma, A.; Tanaka, M.; Sasaki, T. *J. Med. Chem.* 1991b, p.34, 2917
- Matsuda, A.; Azuma, A. *Nucleosides Nucleotides* 1995, p.14, 461
- Matsuda, A.; Sasaki, T. *Cancer Sci.* 2004, p.95, 105
- McMurry John, *Οργανική Χημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*, 2000, p.1245-1247
- McMurry John, *Οργανική Χημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*, 2000, p.151- 152
- Oikonomakos, N.G., Tsitsanou, K.E., Zographos, S.E., Skamnaki, V.T., Goldmann, S., and Bischoff, H., Allosteric inhibition of glycogen phosphorylase a by the potential antidiabetic drug 3-isopropyl-4-(2-chlorophenyl)-1,4-dihydro-1-ethyl-2-methyl-pyridine-3,5,6-tricarboxylate. 1999. *Protein Sci.* 8: p. 1930-1945
- Oikonomakos, N.G., Skamnaki, V.T., Tsitsanou, K.E., Gavalas, N.G., and Johnson, L.N., A new allosteric site in glycogen phosphorylase b as a target for drug interactions. 2000. *Structure* 8: p. 575-584
- Oikonomakos, N.G., Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. 2002. *Curr Protein Pept Sci* 3(6): p.561-86
- Oikonomakos, N. G.; Somsak, L., *Curr. Opin. Investig. Drugs* 2008, 9 (4), p.379-395
- Perigaud, C.; Gosselin, G.; Imbach, J. L. *Nucleosides Nucleotides* 1992, p.11, 903

- Somsak, L.; Czifrak, K.; Toth, M.; Bokor, E.; Chrysina, E. D.; Alexacou, K. M.; Hayes, J. M.; Tiraidis, C.; Lazoura, E.; Leonidas, D. D.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G., *Curr. Med. Chem.* 2008, 15 (28), p.2933-2983
- Spanou, C.; Manta, S.; Komiotis D.; Dervishi, A.; Kouretas, D. *Int. J. Mol. Sci.* 2007, p.8, 695
- Stryer Lubert, Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 1997, p.347-354
- Tanaka, M.; Matsuda, A.; Terao, T.; Sasaki, T. *Cancer Lett.* 1992, p.64, 67
- Tiraidis, C., Alexacou, K.M., Zographos, S.E., Leonidas, D.D., Gimisis, T., and Oikonomakos, N.G., FR258900, a potential anti-hyperglycemic drug, binds at the allosteric site of glycogen phosphorylase. 2007. *Protein Sci* 16(8): p. 1773-82.
- Tsoukala E., Agelis G., Dolinsek J., Botic T., Cencic A., Komiotis D. *Bioorganic & medicinal chemistry* 2007, p.15, 3241–3247
- Tzioumaki N., Tsoukala E., Manta S., Agelis G., Balzarini J., Komiotis D. *Archiv der Pharmazie* 2009, p.342, 353
- Zhou, W.; Gumina, G.; Chong, Y.; Wang, J.; Schinazi, R. F.; Chu, C. K. J. *Med. Chem.* 2004, 47, 3399
- 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., and Johnson, L.N., The structure of glycogen phosphorylase b with an alkyldihydropyridine-dicarboxylic acid compound, a novel and potent inhibitor. 1997. *Structure* 5(11): p. 1413-25
- Zographos, S.E. Leonidas, D.D., Lazoura, E., Dossi, K., Konarev, P.V., Kikhney, A.G., Svergun, D.I., Schmoll, D., Defossa, E., and Oikonomakos, N.G. Experimental evidence for the existence of an intermediate form of glucokinase, which accounts for the sigmoidal kinetic behaviour of the enzyme. EMBL, Hamburg Outstation, Annual Report 2007, Part II, pp. 371-372